

بررسی اثر کلر بر زندهمانی و تغییرات فراساختاری *Acanthamoeba castellanii*

زینب اسدی^۱، سمیه بهرامی^{۲*}، مهدی زارعی^۳، حسین حمیدی نجات^۴

چکیده

مقدمه: از کلر به عنوان یک گندزدای موثر در از بین بردن میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در سیستم تصفیه آب شهری استفاده می‌شود. با این حال مطالعات نشان داده‌اند که *Acanthamoeba* از منابع آبی مختلف کشورمان علی‌رغم تصفیه جدا می‌شود. در این مطالعه به بررسی اثر غلظت‌های متداول کلر که در سیستم تصفیه آب شهری استفاده می‌شود بر زندهمانی *Acanthamoeba castellanii* و تغییرات فراساختاری ناشی از آن پرداخته شده است. **روش‌ها:** تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های *Acanthamoeba* در زمان‌های مختلف (۳۰ دقیقه، ۱ و ۲ ساعت) با غلظت‌های مختلف (۱-۱۰ ppm) هیپوکلریت کلسیم، تیمار شدند. برای بررسی تغییرات فراساختاری تروفوزوئیت آمیب از میکروسکوپ الکترونی نگاره و گذاره استفاده شد. **نتایج و بحث:** نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت‌های متداول کلر قادر به از بین بردن کامل تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های *A. castellanii* نیست. همچنین کیست‌ها به غلظت‌های مختلف کلر مقاوم‌تر بوده و در زمان و غلظت برابر کلر، درصد کمتری از کیست‌ها در مواجهه با کلر از بین می‌روند. تغییر نفوذپذیری غشای سلولی، کاهش تعداد پاهای کاذب، افزایش میتوکندری، واکوتله شدن سیتوپلاسم و تغییر در شبکه‌ی اندوپلاسمی از تغییرات فراساختاری ایجاد شده در آمیب بود. این مطالعه ضرورت بازنگری دستورالعمل بکارگیری گندزداهایی نظیر کلر را در تصفیه‌ی سیستم آب شهری مطرح می‌کند. چرا که علاوه بر بیماری‌زا بودن آمیب، مخزن بودن آن و انتقال عوامل میکروبی حائز اهمیت است.

واژه‌های کلیدی: آکانتامویبا کستلانی، تغییرات فراساختاری، کلر، زندهمانی.

۱. دانشجوی دکتری انگل‌شناسی بخش انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران. اهواز، اهواز، ایران.
۲. دانشیار بخش انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، اهواز، ایران. (* ایمیل نویسنده مسئول: s.bahrami@scu.ac.ir)
۳. استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، اهواز، ایران.
۴. استاد بخش انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، اهواز، ایران.

مقدمه

آمیبه‌های آزادی، از جمله *Naegleria fowleri*، *Balamuthia mandrillaris* و *Acanthamoeba* انگل‌های تک‌یاخته‌ای فرصت‌طلب با گسترش جهانی هستند. این تک‌یاخته‌ها از مکان‌های مختلف از جمله هوا، آب، خاک، گرد و غبار، لنزهای تماسی، تجهیزات بیمارستانی و نمونه‌های بالینی جدا شده‌اند (Karamati et al., 2016; Niyyati et al., 2018). سبک زندگی آمفیژوئیک (Amphizoic) این تک‌یاخته‌ها به آن‌ها این امکان را می‌دهد که در شرایط مختلف محیطی زنده بمانند و باعث عفونت‌های انسانی شوند (Lekkla et al., 2005). آمیبه‌های آزادی می‌توانند به عنوان عامل انتقال و یا محافظت گروهی از میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌هایی نظیر *Vibrio*، *Cryptococcus neoformans*، *Listeria monocytogenes* و *Chlamydomonas cholerae* باشند (Thomas et al., 2010).

تک‌یاخته‌ی آزادی *Acanthamoeba* اولین بار توسط کاستلانی در حین کشت قارچ *Cryptococcus pararrayos* کشف شد (Castellani, 1930). این آمیبه بعنوان عامل بالقوه‌ی بیماری‌زا در انسان شناخته شده است که در محیط‌های مختلف، گسترش یافته است. کراتیت *Acanthamoeba* یی بیماری چشمی ناشی از این تک‌یاخته است که تهدیدی برای سلامت عمومی در سراسر جهان محسوب می‌شود و به سرعت در حال گسترش است (McKelvie et al., 2018; Król-Turmińska et al., 2017). همچنین آنسفالیت گرانولوماتوز آمیبی، پنومونی، آکانتاموبیاز پوستی و آکانتاموبیاز منتشر از جمله عفونت‌های تهدید کننده در زندگی انسان هستند که بر اثر *Acanthamoeba* ایجاد می‌شوند (Juárez et al., 2018).

چرخه‌ی زندگی *Acanthamoeba* شامل دو مرحله تروفوزوئیت و کیست است. در شرایط مساعد محیطی تروفوزوئیت‌ها دچار تقسیم میتوز می‌شوند و قادر به فاگوسیتوز کردن باکتری‌ها و مخمرها هستند. تحت شرایط نامطلوب محیطی مانند گرسنگی، خشکی، هیپراسمولاریته و وجود عوامل بیوسیدال، تروفوزوئیت‌ها به کیست تبدیل می‌شوند (Neff, 1962; Weisman, 1976). کیست‌ها می‌توانند در شرایط مساعد محیطی به تروفوزوئیت‌ها متمایز شوند (Neff, 1962; Rubin et al., 1976). کیست

Acanthamoeba نسبت به بسیاری از عوامل ضدعفونی کننده مقاوم است (Heaselgrave *et al.*, 2016). بنابراین مطالعات زیادی همواره برای شناسایی ترکیبات جدید با اثر بیشتر و عوارض جانبی کمتر در حال انجام است. کلر از عوامل ضد میکروبی متداول در تصفیه‌ی آب، صنایع غذایی و دیگر بخش‌ها است.

کلر زنی یکی از روش‌های رایج تصفیه آب آشامیدنی و فاضلاب است که قابلیت غیر فعال کردن طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و کاهش میزان بیماری‌های میکروبی منتقله از آب آشامیدنی را دارد (Dunnick & Melnick., 1993). کلر در آب به اسید هیپوکلروس HOCL و هیپوکلریت ClO^- هیدرولیز می‌شود (Albrich *et al.*, 1986). مشخص شده است که HOCL عمدتاً پوشش سلولی را مورد هدف قرار می‌دهد و حمل و نقل ATP، الکترون و متابولیت را مهار می‌کند. همچنین نفوذپذیری غشا را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد و باعث مهار سنتز DNA می‌شود (Albrich & Hurst., 1982). تاکنون زنده‌مانی تک‌یاخته‌هایی مانند *Cryptosporidium*، *Giardia* و *Entamoeba histolytica* در برابر بیوسیدهای مورد استفاده در تصفیه‌ی آب (کلر، مونوکلرامین و دی‌اکسید کلر) مورد بررسی قرار گرفته‌است (Maillard., 2004). اخیراً آمیب‌های آزادی‌مانند *Acanthamoeba* نیز به عنوان اهداف مهم در تصفیه‌ی آب در نظر گرفته شده‌اند (Loret & Greub., 2010). در تحقیقات صورت گرفته مشخص شده‌است علی‌رغم استفاده از کلر برای گندزدایی آب‌ها، آمیب *Acanthamoeba* در آب زنده مانده و جداسازی می‌گردد. بنابراین هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر غلظت‌های متداول کلر که برای گندزدایی آب و سطوح در صنایع کشورمان استفاده می‌شود بر آمیب *Acanthamoeba castellanii* بوده‌است. ضمن اینکه تغییرات فراساختاری تروفوزوئیت‌های مواجه شده با کلر در این مطالعه مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت مراحل مختلف آمیب

در این مطالعه از سویه‌ی استاندارد ATCC30010 *A. castellanii* استفاده شد. برای کشت تروفوزوئیت‌های *Acanthamoeba* از محیط PYG (Peptone Yeast Glucose) در فلاسک‌های ۲۵ cm² استفاده شد. آمیب‌ها در دمای ۲۶ درجه‌ی سانتی‌گراد در محیط PYG انکوبه شدند و هر سه روز یکبار پاساژ جدیدی از آن تهیه می‌گردید. برای تبدیل تروفوزوئیت‌ها به کیست، تروفوزوئیت‌ها روی پلیت آگار بدون باکتری کشت داده شدند. پس از هفت روز کیست‌های ایجاد شده با محلول AS (*Amoeba salin*) شستشو داده شدند. محلول AS شامل دو محلول A و B است. برای تهیه‌ی محلول A، ۱/۲ گرم کلرید سدیم، ۰/۰۴ گرم سولفات منیزیم ۷ آب، ۱/۴۲ گرم فسفات مونوهیدروژن سدیم، ۱/۳۶ گرم فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل گردید. محلول B نیز متشکل از ۰/۰۴ گرم کلرید کلسیم دو آب در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل بود. محلول نهایی AS متشکل از ۱۰ میلی‌لیتر محلول A و ۱۰ میلی‌لیتر محلول B و ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر است. pH محلول توسط KOH حدود ۶/۹۱ تنظیم گردید. پس از شست‌وشو با محلول AS، کیست‌ها با دور ۵۰۰۰ در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و در نهایت در محیط PAS (Page's Amoeba Saline Solution) برای آزمایش‌های بعدی نگهداری شدند (Zarei et al., 2019).

مواجهه‌ی آمیب با کلر

برای بررسی اثر کلر بر آمیب، در ابتدا از فلاسک حاوی آمیب کشت شده که به مرحله لگاریتمی رشد خود رسیده بود با استفاده از سمپلر مقدار ۲۰ میکرولیتر تروفوزوئیت برداشته شد. قبل از برداشت تروفوزوئیت‌ها به علت چسبندگی آنها، فلاسک حاوی آمیب روی کیسه یخ قرار داده شد تا به راحتی تروفوزوئیت‌ها از سطح فلاسک جدا شوند. تعداد

آمیبه‌ها به روش شمارش مستقیم و با استفاده از لام نئوبار و زیر میکروسکوپ اینورت شمارش گردید.

برای شمارش تروفوزوئیت *Acanthamoeba* از خانه‌ی مربوط به گلبول‌های سفید لام هموسیتمتر استفاده شد. لام نئوبار به صورت یک مربع به ابعاد 3×3 سانتی‌متر است که ۴ خانه‌ی آن مربوط به گلبول سفید و یک خانه‌ی مرکزی مربوط به شمارش گلبول‌های قرمز است. برای شمارش *Acanthamoeba*، تعداد تروفوزوئیت‌ها، ۴ خانه مربوط به WBC که شامل ۱۶ خانه‌ی کوچک است، در زیر میکروسکوپ شمارش گردید. از آن جایی که طول و عرض هر خانه‌ی بزرگ ۱ میلی‌متر و ارتفاع بین لامل و خانه‌های لام حدود ۰/۱ میلی‌متر است، به این ترتیب حجم هر خانه‌ی بزرگ ۰/۱ میلی‌متر مکعب است. پس مقدار انگل در هر خانه ۰/۱ میلی‌متر مکعب شمارش شده و برای تبدیل آن به ۱ میلی‌لیتر عدد بدست آمده در ۱۰۰۰۰ ضرب می‌گردد.

CC/تعداد آمیبه = $10000 \times$ میانگین تعداد آمیبه انگل شمارش شده ۴خانه بزرگ

WBC

مطابق مطالعات انجام گرفته تعداد تروفوزوئیت جهت مواجهه با رقت‌های مختلف کلر 10^6 آمیبه در هر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد (Mogoa et al., 2010). آزمایش مواجهه، در پلیت ۶ خانه انجام شد و تروفوزوئیت‌ها با غلظت‌های مختلف (۱-۱۰ ppm) هیپوکلریت کلسیم مواجه شدند. غلظت‌های انتخاب شده غلظت‌هایی است که به طور متداول برای کلر استفاده می‌شود. مواجهه بصورت سه تکرار و در سه زمان مختلف ۳۰ دقیقه و ۱ و ۲ ساعت انجام گرفت. ضمن اینکه برای هر تکرار و هر زمان یک نمونه کنترل که حاوی 10^6 تروفوزوئیت مواجهه نشده و رقیق شده با ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، در نظر گرفته شد. پس از مواجهه در زمان‌های تعیین شده از تیوسولفات سدیم ۰/۱ مولار به عنوان متوقف کننده واکنش استفاده شد و با استفاده از سمپلر به میزان ۲۰ میکرولیتر از این محلول به میکروتیوب‌ها اضافه گردید. با استفاده از لام نئوبار و رنگ حیاتی تریپان‌بلو زنده‌مانی آمیبه‌ها بررسی شد. آمیبه‌های مرده به رنگ آبی و آمیبه‌های زنده بدون رنگ

دیده شدند. بر اساس نتایج، بهترین زمان و غلظت برای LC50 (۵۰ درصد کشندگی) تعیین گردید و برای بررسی فراساختاری تروفوزوئیت‌ها با آن غلظت مواجه گردیدند.

بررسی تغییرات ساختاری و فراساختاری آمیب مواجه یافته با کلر

برای بررسی تغییرات فراساختاری آمیب از میکروسکوپ الکترونی نگاره و گذاره استفاده و این تغییرات مورد بررسی قرار گرفت.

میکروسکوپ الکترونی نگاره یا FESEM (Field emission scanning electron microscopy) نوعی میکروسکوپ الکترونی است که قابلیت عکس‌برداری از سطوح با بزرگنمایی ۱۰ تا ۵۰۰۰۰۰ برابر با قدرت تفکیکی کمتر از ۱ تا ۲۰ نانومتر (بسته به نوع نمونه) را دارد. در ابتدا درون هر چاهک از پلیت ۶ چاهک کشت سلولی یک صفحه آلومینیومی به ابعاد ۱×۱ cm که از قبل طراحی و استریل شده بود، قرار گرفته شد. تعداد 10^6 تروفوزوئیت شمارش و به آرامی بر روی صفحه آلومینیومی درون چاهک‌ها منتقل شد و در نهایت با غلظت انتخابی کلر (۵ ppm) به مدت دو ساعت مواجه گردید. پس از اتمام دوره انکوباسیون دو ساعته، در زیر هود و در شرایط استریل مایع داخل چاهک‌ها با کمک سمپلر به آرامی تخلیه شد و فرصت داده شد که صفحات آلومینیومی داخل چاهک‌ها خشک شوند. سپس سلول‌های روی صفحات آلومینیومی با استفاده از گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد سرد به مدت ۲ ساعت فیکس گردیدند. در نهایت گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد درون چاهک‌ها تخلیه و و بعد از خشک شدن صفحات آلومینیومی، سلول‌های روی صفحات با سریال الکلی ۲۰ الی ۱۰۰ درصد و برای هر سریال به مدت ۵ دقیقه آبگیری شدند. پس از اتمام مرحله آبگیری و پس از خشک شدن، صفحات در یک محفظه از قبل طراحی شده قرار گرفتند و در مکانی با دمای مناسب و عاری از گرد و خاک نگهداری شدند. در نهایت جهت بررسی مطالعات ریخت‌شناسی و سایر مطالعات به مرکز میکروسکوپ الکترونی مستقر در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل گردید. با این روش تصاویر سه بعدی از ساختار، نمونه به دست می‌آید.

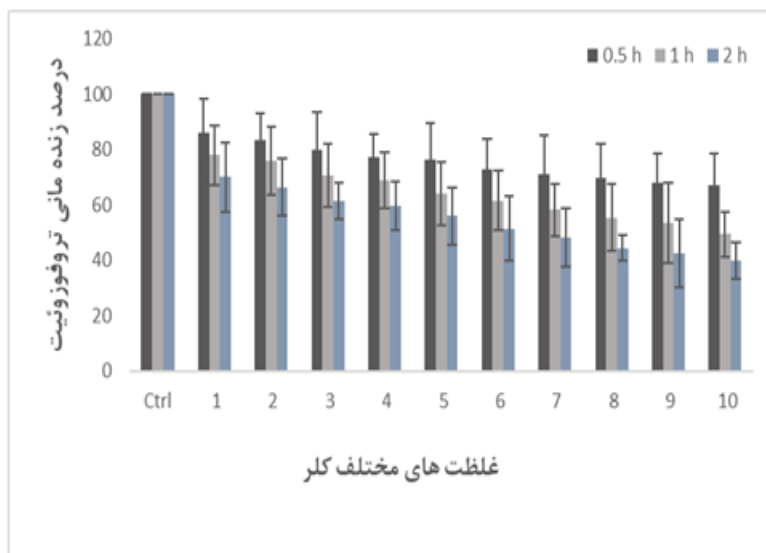
برای بررسی تغییرات فراساختاری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره یا TEM (Transmission electron microscopy) تعداد 10^6 تروفوزوئیت شمارش و به میکروتیوب

منتقل شد و با غلظت انتخابی کلر (۵ ppm) به مدت دو ساعت مواجه گردید. بعد از اتمام زمان گرماگذاری و خارج کردن محلول‌ها، با اضافه کردن گلوآرال‌دئید ۲/۵ درصد سرد به مدت ۲ ساعت، سلول‌ها تثبیت شده و سپس با شستشو با یک پیت پاستور استریل سلول‌ها از دیواره فلاسک جدا شده و به یک فالكون استریل منتقل و به مدت ۷ دقیقه با ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. مایع رویی دور ریخته شد، مجدداً گلوآرال‌دئید ۲/۵ درصد سرد به رسوب اضافه شده و به آرامی پی‌پتینگ کرده و به یک میکروتیوب استریل منتقل گردید و به مدت ۷ دقیقه با ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مشخصات سلول‌ها، تاریخ و نوع ماده فیکس کننده بر روی میکروتیوب درج و به مرکز تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران جهت تهیه بلوک، برش و مقاطع، رنگ‌آمیزی و عکسبرداری ارسال شد.

نتایج و بحث

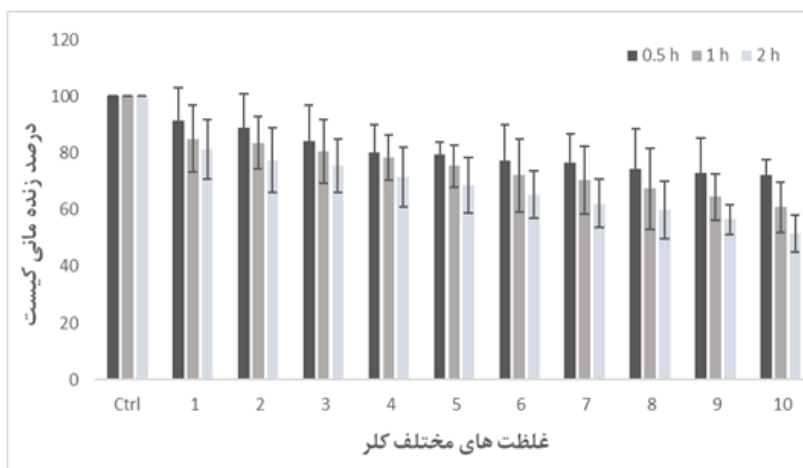
نتایج مواجهی تروفوزوئیت و کیست *A. castellanii* با رقت‌های متداول کلر

همان‌طور که نمودارهای شکل ۱ و ۲ نشان می‌دهد غلظت‌های متداول کلر که به عنوان ضد عفونی کننده استفاده می‌شوند قادر به از بین بردن کامل تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های *A. castellanii* نیست. تروفوزوئت‌های آمیب در نیم، یک و دو ساعت پس از مواجه با کلر با غلظت ۱۰ ppm، به ترتیب ۶۷/۲، ۴۹/۵ و ۳۹/۸ درصد زنده بودند. این در حالیست که کیست‌های *A. castellanii* در نیم، یک و دو ساعت پس از مواجه با کلر با غلظت ۱۰ ppm، به ترتیب ۷۲/۱، ۶۰/۸ و ۵۱/۴ درصد زنده بودند. بنابراین نتایج تست مواجه نشان داد که کیست‌ها مقاوم تر بوده و در زمان و غلظت برابر کلر، درصد کمتری از آن‌ها در مواجه با کلر از بین می‌روند.



شکل ۱- نمودار مواجهه‌ی تروفوزوئیت‌های *A. castellanii* با غلظت‌های مختلف کلر (1-10 ppm) در سه زمان نیم، یک و دو ساعت را نشان می‌دهد. Ctrl: کنترل

Figure 1. The chart shows the exposure of *Acanthamoeba castellanii* trophozoites to different concentrations of calcium hypochlorite (1-10 ppm) in 30 minutes, 1, and 2 hrs.

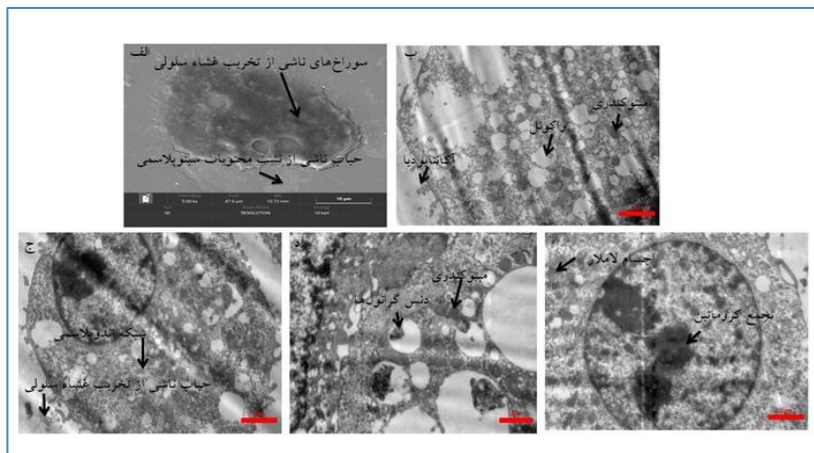


شکل ۲- نمودار مواجهه‌ی کیست‌های *A. castellanii* با غلظت‌های مختلف کلر (1-10 ppm) در سه زمان نیم، یک و دو ساعت را نشان می‌دهد. Ctrl: کنترل

Figure 2. The graph shows the exposure of *Acanthamoeba castellanii* cysts to different concentrations of calcium hypochlorite (1-10 ppm) in 30 minutes, 1, and 2 hrs.

نتایج حاصل از بررسی تغییرات فراساختاری آمیب مواجه یافته با کلر در غلظت ۵ppm با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره و گذاره

در تصاویر حاصل از میکروسکوپ FESEM کاهش اندازه تروفوزوئیت، تغییر شکل سلول و گرد شدن آن مشاهده شد. در تصاویر حاصل از میکروسکوپ TEM بطور دقیق تر برخی از آکانتاپودیها دو شاخه شده و تبدیل به پای کاذب پیژیپودیوم شده بودند. در بررسی فراساختاری مشخص گردید که غشای پلاسمایی سلولهای مواجه شده آسیب دیده است. این آسیبها همراه با نشت محتویات سیتوپلاسمی و حضور حباب بر روی سطح آمیب بود (شکل ۳: الف و ج). تعداد واکوئل‌های سیتوپلاسمی در سلولهای مواجه شده با کلر افزایش یافت (شکل ۳: ب). همچنین در تصاویر حاصل از میکروسکوپ TEM افزایش تعداد میتوکندریها دیده شد (شکل ۳: ب و د). با افزایش تعداد میتوکندریها و از هم گسیختگی آنها اجسام لاملار دیده شد که این امر ممکن است با فرایند تخریب میتوکندری مطابقت داشته باشد (شکل ۳: د). پارگی شبکه اندوپلاسمی در سلولهای مواجه شده و تغییر آنها به وزیکول مشاهده شد (شکل ۳: ج). همچنین ظهور دنس گرانولها احتمال وجود بقایای کلر در واکوئلها را مطرح کرد (شکل ۳: د). از دیگر تغییرات، تغییرات در هسته همراه با تجمع کروماتین بود (شکل ۳: د).



شکل ۳- تغییرات فراساختاری در آمیب مواجه شده با هیپوکلریت کلسیم. الف: نشان دهنده تغییرات غشای سلولی، ایجاد منافذ روی تروفوزوئیت و حضور حباب ناشی از تخریب غشا تروفوزوئیت مواجه شده با کلر با استفاده از میکروسکوپ نگاره (FESEM) است. ب: نشان دهنده افزایش تعداد واکوئل‌ها، تغییرات میتوکندری و کاهش و تغییر در تعداد پاهای کاذب تروفوزوئیت مواجه شده با کلر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) است. ج: نشان دهنده تغییر در ساختار شبکه اندوپلاسمی و حضور حباب ناشی از تخریب غشای سلولی تروفوزوئیت مواجه شده با کلر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره است. د: نشان دهنده وجود دس گرانول‌های ناشی از تغییرات سلولی تروفوزوئیت مواجه شده با کلر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره است. ه: نشان دهنده تغییرات هسته و حضور اجسام لاملار ناشی از تخریب میتوکندری تروفوزوئیت مواجه شده با کلر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره است.

Figure 3. Ultrastructural changes of amoeba exposed to calcium hypochlorite. A: It shows cell membrane changes, the creation of pores on the trophozoite, and bubbles caused by the destruction of the trophozoite membrane exposed to chlorine using a field emission scanning electron microscope (FESEM). B: It shows an increase in the number of vacuoles, changes in mitochondria, and a decrease and change in the number of pseudopods of the trophozoite exposed to chlorine using the transmission electron microscope (TEM). C: It shows the change in the endoplasmic reticulum structure and the presence of bubbles caused by the destruction of the cell membrane of the trophozoite exposed to chlorine using the TEM. D: It shows the presence of dense granules caused by the cellular changes of trophozoites exposed to chlorine using the TEM. E: It shows the changes in the nucleus and the presence of lamellar bodies caused by the destruction of trophozoite mitochondria exposed to chlorine using the TEM.

گونه‌های مختلف *Acanthamoeba*، سبب بیماری‌های قابل توجه، از جمله انسفالیت، ضایعات پوستی و کراتیت چشمی می‌شوند. بیشتر موارد آکانتاموبیاز به صورت کراتیت چشمی است که در افراد سالم استفاده کننده از لنز تماسی نرم گزارش می‌شود. این

عفونت در افراد با ضعف سیستم ایمنی و مبتلایان به بیماری‌های مزمن، ممکن است، موجب ایجاد ضایعات ریوی، پوستی و مغزی شود. آب، یکی از مخازن مهم آمیب‌های آزادزی از جمله *Acanthamoeba* است و آب‌های آلوده می‌توانند یک منبع خطر برای گروه‌های مستعد، مانند افراد استفاده کننده از لنزهای تماسی، افراد دچار ترومای چشم و یا دچار ضعف سیستم ایمنی باشد. علاوه بر این، برخی ارگانسیم‌ها، مانند *Vibrio cholerae* و *Legionella* قادر هستند که داخل این آمیب‌ها رشد و تکثیر داشته باشند که این مسئله نیز از نظر بهداشت عمومی و انتقال بیماری‌ها حائز اهمیت است. در مطالعه‌ی شهنی (۱۳۹۷) از مجموع ۱۰۰ نمونه‌ی آب جمع‌آوری شده از مکان‌های مختلف استان خوزستان (اهواز، آبادان، ماهشهر، مسجدسلیمان، بهبهان، شوشتر، سوسنگرد، باغ‌ملک و دزفول) که شامل کانال‌های کشاورزی، رودخانه‌ها و استخرهای شنا بود در ۵۶٪ آب‌های مورد مطالعه با روش ملکولی آلودگی به *Acanthamoeba* تشخیص داده شد (Eydi Shehni., 2018). در مطالعه‌ای که توسط Eftekhar و همکارانش در سال ۲۰۱۰ انجام گرفت، میزان آنتی‌بادی علیه آمیب *Acanthamoeba* در افراد مبتلا به آرتریت روماتوئید ۵۷ درصد گزارش شد که این یافته شیوع بالای آمیب را در محیط نشان می‌دهد (Eftekhar et al., 2010). در تحقیقی که توسط Mahmoudi و همکاران در سال ۲۰۱۲ روی آب‌های استان گیلان انجام گرفت، میزان شیوع آمیب *Acanthamoeba* ۷۰ درصد گزارش گردید (Mahmoudi et al., 2012). مطالعه‌ی Niyati و همکاران در سال ۲۰۱۲ روی رودخانه‌های اطراف شهر تهران مشخص کرد که ۸۰ درصد آب‌ها آلوده به آمیب *Acanthamoeba* بوده است (Niyati et al., 2012). مطالعه‌ای دیگر توسط Badirzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی ۲۸ نمونه از چشمه آب گرم اردبیل نشان داد که ۴۳ درصد نمونه‌ها آلوده به آمیب *Acanthamoeba* بوده است (Badirzadeh et al., 2011). در مطالعه‌ای که توسط Nazar و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی آب‌های میادین و پارک‌های شهر تهران انجام دادند، میزان شیوع ۳۲ درصد و ۸۷/۵ درصد ژنوتیپ آن‌ها T4 گزارش شد (Nazar et al., 2011). مطالعه‌ی دیگر توسط Bagheri

و همکاران در سال ۲۰۱۰ در آب شیر بیمارستان ایران بر پایه‌ی مطالعه‌ی مورفولوژیکی نشان داد میزان آلودگی آب شیر بیمارستان‌های شهر اهواز ۵۰ درصد است که این موضوع خطر ابتلا در بیمارستان‌ها را نشان داده و بیش‌تر در مورد افراد نقص ایمنی حائز اهمیت است (Bagheri *et al.*, 2010). در مطالعه‌ی Niyyati و همکاران در سال ۲۰۱۲ از میان ۱۰ نمونه آزمایش شده از منابع محیطی مختلف از جمله خاک، آب و مدفوع حیوان، ژنوتیپ غالب T4 گزارش شده است (Niyyati *et al.*, 2012). بنابراین مطالعات مذکور نشان می‌دهد که آب‌های مناطق مختلف آلوده به آمیب *Acanthamoeba* با غالبیت ژنوتیپ T4 است.

کلر به عنوان یک ضدعفونی‌کننده اکسیداتیو به طور گسترده برای ضدعفونی کردن سطوح و حذف بیوفیلم‌ها، در سیستم‌های توزیع آب و به طور عمده در تصفیه‌ی آب آشامیدنی استفاده می‌شود. مکانیسم اثر کلر تولید رادیکال‌های آزاد از جمله رادیکال‌های هیدروکسیل از طریق فرایند فنتون است. رادیکال‌های آزاد ترکیبات به‌شدت واکنش‌پذیر هستند که می‌توانند به ماکرومولکول‌ها آسیب بزنند. هنگامی که تعادل بین آنتی‌اکسیدان‌ها و رادیکال‌های آزاد از بین رود، استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود که در این صورت به بیومولکول‌های حیاتی آسیب وارد می‌گردد. این آسیب‌های برگشت‌ناپذیر منجر به تغییر در عملکرد سلول و یا مرگ سلول می‌شود (Maillard, 2004).

نتایج حاصل از بررسی تغییرات ساختاری و فراساختاری آمیب مواجه یافته با کلر در غلظت ۵ ppm با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره و گذاره نشان داد که تروفوزوئیت مواجه یافته با کلر با کاهش اندازه، تغییر شکل و گرد شدن سلول همراه است. این امکان وجود دارد که از بین بردن قدرت تحرک *A. Castellanii* اولین هدف کلر باشد. همچنین تصاویر نشان داد که تعداد آکانتاپودیاها در آمیب مواجه شده کاهش می‌یابد. آکانتاپودیا در چسبندگی به سطوح و کسب غذا موثر است و تنها در مرحله‌ی تروفوزوئیت آمیب دیده می‌شود. این ساختارها به دلیل اتصال به اپیتلیوم قرنیه در پاتوژن *Acanthamoeba* نقش دارند و برای ایجاد عفونت در انسان ضروری هستند (Khan, 2008). این تغییرات ممکن

است به دلیل اثر تخریب‌کنندگی کلر به واسطه یک مکانیسم فعال با استفاده از تغییر در اکتین رخ دهد که منجر به تخریب پاهای کاذب شود. در مطالعه Fatimah و همکاران (۲۰۱۳) تاثیر کلرگزی‌دین گلوکونات بر *Acanthamoeba* نشان داد که ساختار آکانتاپودی‌ها دچار تغییر شده و تحت تاثیر این ماده تعداد آن‌ها کاهش می‌یابد (Fatimah & Nakisah., 2013). در تصاویر حاصل از میکروسکوپ TEM بطور دقیق‌تر برخی از آکانتاپودی‌ها دوشاخه شده و تبدیل به پای کاذب پیژپودیوم شده بودند. از دیگر آسیب‌های ایجاد شده در سلول مواجه شده با کلر، آسیب غشا پلاسمایی همراه با نشت محتویات سیتوپلاسمی و حضور حباب بر روی سطح آمیب بود. تغییرات غشایی مربوط به هجوم Ca^{+2} یکپارچگی غشا را به خطر می‌اندازد. بیوسیدهای کاتیونی هیپوکلریت کلسیم در غشا سیتوپلاسمی اختلال ایجاد می‌کنند و در pH قلیایی، پروتئین‌های سطحی با بار منفی آمیب با کاتیون‌های بیوسید در تعامل هستند در نتیجه نشت یون‌ها، آب و اجزا سیتوپلاسمی اتفاق می‌افتد و سلول تخریب می‌شود (Korn *et al.*, 1974). از طرف دیگر همان‌طور که پیش از آن اشاره شد مکانیسم اثر کلر تولید ترکیبات رادیکال آزاد است. این ترکیبات به ماکرومولکول‌هایی نظیر لیپیدها آسیب می‌زنند. آسیب ناشی از کلر به لیپیدهای غشای سلولی می‌تواند باعث از بین رفتن یکپارچگی غشا و افزایش نفوذپذیری آن شود. افزایش تعداد میتوکندری از دیگر یافته‌های مطالعه‌ی حاضر بود. میتوکندری در سلول‌های یوکاریوت در زنجیره انتقال الکترون، فعالیت‌های متابولیکی مرتبط با تغذیه، حرکت، تولیدمثل، و تنظیم مرگ سلول دخالت دارد. با افزایش تعداد میتوکندری‌ها و از هم گسیختگی آن‌ها اجسام لاملار دیده می‌شود که این امر ممکن است با فرایند تخریب میتوکندری مطابقت داشته باشد. این احتمال وجود دارد که آسیب به میتوکندری و متلاشی شدن کریستای آن از اهداف دیگر استرس اکسیداتیو ناشی از کلر باشد. همچنین با استفاده از میکروسکوپ TEM تغییرات در هسته همراه با تجمع کروماتین مشاهده شد. شبکه اندوپلاسمی نقش مهمی در برقراری هموستاز کلسیم داخل سلولی دارد (Ferri & Kroemer., 2001). پارگی شبکه‌ی اندوپلاسمی در سلول‌های مواجه شده نیز مشاهده

گردید. افزایش تعداد واکوئل‌ها و مشاهده شدن دنس گرانول‌ها در آن‌ها احتمال وجود بقایای کلر در سلول را می‌دهد.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه نشان داده شد که غلظت‌های متداول مورد استفاده‌ی کلر به‌عنوان ماده‌ی ضدعفونی‌کننده قادر به از بین بردن کامل تروفوزوئیت و کیست‌های است. با این حال تغییرات فراساختاری در سطح سلول تروفوزوئیت آمیب پس از مواجهه با کلر ایجاد می‌شود. این تغییرات عمدتاً شامل تغییرات مورفولوژی سطح سلول و تغییر در ساختار هسته، شبکه اندوپلاسمی، واکوئله شدن و تغییرات در میتوکندری بود. تولید رادیکال‌های آزاد توسط کلر و ایجاد استرس اکسیداتیو منجر به تغییرات در سلول و یا مرگ سلول می‌شود. این مطالعه ضرورت بازنگری دستورالعمل بکارگیری گندزداهایی نظیر کلر را مطرح می‌کند. چرا که علاوه بر بیماری‌زا بودن آمیب، مخزن بودن آن و انتقال عوامل میکروبی و حتی ویروسی نیز حائز اهمیت است.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و امتنان خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که هزینه این تحقیق را در قالب پژوهانه از طریق هزینه کرد پایان‌نامه‌های دانشجویان (پایان‌نامه دکتری تخصصی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز) فراهم نموده‌اند، اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند تعارض منافی در این مقاله وجود ندارد و متعهد می‌شوند که مقاله مستخرج از آنالیزهای مطالعه بوده و در انجام مطالعه و آنالیز اطلاعات صداقت علمی بکارگرفته شده است.

منابع

- Albrich. J.M., Gilbaugh 3rd. J.H., Callahan. K.B. and Hurst J.K. (1986). Effects of the putative neutrophil-generated toxin, hypochlorous acid, on membrane permeability and transport systems of *Escherichia coli*. *The Journal of Clinical Investigation* 78: 177–184.
- Albrich. J.M., Hurst. J.K. (1982). Oxidative inactivation of *Escherichia coli* by hypochlorous acid. Rates and differentiation of respiratory from other reaction sites. *FEBS Letters* 144: 157–161.
- Badirzadeh. A., Niyiyati. M., Babaei. Z., Amini. H., Badirzadeh. H. and Rezaeian. M. (2011). Isolation of free-living amoebae from Sarein hot springs in Ardebil province, Iran. *Iranian Journal of Parasitology* 6(2): 1-8.
- Bagheri. H.R., Shafiei. R., Shafiei. F. and Sajjadi. S.A. (2010). Isolation of *Acanthamoeba* spp. from drinking waters in several hospitals of Iran. *Iranian Journal of Parasitology* 5(2): 19-25.
- Castellani. A. (1930). An amoeba found in cultures of a yeast: preliminary note. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 33:160.
- Dunnick. J.K., Melnick. R.L. (1993). Assessment of the carcinogenic potential of chlorinated water: experimental studies of chlorine, chloramine, and trihalomethanes. *Journal of National Cancer Institut* 85: 817-822.
- Eftekhari. M., Athar. A., Haghghi. A., Mosaffa. N., Shahram. F. and *et al.* (2010). Seroprevalence of *Acanthamoeba* antibodies in rheumatoid arthritis patients by IFAT, Tehran, Iran, 2007. *Iranian Journal of Parasitology* 5(1): 35-40.
- Eydi Shehni. G. (2018). Molecular detection and phylogenetic analysis of *Acanthamoeba* and *Balamuthia* from water resources of Khuzestan province [dissertation]. Ahvaz Iran: Shahid Chamran Unive.
- Fatimah. H., Nakisah. m. (2013). Visualization on the effect of chlorhexidine gluconate, a biocide on *Acanthamoeba* sp by electron microscopy. *Malaysian Journal of Microscopy* 9: 154–159.
- Ferri. K. F., Kroemer. G. (2001). Mitochondria the suicide organelles. *Bioassays* 23: 111-115.
- Heaselgrave. W., Shama. G., Andrew. P.W. and Kong. M.G. (2016). Inactivation of *Acanthamoeba* spp. and other ocular pathogens by application of cold atmospheric gas plasma. *Environmental Microbiology* 82(10):3143-3148.
- Juárez. MM., Tártara L.I., Cid. A.G., Real. J.P., Bermudez. J.M., Rajal. V.B and *et al.* (2018). *Acanthamoeba* in the eye, can the parasite hide even more latest developments on the disease. *Contact Lens & Anterior Eye Journals* 41:245–251.

- Karamati. S.A., Niyiyati. M., Lorenzo-Morales. J. and Lasjerdi. Z. (2016). Isolation and molecular characterization of *Acanthamoeba* genotypes isolated from soil sources of public and recreational areas in Iran. *Acta Parasitologica* 61(4):784-9.
- Khan. N.A. (2008). *Acanthamoeba* and the blood-brain barrier: the breakthrough. *Journal of Medical Microbiology* 57: 1051-1057.
- Korn. E., Dearborn. D. and Wright. P. (1974). Lipophosphoglycan of the plasma membrane of *Acanthamoeba castellanii*. Isolation from whole amoeba and identification of the water-soluble products of acid hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry* 249: 3335- 3341.
- Król-Turmińska. K. and Olender. A. (2017). Human infections caused by free-living amoebae. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 24(2): 254–260.
- Lekkla. A., Sutthikornchai. C., Bovornkitti. S. and Sukthana. Y. (2005). Free-living amoeba contamination in natural hot springs in Thailand, The Southeast Asian. *Journal of Tropical Medicine and Public Health* 36:5.
- Loret. J.F., Greub. G. (2010). Free-living amoebae: biological by-passes in water treatment. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 213:167–175.
- Mahmoudi. M.R., Taghipour. N., Eftekhar. M., Haghghi. A. and Karanis P. (2012). Isolation of *Acanthamoeba* species in surface waters of Gilan province-north of Iran. *The Journal Parasitology Research* 110(1): 473-477.
- Maillard. J.Y. (2004). Principles and practice of disinfection, preservation, and sterilization, 5nded. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication 589Pp. New York NY.
- McKelvie. J., Alshiakhi. M., Ziaei. M. and *et al.* (2018). The rising tide of *Acanthamoeba* keratitis in Auckland, New Zealand: a 7-year review of presentation, diagnosis and outcomes (2009–2016). *Clinical and Experimental Ophthalmology* 46: 600–607.
- Mogoa. E., Bodet. C., Legube. B. and Hechard. Y. (2010). *Acanthamoeba castellanii*: Cellular changes induced by chlorination. *Experimental Parasitology* 126: 97–102.
- Nazar. M., Haghghi. A., Niyiyati. M., Eftekhar. M., Tahvildar Biderouni. F., Taghipour. N. and *et al.* (2011). Genotyping of *Acanthamoeba* isolated from water in recreational areas of Tehran, Iran. *Journal of Water and Health* 9(3): 603-608.
- Neff. R.H. (1962). The biochemistry of amoebic encystment. *Symposia of Society Experimental Biology* 23:51-81.
- Niyiyati. M., Lasjerdi. Z., Nazar. M., Haghghi. A. and Nazemalhosseini Mojarad. E. (2012). Screening of recreational areas of rivers for potentially pathogenic free-living amoebae in the suburbs of Tehran, Iran. *Journal of Water and Health* 10(1): 140-146.

- Niyati. M., Naghahi. A., Behniafar. H. and Lasjerdi. Z. (2018). Occurrence of free-living amoebae in nasal swabs of patients of intensive care unit (ICU) and critical care unit (CCU) and their surrounding environments. *Iranian Journal of Public Health* 4 (6):908.
- Rubin. RW., Hill. MC., Hepworth. P. and Boehmer. J. (1976). Isolation and electrophoretic analysis of nucleoli, phenol-soluble nuclear proteins, and outer cyst walls from *Acanthamoeba castellanii* during encystation initiation. *Journal of Cell Biology* 68:740-751.
- Thomas. V., McDonnell. G., Denyer. SP. and Maillard. J.Y. (2010). Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiology Reviews* 34(3):231-59.
- Weisman. R.A. (1976). Differentiation in *Acanthamoeba castellanii*. *Annual Review Microbiology* 30:189-219.
- Zarei. M., Ghahfarokhi. ME., Fazlara. A. and Bahrami. S. (2019). Effect of the bacterial growth phase and coculture conditions on the interaction of *Acanthamoeba castellanii* with *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, and *Shigella sonnei*. *Journal of Basic Microbiology* 59(7): 735-743.

Effect of chlorine on survival and ultrastructural changes of *Acanthamoeba castellanii*

Z. Asadi¹, S. Bahrami^{2*}, M. Zarei³, H. Hamidinejat¹

Received: 2022.8.3

Accepted: 2022.10.4

Abstract

Introduction: Chlorine is an effective disinfection agent to kill pathogenic microorganisms in the municipal water treatment system. However, despite treatment, studies have shown that *Acanthamoeba* is isolated from different water sources in Iran. In this study, the effect of standard concentrations of chlorine used in urban water treatment systems was evaluated on the survival of *Acanthamoeba castellanii* and its ultrastructure. **Materials and methods:** *Acanthamoeba* trophozoites and cysts were exposed to different concentrations (1-10 ppm) of calcium hypochlorite at different times (30 minutes, 1 and 2 hours). Field emission scanning electron microscopy (FESEM) and transmission electron microscopy (TEM) were used to study the ultrastructural changes of amoebic trophozoite. **Results:** This study showed that conventional chlorine concentrations could not completely eliminate *A. castellanii* trophozoites and cysts. Cysts were more resistant to different chlorine concentrations and compared to trophozoites, fewer cysts were killed at the same chlorine concentration and exposure time. Alteration of the cell membrane permeability, decrease in the number of pseudopodia, increase in mitochondria, vacuolation of the cytoplasm, and changes in the endoplasmic reticulum were the main ultrastructural changes in the chlorine-treated amoeba. **Conclusion:** This study showed that standard chlorine concentrations used as a disinfectant could not eliminate the trophozoites and cysts of *A. castellanii*. Due to the pathogenicity of the amoeba and its role as the reservoir and transmission of microbial agents, revising the guidelines for using disinfectants such as chlorine in the treatment of urban water systems is highlighted by this study.

Keywords: *Acanthamoeba castellanii*, Chlorine, Survival, Ultrastructural changes.

1. Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

2. Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. (*Corresponding author: s.bahrami@scu.ac.ir)

3. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.