Evaluation of a Simple Method for Detection of Cysts and Oocysts in Drinking Water

Fallah, M., Assoc. Prof., Dept. of Parasitology, Hamadan University of Medical Sciences.
Mobedi, I., Assoc. Prof., Dept. of Parasitology, Tehran University of Medical Sciences.
Habibi, J., Hamadan University of Medical, Sciences. Pharmaco. Manegement Affairs.

Abstract

The Polluted drinking water is a possible source of human infection in the community level in the regions with high prevalence of intestinal parasites, particularly protozoan organisms. The pathogenic protozoa of primary concern in drinking water and wastewater are *Giardia lamblia, Entamoeba histolytica, Cryptosporidium parvum and Balantidium coli*. These organisms cause diarrhoea of gastroentritis of varying severity, and waterborne outbreaks have been contributed to each agent. Although methods for detecting cysts in water have been available since 1974, no comparative studies of method efficiency, precision, or sensitivity have been reported with variety of water sources under different conditions.

A modification of the method described here has been used to detect cysts in tap water. The recovery efficiency of the procedure was evaluated by spiking 40 L samples with known concentrations of cysts, oocysts and ova. Therefore, evaluation of a simple system with accessible materials and examination of the drinking water of city were the two main objectives of this study.

Efficiency of the system for detecting cyst and oocyst and Ascaris ova were 77% and 82% respectively. The protozoa cysts were found in two storage reservoirs of water that distributes the water to houses. Giardia cyst were detected in samples of one and Cryptosporidium oocyst were detected in samples of two reservoirs. Also, the cyst of one non - pathogenic amoebe (Entamoeba coli) was found in the same storage reservoir.

Presence of other organisms like algae, indicates the lack of efficient filteration / disinfection system or, perhaps secondary contamination in the distribution network in the old areas of the city that requires a comprehensive survey.

ارزیابی یک روش ساده
برای جست و جوی کیست و اواوسیست
تک یاخته‌ها و تخم‌کرم‌ها در آب آشامیدنی شهری

محمد فلاح* ایرج موبدی** جواد حبیبی***

چکیده

بررسی آب از نظر آلودگی انگلی کار دشواری است و انجام آن به ابزار و لوازم پیچیده‌ای جهت فیلتراسیون حدود ۴۰۰لیتر از هر نمونه آب نیازمند است. یکی از دلایل این شیوع زیاد انگل‌های روده‌ای به ویژه انگل‌های منتقله از آب که در تعدادی از محلات یک شهر احتمال داده می‌شود، آلودگی آب آشامیدنی به کیست تک یاخته‌ها یا تخم‌کرم‌ها می‌باشد.

در این مطالعه بدون استفاده از پمپ الکتریکی و به کمک فشار مثبت آب و سیستم فیلتراسیون غشایی که با امکانات موجود آماده شد، با افزودن دستی تعداد مشخصی کیست و اواوسیست تک یاخته‌ها و تخم‌کرم به حجم معینی آب و فیلتراسیون آن و سپس جست وجو و شمارش کیست‌ها و تخم‌کرم‌های گیر کرده در فیلتر، کارایی سیستم، ارزیابی و مشخص شد که سیستم بیش از ۸۰٪ در جداسازی این ذرات کارایی دارد.

با این ابزار و روش در سال ۱۳۷۶ آب آشامیدنی شهر با نمونه‌برداری سریال از ۷ نقطه که از ۷ مخزن توزیع آب تغذیه می‌شدند، مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج بررسی مواد حاصل از فیلتراسیون، وجود کیست ژیاردیا و اواوسیست کریپتوسپوریدیوم را در نمونه‌های آب دو مخزن نشان داد و آلودگی به یک آمیب غیر بیماری‌زا (انتامیبا کلی) در یک نمونه دیگر مشاهده شد.

این تحقیق احتمال عدم کارایی سیستم تصفیه آب شهر در حذف برخی عناصر انگلی و یا احتمال وجود نقص در شبکه توزیع آب و آلودگی ثانویه آن را نشان می‌دهد. همچنین با این ابزار و روش، آب‌هایی را که دارای فشار مثبت هستند می‌توان از نظر احتمال آلودگی انگلی بررسی کرد.

---

* دانشیار گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

** دانشیار گروه انگل‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

*** مدیریت امور دارویی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان

مقدمه

آب، عمومی‌ترین ماده مصرفی انسان است. کیفیت آب آشامیدنی نقش مهمی در سلامت مردم جوامع دارد [۳]. بسیاری از عناصر بیماری‌زا ممکن است از طریق مدفوع در آب آشامیدنی ریخته شده و منجر به بیماری انسان گردند [۴]. آغشتگی به مدفوع می‌تواند انواع مختلفی از اجرام بیماری‌زا اعم از باکتری، ویروس و انگل را از طریق ناقلین سالم یا بیماران وارد آب نماید. شناخت عفونت‌های باکتریایی که از طریق آب منتقل می‌گردد و همچنین کسب اطمینان نسبت به عدم وجود آلودگی مدفوعی در آب مصرفی انسان، منجر به طراحی روش‌های معمول آزمایش آب شده است [۱۵]. جستجو و شمارش کلیفرم‌ها[1] روش رایج ارزیابی احتمال آلودگی آب می‌باشد [۲]. این روش، آسان و در شرایط مختلف قابل استفاده است لکن نمی‌تواند وجود آلودگی انگلی را نشان دهد.

اساساً جست و جوی انگل‌ها مثل کیست[2] تک یاخته‌ها در آب به ویژه آب آشامیدنی دشوار است و ابزار خاصی نیاز دارد [۲]. به علت فقدان چنین ابزاری در داخل کشور، سیستم ساده‌ای برای آزمایش آب لوله کشی شهر با تکیه بر اصول فیلتراسیون آب [۵] آماده و کارایی آن در جداسازی کیست یا اواوسیست[3] تک یاخته‌ها در آب لوله کشی ارزیابی شد. نظر به شیوع بالای انگل‌های روده‌ای در شهر و احتمال آلودگی آب آشامیدنی، در این تحقیق آب آشامیدنی شهر از نظر آلودگی به ویژه به انگل‌های منتقله از آب مورد بررسی قرار گرفت و چون ابزار مورد استفاده در این تحقیق توسط محققین و با استفاده از امکانات موجود و در دسترس، طراحی و تنظیم شده بود، کارایی این سیستم تنظیمی در جداسازی انگل‌ها از آب مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

روشی که معمولاً برای جست و جوی ژیاردیا، کریپتوسپوریدیوم و غیره در آب به‌کار می‌رود استفاده از یک فیلتر با منفذ دو میکرونی در یک دستگاه خاص و پمپاژ بیش از ۳۸۰ لیتر از هر نمونه آب از میان آن است که توسط U.S.EPA، APHA[4] توصیه شده است [۲].

خردکردن و شستن فیلتر، سپس سانتریفوژ و رنگ‌آمیزی مواد جمع‌آوری شده، روند را تکمیل می‌کند. در این روش ضمن این‌که به سانتریفوژ بزرگی نیاز است مرحله تغلیظ نسبتاً پیچیده بوده و می‌تواند منجر به تخریب و از دست دادن کیست‌ها شود.

بر اساس اصول فیلتراسیون موجود [۵] سیستم ساده‌ای آماده و در آن برای فیلتراسیون آب از یک فیلتر غشایی (کاغذی)[5] با منافذ ۰/۴۵ میکرون برای عبور و صاف کردن آب شیر استفاده شد. فیلتر در داخل یک نگهدارنده فیلتر از جنس فولاد زنگ‌نزن تعبیه شد که توسط یک سنگ متخلخل با منافذ بسیار ریز حمایت می‌شد. این مجموعه از یک طرف، محکم به شیر آب بسته شد (با یک لوله لاستیکی و بست) و از طرف دیگر داخل یک ظرف با گنجایش معین قرار داده شد تا مقدار آب صاف شده اندازه‌گیری شود. آب به آهستگی و به کمک فشار مثبت موجود در شیر از میان فیلتر عبور داده می‌شد تا از هر مخزن حدود ۴۰۰ لیتر آب صاف شود. لازم به ذکر است هرگاه صافی کاغذی مسدود می‌شد آن را خارج کرده و با صافی نو جایگزین می‌شد.

مواد جمع‌آوری شده روی صافی به‌کمک یک قلم موی ظریف و با استفاده از سرم فیزیولوژی به دقت درون ظرف پتری شسته می‌شد. سپس درون لوله‌های بزرگ سانتریفوژ ریخته شده و سانتریفوژ می‌گردید (۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰). بعد مایع رویی دور ریخته شده و مواد تغلیظ شده در ته لوله به روی لام‌های شیشه‌ای منتقل و ابتدا مانند یک گسترش مرطوب مدفوع از نظر تخم کرم و کیست تک یاخته‌ها آزمایش شده و سپس گسترش روی لام تهیه می‌شد و با روش اسیدفست[6] اصلاح شده، رنگ آمیزی و از نظر وجود اواوسیست کریپتوسپوریدیوم مورد آزمایش قرار می‌گرفت [۱].

لازم به ذکر است که این دستگاه قبل از مطالعه آب شهر

1- Coliforms
2- Cyst
3- Oocyst
4- U.S.EPA , APHA = United States Environmental Protection Agency and American Public Health Association, 1990
5- Gelman Sciences Membrane, Pat. No.4, 160, 700
6- Acid Fast

جدول ۱ - نتایج آزمایش‌های آب آشامیدنی از نظر آلودگی انگلی

نام مخزن	منشاء آب	نتیجه آزمایش	
		مطالعه گسترش مرطوب	رنگ آمیزی با MZN[1]
مخزن شماره یک	سد	تک یاخته مژه‌دار، اسپور قارچ	–
مخزن شماره دو	از مخزن شماره ۱	کیست ژیاردیا، کیست آمیب، تک یاخته مژه‌دار، اسپورقارچ	اواوسیست کریپتوسپوریدیوم
مخزن شماره سه	از مخزن شماره ۵	–	–
مخزن شماره چهار	از مخزن شماره ۵	–	–
مخزن شماره پنج	چاه‌های منطقه حومه	–	–
مخزن شماره شش	از مخزن شماره ۴	–	–
مخزن شماره هفت	چاه‌های منطقه گورستان	–	اواوسیست کریپتوسپوریدیوم

آزمایش شد. بدین صورت که تعداد معینی تخم آسکاریس، کیست ژیاردیا و اواوسیست به طور دستی به حجم معینی آب اضافه شد و پس از عبور از دستگاه، عناصر انگلی باز یافت شده مجدداً شمارش و بدین ترتیب کارایی آن با تکرار آزمایش ارزیابی شد. میانگین عناصر انگلی بازیافت شده بر روی فیلتر در دفعات مختلف آزمایش، به عنوان میزان کارایی مجموعه تلقی گردید.

نتایج

از ۷ مخزن آب آشامیدنی آزمایش شده شهر در ۵ مخزن هیچ‌گونه عنصر انگلی مشاهده نشد لکن اواوسیست کریپتوسپوریدیوم در دو مخزن و کیست ژیاردیا در یک مخزن یافت شد. برخی از شاخص‌های دیگر آلودگی مثل جلبک در سه مخزن مشاهده شد ضمن آن‌که کیست آمیب غیر بیماری‌زا (انتامیبا کلی)[2] نیز در یک مخزن وجود داشت که می‌تواند نشانه آلودگی مدفوعی آب باشد. نمونه‌های جدا شده از ۷ مخزن و مشخصات این مخازن در جدول ۱ ارائه شده است.

در این مطالعه کارایی دستگاه تنظیمی نیز در آزمایشگاه بررسی و قابلیت آن در تصفیه عناصر انگلی موجود در آب به میزان مطلوب مشاهده شد. با دفعات متوالی تست، حدود ۸۲٪ تخم آسکاریس[3] افزوده شده به آب مجدداً با فیلتر جمع‌آوری و شمارش شد. میزان بازیافت کمی کیست و اواوسیست‌ها حدود ۷۷٪ و بازیافت کیفی آن‌ها ۱۰۰٪ بود. به طور میانگین کارایی دستگاه در جمع‌آوری عناصر اضافه شده معین به آب حدود ۸۰٪ بود یعنی در هر نوبت تست، تخم کرم یا کیست تک‌یاخته یافت شد (کارایی کیفی ۱۰۰٪) لکن میانگین تعداد تخم کرم یا کیست تک یاخته بازیافتی در کل تست‌ها ۸۰٪ بود (کارایی کمی).

بحث

از تک یاخته‌های پاتوژن انسان ۴ تا می‌تواند توسط آب منتقل شود که عبارتند از: انتامیبا هیستولیتیکا،[4] ژیاردیا[5]، کریپتوسپوریدیوم[6] و بالانتیدیوم کولی[7] [۳، ۵، ۹، ۱۱، ۱۲ و ۱۷].

چون انسان مخزن اصلی عفونت آمیب هیستولیتیکا است آلودگی منابع آب با فاضلاب شهری می‌تواند منجر به انتقال این ارگانیزم از طریق آب گردد. انتقال ژیاردیازیس و کریپتوسپوریدیوزیس از طریق آب، نخست از آمریکا گزارش شد [۴]. بیشتر همه‌گیری‌ها با آب آشامیدنی تصفیه نشده یا آبی که فقط ضد عفونی می‌شد همراه بوده است [۴].

نشان داده شده که دز آلوده‌کننده کم بوده و ۱۰ کیست تجویز شده در کپسول ژلاتینی باعث آلودگی انسان شده است [۱۵]. اطلاعات ما در باره میزان بقای ارگانیزم در محیط و

1- MZN : Modified Zeihl Neelson (Acid Fast Staining)
2- Entamoeba coli
3- Ascaris
4- Entamoeba histolytica
5- Giardia lamblia
6- Cryptosporidum
7- Balantidium coli

مقاومت آن در مقابل مواد ضد عفونی در حال حاضر کامل نیست [۱۴]. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد درصد کمی از کیست‌ها می‌توانند در درجه انجماد زنده بمانند و نیز در آب آشامیدنی تا ۷۷ روز در دمای ۱۰درجه سانتی‌گراد زنده می‌مانند [۳]. با توجه به انتشار ژیاردیا در انسان در طیف گسترده‌ای از حیوانات اهلی و وحشی و از این نظر که انتشار ژیاردیا ممکن است (آن‌گونه که قبلاً تصور می‌شد) تنها به انسان اختصاص نداشته باشد احتمالاً در بین چهار ارگانیزم مورد اشاره اهمیت زیادی در انتقال از طریق آب دارد [۵، ۱۲ و ۱۳]. در سال ۱۹۸۳ در آمریکا ژیاردیا عامل ۶۸٪ همه گیری‌های اسهال ناشی از آب که یک عامل اتیولوژیک برای آن تشخیص داده شد بوده است.

در آمریکا، در کارولتون جورجیا، در سال ۱۹۸۷ کریپتوسپوریدیوم حدود ۱۳۰۰۰ نفر را مبتلا کرده است [۶]. این تک یاخته به طور گسترده در منابع آب آمریکا وجود دارد [۸، ۹ و ۱۷]. اواوسیست در یک غلظت متوسط ۴۳ عدد در صد لیتر آب در ۵۵٪ نمونه‌های جمع‌آوری شده از آب‌های سطحی و چشمه‌ها و یک عدد در ۱۰۰ لیتر در ۱۷٪ نمونه‌های آب آشامیدنی یافت شده است [۱۶]. در مقایسه، یک میانگین ۳ کیست ژیاردیا در ۱۰۰ لیتر در ۱۶٪ برخی از نمونه‌های آب آشامیدنی یافت شده و در برخی دیگر نیز یافت نشده است.

بزرگترین همه گیری کریپتوسپوریدیوم که ناشی از آب بوده در سال ۱۹۹۴ در میلواکی آمریکا رخ داد که در آن بیش از ۴۰۰۰۰۰ نفر مبتلا شدند و بررسی‌ها نشان داد که آب مصرفی شهر به اواوسیست تک یاخته از طریق سیستم فاضلاب آلوده شده است [۱۹].

اواوسیست‌ها و کیست‌های شناسایی شده در آب ممکن است زنده نباشد و با روش‌های رایج، ارزیابی زنده بودن آن مقدور نیست [۱۵].

گرچه تصور می‌شود دز عفونت‌زا پایین باشد تعداد ارگانیزم در بیشتر شبکه‌های آب ممکن است آن‌قدر بالا نباشد که باعث ایجاد عفونت در مردم گردد [۳]. تک یاخته‌های منتقله از آب که توسط تک یاخته‌ها و با دز پایین‌تر باعث عفونت می‌شوند در مقابل مواد ضد عفونی بسیار مقاوم‌تر هستند. آلوده بودن آب با تک یاخته‌ها لزوماً با جست و جوی کلیفرم‌ها کشف نمی‌شود. علاوه بر مخازن انسانی، حیوانات اهلی و وحشی منابع مهم و واسط عفونت توسط این تک‌یاخته‌ها و دیگر عوامل اتیولوژیک شناخته شده هستند. اخیراً مطالعات زیادی در باره انتشار کریپتوسپوریدیوم در محیط و روش‌های تصفیه برای حذف یا غیر فعال‌سازی اواوسیست از منابع آب انجام شده است [۷، ۱۰ و ۱۱].

علت همه گیری احتمالاً می‌تواند سیستم آب شهر باشد که به طور عمده از منابع آب‌های سطحی محلی با یک تصفیه سریع و غیر مؤثر استفاده می‌شده است.

آب‌های سطحی را احتمالاً با تصفیه به تنهایی نمی‌توان عاری از اواوسیست کرد و سطح قابل قبول اواوسیست که بهداشت جامعه از آلوده شدن در امان بماند باید پیشنهاد شود. اخیراً در مطالعه‌ای در ۶۶ منبع آب سطحی کریپتوسپوریدیوم در ۲۷٪ نمونه‌های آب تصفیه شده نشان داده است [۱۸]. سرانجام شیوه‌های مؤثر ضد عفونی و پارامترهای عملی برای حداقل سطح حذف این عناصر باید طراحی شود و علاوه بر مخازن انسانی، حیوانات اهلی و وحشی منابع اولیه یا واسط عفونت بااین تک یاخته‌ها و دیگر عوامل اتیولوژیک که جدیداً کشف شده مورد توجه قرار گیرد. با حفظ سایر موانع اضافی، تصفیه و ضد عفونی برای ایجاد یک حاشیه اطمینان مناسب از سلامت سیستم‌های آب سطحی ضروری است. کلرزنی ممکن است اقدام نهایی باشد لکن نباید تنها مانع بر علیه پاتوژن‌های منتقله از آب باشد.

تصفیه‌خانه‌های طراحی شده مناسب می‌توانند با حذف ذرات، ضد عفونی را مؤثرتر نمایند. بالاخره بازدید و نوسازی شبکه توزیع، به ویژه در شهرها و مناطق قدیمی که دچار پوسیدگی یا شکستگی می‌شوند و آلودگی ثانویه آب را موجب می‌گردند، می‌تواند از وقوع آلودگی و حتی همه گیری‌های ناشی از برخی انگل‌های روده‌ای جلوگیری نماید.

سپاسگزاری

بدینوسیله از جناب آقای مهندس علی‌رضا رحمانی به خاطر کمک‌های فنی ارزشمند و آقای مهندس رضوی و خانم حبیبی به خاطر مساعدت‌های لازم در انجام تحقیق سپاسگزاری می‌شود.

منابع و مراجع

۱- فلاح، م. (۱۳۷۰)، "تشخیص آزمایشگاهی کریپتوسپوریدیم و کریپتوسپوریدیوزیس"، مجله پزشکی ارومیه، سال دوم، شماره ۴ و ۵، صفحات ۳۶-۲۴.

2- Clesceri, L.S., Greeberg, A.E., and Rhodes Trussell, R. (1990). " *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* ", 17th. ed. Washington, APHA.

3- W.H.O. (1996). " *Guidelines for Drinking Water Quality,* " World Health Organization, Volume 2, Geneva, Switzerland. PP. 52-81.

4- Craun, G.F. (1992). " *Waterborne Disease Outbreaks in the United States of America: Causes and Prevention* ," World Health Statistics Quarterly. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 45 : 192 - 200.

5- Jakubowski, W. (1983). " *Detection of Giardia Cysts in Drinking Water,* " In: Erlandson, L & Meyer, E.A. (eds.): Giardia and Giardiasis, Plenum Press, New York.

6- Hayes, E.B., et al. (1989). " *Large Community Outbreak of Cryptosporidiosis Due to Contamination of Filtered Public Water Supply* ", The New England Journal of Medicine, 320 : 1372-1376.

7- Leland, D., et al. (1993). " *A Cryptosporidiosis Outbreak in a Filtered - Water Supply* ", Journal of Water Works Association, 85 (1): 34-42.

8- Richardson, A.J., et al. (1991). " *An Outbreak of Waterborne Cryptosporidiosis in Swindon and Oxfordshire,* " Epidemiol. Infec., 107 : 885.

9- Smith, H., and Rose, J. (1990). " *Waterborne Cryptosporidiosis,* " Parasitology Today, Vol. 6, No. 8.

10- Rose, J.B., et al. (1986). " *Detection of Cryptosporidium from Water and Freshwater Environment,* " Water Sci. & Tech., 18: 233.

11- Musial, C.E., et al. (1987). " *Detection of Cryptosporidium in Water Using Polypropylene Cartridge Filters,* " Appl. & Envir. Microbiol., 53:687.

12- Schulz, S., and Kroger, A. (1992). " *Soil Contamination with Ascaris Lumbricoides Egg as an Indicator of Environmental Hygiene in Urban Area of North East Brazil,* " J. Trop. Med. Hyg., 95: 95-103.

13- Rendtorff, R.C. (1979). " *The Experimental Transmission of Giardia Lamblia Among Volunteer Subjects,* " In : Jakubowski, W., & Hoff, J.C. (eds.). " *Waterborne Transmission of Giardiasis* ", Cincinnati, U.S. Environmental Protection Agency.

14- Bingham, A.K., et al. (1979). " *Giardia spp. : Physical Factors of Excystation in Vitro, and Excystation vs. Eosin Inclusion as Determinants of Viability,* " Experimental Parasitology, 47 : 284-291.

15- Pontius, F.K. (1990). " *Water Quality and Treatment,* " 4th ed., McGrow - Hill, New York, p.74.

16- Rose, J.B. (1991). " *Survey of Potable Water Supplies for Cryptosporidium and Giardia,* " Environmental Science and Technology, 25 (8): 1393-1400.

17- LeChevallier, M.W. (1991). " *Giardia and Cryptosporidium spp. in Filtered Drinking Water,* " Appl. & Envir. Microbiol., 57 : 2617.

18- Hastie, J.C., Kelly, P.J., and Blown, T.J. (1992). " *Concentrating Giardia Cysts in Water by Tangential Flow Filtration Compared with Centrifugation,* " New Zealand J. of Marine and Freshwater Research, 26: 275-278.

19- Mac Kenzie, W.R., et al. (1994). " *A Massive Outbreak in Milwaukee of Cryptosporidium Infection Transmitted Through the Public Water Supply,* " New England Journal of Medicine, 331 (3) : 161 - 167.