# الآية

## قال الله تعالى:

## بسم الله الرحمن الرحيم

أُولَى ْ يَرَ الْإِنسَانُ أَنَا خَلَقْنَاهُ مِن نُطْفَةٍ فَإِذَا هُو خَصِيمٌ مُّبِينٌ (٧٧) وَضَرَبَ لَنَا مَثَلًا وَنَسِيَ خَلْقَهُ قَالَ مَن يُحْيِي الْعِطَامِ وَهِي رَهِيمٌ (٧٨) قُلْ يُحْيِيهَا الَّذِي أَنشَأَهَا أَوَّلَ مَرَّةٍ وَهُوَ بِكُلِّ خَلْقٍ عَلِيمٌ (٧٨) الَّذِي جَعَلَ لَكُم الْعِطَامِ وَهِي رَهِيمٌ (٧٨) قُلْ يُحْيِيهَا الَّذِي أَنشَأَهَا أَوَّلَ مَرَّةٍ وَهُوَ بِكُلِّ خَلْقٍ عَلِيمٌ (٧٨) الَّذِي جَعَلَ لَكُم مِن الشَّجَرِ اللَّخْضِ فَارًا فَإِذَا أَنشَر مِنْهُ نُوقِدُونَ (٨٠) أَوَلَيْسَ الَّذِي خَلَقَ السَّمَا وَاتِ وَاللَّوْضَ بِقَادِرٍ عَلَى أَن يَعْلَ الشَّمَا وَاتِ وَاللَّوْضَ بِقَادِرٍ عَلَى أَن يَعْلَى أَن يَعْلِ اللَّهُ مَن الشَّجَرِ اللَّا فَالْ الْعَلِيمُ (٨١) إِنَمَا أَوْنُهُ إِذَا أَرَادَ شَيْئًا أَن يَقُولَ لَهُ كُن فَيْكُونُ (٨٢) فَسُبْحَانَ يَخْلُقَ مِثْلَهُم بَلَى وَهُوَ الْخَلَّاقُ الْعَلِيمُ (٨١) إِنَمَا أَوْنُهُ إِذَا أَرَادَ شَيْئًا أَن يَقُولَ لَهُ كُن فَيْكُونُ (٨٢) فَسُبْحَانَ اللَّذِي بِيَدِهِ مَلَكُوتُ كُلِّ شَيْءٍ وَإِلَيْهِ نُوجَعُونَ (٨٣)

صدق الله العظيم سورة يس من الآية رقم 77 الى الآية رقم 83

### **Dedication**

To my parents

To my wife

To my daughters

To my son

To my sisters and brothers

To my friends

To my neighbours

I dedicate this work

### **Acknowledgements**

I wish to acknowledge here the invaluable encouragment, assistance and critical appreisal of this project given by Doctor Mohamed Eltayeb Ahmed.

The successful and meaningful completion of this project would not have been possible without the valuable suggestion, guidance and tireless editing of Dr. Init Ithoi.

I would like to thank Mr. Tan for his enthusiastic support.

I would like to thank also Mr. Rama Chandran, Miss. Nurulhuda Ismail, Miss. Chan li li

and the staff of the department of Parasitology, University

Malaya.

#### **Abstract**

This study was carried out in Malaysian environment to investigate the presence and the molecular characterization of *Acanthamoeba*.

A total of 80 samples were collected from University Malaya environment sources, lakes, dust, sewages and air condition. All samples were cultured on non nutrient agar spread with E. coli lawn, then tested microscopically, only 14 samples were positive for *Acanthamoeba* while another 66 were negative. The morphology of cysts and trophozoites of these 14 Acanthamoeba isolates were detected by Trichrome and Modified Field stain respectively. The cysts were stained red with spherical or wrinkled outer wall, while the trophozoites appeared blue with or without acanthopodia. Furthermore, these 14 positive samples were used for DNA extraction and purification by Advanced silica-gel-membrane technology. The purified DNA was used in Polymerase Chain Reaction (PCR) with primers, forward ACARNA.for1383 (TCCCCTAGCAGCTTGTG) and reverse ACARNA.rev1655 (GTTAAGGTCTCGTTCGTTA), ACARNA.for1345 ( CGC GAG GGC GGT TTA ) and ACARNA.rev1830 (GCT GGC TAG GCG CGC AG ) to detect the genus and pathogenicity respectively. Out of these 80 isolates tested, 14 produced 272 bp.for the genus and many different sizes for the pathogenicity. These PCR product seemed to be similar with the result reported by Michael H. et al., (1992) which showed Acanthamoeba genus and it's pathogenicity. The third primers were forward primer ACA18.for 2209 (CGGGCTTGTGAGGTCTC) and reverse primer ACA58.rev 92 (GATGATTCACTGATCCCTG) were used to detect the species of Acanthamoeba. The 14 positive isolates for Acanthamoeba were divided into three species, Eight isolates were categorised as A. Castellani, Three isolates were categorised as *Acanthamoeba* spp Lb. and three isolates were categorised as *Acanthamoeba* spp. Gc.

#### مستخلص الدراسة

أجريت هذه الدراسة في دولة ماليزيا بغرض التعرف والتوصيف الجزيئي للأميبا الشوكية وذلك في الفترة من نوفمبر 2002 وحتى نوفمبر 2005.

تم جمع عدد 80 عينة من 4 مصادر بيئية مختلفة من جامعة الملايا شملت مجاري المياه ، البحيرات ، الغبار وأجهزة التكييف. عولجت كل العينات بزراعتها على وسط غير مغذي مضاف له الأيشريكية الكولونية ومن ثم خضعت لفحص مجهري بواسطة المجهر المقلوب حيث إتضح ان عدد العينات التي تحتوي على الأميية الشوكية 14 عينة فقط. وللتعرف على الخصائص الشكلية لهذه الأمييا ، تم إستخدام صبغ الترايكروم والتيبان الازرق وصبغة فيلد المحسنة حيث ظهر الطور الكيسي لهذه الأمييا بلون أحمر مع جدار خارجي كروي الشكل أو ذات حواف غير منتظمة بينما بدأ الطور النشط بلون أزرق مع أو بدون أقدام كاذبة. إضافة الى ذلك فقد تم إستخلاص الحمض النووي لهذه العينات بغرض إستخدامه في تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي (CPR) وذلك لتحديد أنواع هذه الأمييا وما إذا كانت ممرضة أم لا. كشفت نتيجة التفاعل البلمري التسلسلي ان 14 عينة أعطت نتيجة مشابهة لتلك التي حصل عليها (مايكل واخرين 1992) مما يعني أنها تنتمي إلي الامييا الشوكية منها تسعة أنواع ممرضة بينما الخمسة المتبقية غير ممرضة.

#### LIST OF CONTENTS

LIST OF CONTE	1	T
NO	SUBJECT	PAGE NO
0		T
Quran		I
Dedication		II
Acknowledgments		III
Abstract (English)		IV
Abstract (Arabic)		V
List of Contents		VI
List of Tables		VII
	CHAPTER ONE	
4.0		
1.0	Introduction	1
1.1	Overview	1
1.2	Taxonomy	2
1.3	Morphology	4
1.4	Life cycle	5
1.5	Epidemiology	7
1.6	Occurrence in human environment	8
1.7	Pathogenesis	11
1.8	cutaneous Acanthamoebiasis	15
1.9	Signs and symptoms	16
1.10	Immunology	17
1.11	Diagnosis	20
1.12	Molecular methods	22
1.13	Cultivation	23
1.14	Treatment	23
1.15	Prevention and control	25
Rationale		27
Objective		27
General objective		27
Specific objectives		27
~Peerre onjectives	CHAPTER TWO	ı <b>-</b> '
Materials and methods		28
2.1	Study design	28
2.2	Study area	28
2.3	Preparation of Acanthamoeba	28
	media	
2.3.1	Nutrient agar and <i>E. coli</i> culture	28
	- ,	1

0.2.0	BT 4 * 4	20
2.3.2	Non-nutrient agar	28
2.3.3	Preparation of non-nutrient agar	28
	with E. coli lawn	
2.4	Collection of samples	29
2.4.1	Air conditioner exposure	29
2.4.2	<b>Dusty air exposure</b>	29
2.4.3	Water and sewage	29
2.5	Preparation of samples and	29
	cultivation	
2.6	<b>Detection of amoebae</b>	30
2.7	Sub cultivation of amoebae	30
2.8	Collection of Acanthamoeba	30
2.9	Staining	31
2.9.1	Unstained preparation	31
2.9.2	Trypan blue stain	31
2.9.3	Modified Field`s stain	31
2.9.4	Trichrome stain	32
2.10		32
2.10	Acanthamoeba spp. Genomic DNA	32
	extraction	
2.11	Primers	33
2.12	Positive control	34
2.13	Polymerase Chain Reaction (PCR)	34
	amplification	
2.13.1	Agarose gel	35
2.14	Restriction Fragment Length	35
	Polymorphism	
2.14.1	Electrophoresis and analysis	36
	CHAPTER THREE	
3.0	Result	37
3.1	Microscopical examination	37
3.2	Air conditioner samples	37
3.3	Dust samples	37
3.4	Lakes samples	38
3.5	Sewage samples	39
3.6	9	39
	Staining and morphology  Polymorage shain reaction (PCP)	
3.7	Polymerase chain reaction (PCR)	43
3.7.1	Acanthamoeba genus	43
3.7.2	Pathogenicity of Acanthamoeba	43

3.7.3	Acanthamoeba species and RFLP	43		
CHAPTER FOUR				
4.0	Discussion	56		
4.1	Conclusion	59		
References	•	60		
Appendices		80		

### LIST OF TABLES

NO OF	SUBJECT	PAGE
TABLE		
1	Globa Distribution of Human Infections	7
	Caused by Acanthamoeba	
2	Isolation of Acanthamoeba from various	10
	water samples	
3	Human Infection caused by species of	14
	Acanthamoeba	
4	Acanthamoeba specific primers	34
5	Isolation of <i>Acanthamoeba</i> from dust samples	37
6	Exposing the agar to the dust	38
7	Isolation of <i>Acanthamoeba</i> from lakes	38
	samples	
8	Isolation of Acanthamoeba from sewage	39
	samples	