

جداسازی و شناسایی آمیب نگلریا از رودخانه های منطقه تنکابن مازندران در

سال های ۹۵-۱۳۹۴

شاهین متاجی بندپی، محمد رضا خاتمی نژاد*

گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

چکیده

سابقه و هدف: آمیب های جنس نگلریا، آمیب های تاژکدار هستند که در خاک و آب انتشار دارند و در هر منطقه آب و هوایی یافت می شوند. این تک یاخته موجب التهاب سیستم عصبی مرکزی که به مننگو آنسفالیت آمیبی اولیه شهرت دارد، می گردد. **مواد و روش ها:** در این مطالعه با جمع آوری ۱۰۰ نمونه از آب رودخانه های شهرستان تنکابن و فیلتر نمودن آنها، کشت در محیط کشت اصلاح شده نلسون انجام گردید. بعد از بررسی مورفولوژی و رنگ آمیزی، شناسایی مولکولی انجام گردید. **یافته ها:** ۱۳ نمونه به روش شناسایی مورفولوژی آمیب نگلریا تشخیص داده شد که با استفاده از پرایمرهای اختصاصی 18SrRNA و با تکثیر قطعه ۱۸۶ جفت بازی صحت تشخیص تأیید گردید. بعد از تعیین توالی، ژنوتیپ به دست آمده متعلق به یک گونه جدید نگلریا کلارکی (*Naegleria clarki*) بوده است. **نتیجه گیری:** نتیجه به دست آمده نشان دهنده حضور نگلریا کلارکی در رودخانه های این شهرستان است. با توجه به این که این آمیب می تواند باعث انتقال میکروارگانیسم های بیماری زا شود لذا مسئولین این منطقه، باید اقدامات لازم جهت برطرف کردن آلودگی در این رودخانه ها انجام دهند. **واژه های کلیدی:** نگلریا فولری، نگلریا کلارکی، رودخانه های شهرستان تنکابن، PCR

مقدمه

نگلریا یک آمیب تاژکدار در راسته شیزوپرینیدا و تیره والکامپیفیده است. این آمیب در خاک، آب های شیرین، رودخانه ها، دریاچه ها، استخرهای شنا و چشمه های آب گرم در سرتاسر جهان یافت می شود (۱۰). در چرخه زندگی نگلریا سه مرحله ترفوزوئیت آمیبی، ترفوزوئیت تاژکدار و کیست مشاهده می گردد. ترفوزوئیت پاهای کاذب انگشتی شکل و گاهی پهن و بزرگ با انتهای نیم دایره دارد که به حالت انفجاری تشکیل می شوند، لذا نگلریا حرکتی پیش رونده دارد (۲۱). ترفوزوئیت تاژکدار یک مرحله

نویسنده مسئول:

گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

پست الکترونیکی: mr_khataminezhad@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۱۱

گذرا و موقت بوده و گلابی شکل است. وقتی که غلظت یونی محیط در بردارنده ترفوزوئیت تغییر می کند، ترفوزوئیت آمیبی به ترفوزوئیت تاژکدار تغییر حالت می دهد و دارای ۴ - ۱ و به طور معمول دو تاژک قدامی می گردد. این حالت در آزمایشگاه با انتقال ترفوزوئیت ها به سرم فیزیولوژی و یا آب مقطر مشاهده می شود (۲۲). در ادامه مراحل زندگی این آمیب با کاهش منابع غذایی یا نامطلوب شدن شرایط محیطی ترفوزوئیت تبدیل به کیست می شود (۸). اندازه کیست ۱۶ - ۱۳ میکرون، بیش تر کروی، دارای جدار دو لایه از جنس مواد موکوپلی ساکارید است که جدار داخلی (اندوکیست) ضخیم و کلفت و جدار خارجی (اکتوکیست) نازک است (۸). این تک یاخته دارای گونه های مختلفی است که برخی از آنها از جمله نگلریا فولری در انسان ایجاد بیماری primary amoebic meningoencephalitis (PAM) می نمایند و سایر گونه های دیگر در موش آزمایشگاهی باعث PAM پاتوژنیک می گردند، اما از موارد انسانی شناسایی نشده اند. PAM، نوعی بیماری ناگهانی با دوره کمون ۷ تا ۱۰ روز است که در مواردی کشنده است و تشخیص زود هنگام و شروع

درمان در زنده ماندن بیمار بسیار اهمیت دارد (۲۶، ۵). این آمیبها در دمای زیاد رشد می کنند و از دریاچه ها، چشمه های آب گرم، استخرها و رودهای آلوده گرم شناسایی می شوند. در آمریکا، ماه های تابستان زمانی است که بیشترین موارد ابتلا دیده می شود. آمیب تروفوزوئیت و کیست های درون آب از طریق مسیر بینی به اپی تلیوم بینی نفوذ کرده و از طریق اعصاب بویایی به مغز می رسند هم چنین این آمیبها می توانند حامل و ناقل باکتری های مهم و بیماری زا از قبیل ویبریوکلرا، لژیونلا پنوموفیلا، سودوموناس، مایکوباکتریوم، هلیکوباکتر پیلوری و اشریشیاکلی و ... هستند (۱). در نتیجه احتمال انتقال این عامل بیماری زا از طریق منابع آب به انسان توسط این آمیبها وجود دارد (۲۰). با توجه به این که هیچ اطلاع قبلی از وجود نگلریا در رودخانه های شهرستان تنکابن وجود ندارد، این مطالعه با هدف شناسایی مولکولی نگلریا در رودخانه های شهرستان تنکابن صورت گرفت.

روش کار

تحقیق حاضر به روش توصیفی و با تعداد ۱۰۰ نمونه آب از رودخانه در شهرستان تنکابن در ماه های تیر، مرداد و شهریور ۱۳۹۴ در زمان های مختلف روز (۷-۹، ۹-۱۱، ۱۲-۱۴) به وسیله بطری های استریل از سطوح آب در کناره های رودخانه به مقدار ۵ لیتر جمع آوری گردید (۴). نمونه های با فیلتر نیترو سلولزی ۰/۴۵ میکرون به وسیله پمپ خلأ، فیلتر گردید (۱۵). سپس فیلتر را در سرم فیزیولوژی شستشو داده و ۲۰۰ ماکرولیترا از این سرم فیزیولوژی در مرکز پلیت حاوی محیط کشت اصلاح شده نلسون^۱ (حاوی ۷/۲ - ۷/۴ pH) و سوسپانسیون باکتری /شریشیاکلی کشته شده قرار داده و کشت متراکم انجام گردید. پلیت ها را در دمای ۳۷-۳۵ درجه سلسیوس به مدت یک تا دو هفته گرماگذاری گردیدند (۱۸). نمونه های مشکوک را چندین بار مورد کشت مجدد قرار داده شدند. برای کشت مجدد، نقطه ای که تراکم FLA (free living amoebae) بیش تر و فاقد قارچ بوده را انتخاب کرده و با تیغه اسکالپل استریل برش انجام گردید. سپس آن را در محیط جدید به صورت وارونه جاگذاری گردید. این عمل را چندین بار انجام داده تا محیطی فاقد قارچ و خالص تهیه گردد (۶، ۱۸).

به محیط کشت های خالص سازی بافر فسفات سالین (PBS) اضافه کرده و با تیغه اسکالپل استریل محیط را برش داده تا کیست ها و تروفوزوئیت ها در PBS شناور شوند. سپس بافر

PBS را جمع آوری کرده و با دور ۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب چندین بار با PBS شستشو گردید تا آگار موجود در رسوب به طور کامل حذف گردد (۱۸). در نهایت نمونه های جمع آوری شده با و بدون رنگ آمیزی تری-کروم در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰ X، ۴۰ X و ۱۰۰ X بررسی و از تمام نمونه ها عکس برداری انجام گردید. با توجه به ویژگی های مورفولوژی آمیبها، محیط های مثبت و برای مراحل انتخاب شدند (۶).

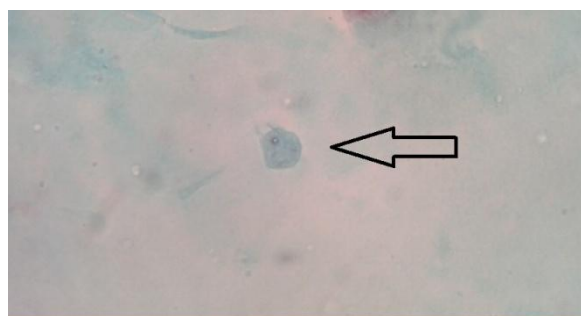
در مرحله بعد PCR انجام شد. برای انجام PCR با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت ویژن (Geno PlusTM Mini) استخراج انجام گردید و با استفاده از الکتروفورز روی ژل ۰/۸ درصد و نانودراپ ارزیابی کیفی و کمی تأیید شد. واکنش PCR تا حجم ۲۵ میکرولیتر با ۵ میکرولیتر ژنوم استخراج شده، ۱ میکرولیتر پرایمر اختصاصی فوروارد Pmol (۱۰ و ۱/۵ میکرولیتر پرایمر اختصاصی ریورس Pmol ۱۰ 18SrRNA (جدول ۱)، ۱۲/۵ میکرولیتر Mastermix و ۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر آماده گردید و در ترموسایکلر Bio Rad (My cycler) با شرایط دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و هم چنین گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه PCR انجام شد.

جدول ۱. ترادف زوج پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر ژنوم نگلریا (۹)

نام پرایمر	توالی	طول پرایمر (جفت باز)
Naegleria F	5'- CAA ACA CCG TTA TGA CAG GG -3'	۲۰
Naegleria R	5'- CTG GTT TCC CTC ACC TTA CG -3'	۲۰

بعد از انجام الکتروفورز بروی ژل ۱/۵ درصد آگاروز و رنگ آمیزی با رنگ SYBR® Green از تولیدات شرکت QIAgen، محصول نهایی PCR برای تعیین توالی جهت شناسایی مولکولی به شرکت ژن فن آوران (www.genfanavar.com) ارسال گردید. نتایج سکانس های حاصل از تعیین توالی با استفاده از نرم افزار Blast با توالی های موجود در بانک ژنی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (www.ncbi.nlm.nih.gov) مقایسه شدند. این کار جهت شناسایی ایزوله ها به روش مولکولی و با استفاده از توالی 18SrRNA موجود، در سطح جنس و گونه انجام گرفت (۹).

یافته ها



شکل ۳. فرم تاژکدار و گلایی شکل نگلریا با رنگ آمیزی تری کروم و بزرگنمایی 100X

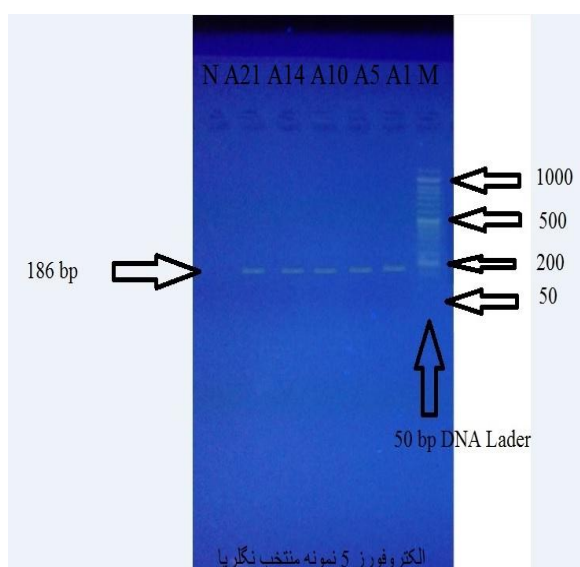
جدول ۲. فراوانی نگلریا بر اساس جریان آب

نوع رودخانه	تعداد نمونه	موارد مثبت (درصد)
پریشان	۶۱	۱۳ (۲۱/۳۱٪)
خروشان	۳۹	۰
تعداد کل	۱۰۰	۱۳ (۱۳٪)

جدول ۳. فراوانی نگلریاهای ایزوله شده بر اساس زمان نمونه گیری از آبها

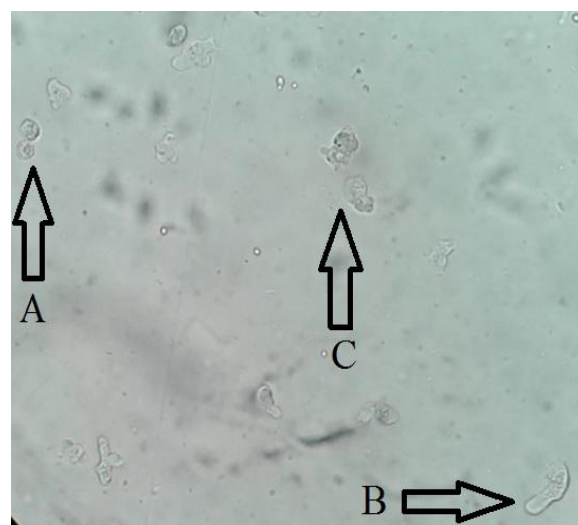
ساعت نمونه گیری	تعداد نمونه گیری	موارد مثبت (درصد)
۷ - ۹	۲۱	۰
۹ - ۱۱	۲۷	۰
۱۲ - ۱۴	۵۲	۱۳ (۲۵٪)
تعداد کل	۱۰۰	۱۳ (۱۳٪)

بررسی نتایج حاصل از توالی ژن 18SrRNA در ایزوله های نگلریاهای جدا شده از آبها و با رسم دندورگرام و مقایسه سکانس به دست آمده با سکانس های موجود در بانک های اطلاعاتی به خصوص NCBI نشان داد، ژنوتایپ به دست آمده مربوط به نگلریا کلارکی strain TMR تعیین هویت گردید (شکل ۵).

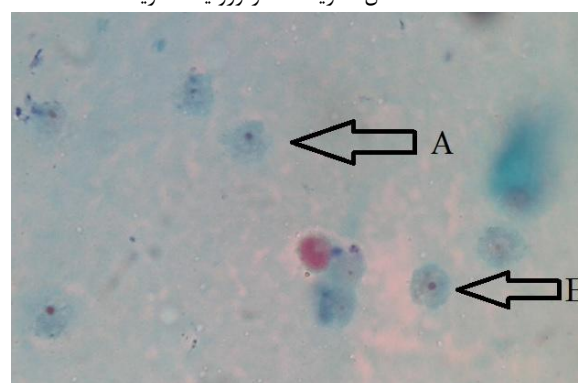


شکل ۴. تصویر ژل الکتروفورز نگلریا. ردیف M مارکر (50bp DNA ladder). نمونه های A از نظر نگلریا مثبت هستند. ردیف N کنترل منفی هست.

در این تحقیق با مشاهده مستقیم و گسترش تهیه شده رنگ آمیزی شده با تری کروم، تعداد ۱۳ نمونه (۱۳٪) مثبت در ۵ رودخانه مشاهده و گزارش شد (اشکال ۱ و ۲). نتایج PCR با محصول به طول ۱۸۶ bp نتایج کشت و رنگ آمیزی را مورد تأیید قرار داد. در این مطالعه همه آمیب های نگلریا ایزوله شده از آب های رودخانه های پریشان جدا شدند (جدول ۱). هم چنین همان گونه در جدول ۲ نشان داده شده است بالاترین فراوانی جداسازی آمیب نگلریا مربوط به ساعت های ۱۲-۱۴ بود و در ساعت های دیگر این امکان صفر بود.



شکل ۱. کیست دایره ای و تروفوزوئیت دارای پای کاذب انگشتی شکل و انتهای نیم دایره ای در محیط کشت اصلاح شده نلسون حاوی اشیریشیا کلی کشته شده با بزرگنمایی 100X A: کیست نگلریا B: پای کاذب انگشت شکل نگلریا C: تروفوزوئیت نگلریا

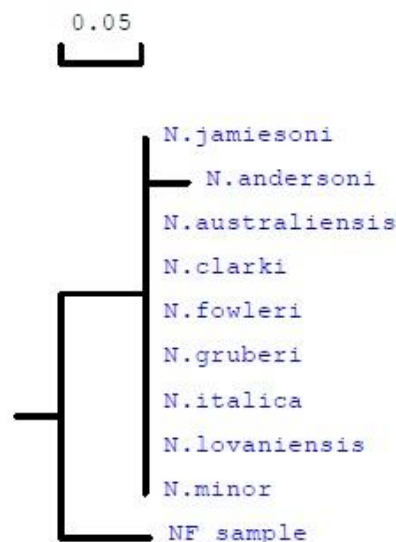


شکل ۲. کیست و تروفوزوئیت نگلریا با رنگ آمیزی تری کروم و بزرگنمایی 100X A: تروفوزوئیت نگلریا B: کیست نگلریا

پساب سیستم‌های صنعتی گزارش می‌شوند. در رودخانه‌ها خیلی کم دیده می‌شوند. آب‌ها با درجه حرارت بالا ممکن است به‌عنوان مخازن برای ادامه حیات و انتشار آن‌ها عمل کنند. وقتی درجه حرارت آب از ۳۰ درجه سانتی‌گراد بگذرد، گونه نگلریا رشد و تکثیر بهتری می‌یابد (۲۵، ۷، ۲) در این تحقیق تروفوزئیت نگلریا در حاشیه رودخانه‌های پریشان با پوشش گیاهی جدا گردید. این نشان دهنده غنی بودن زنجیره غذایی آب در این نقاط است، در نتیجه باعث افزایش جمعیت این آمیب‌ها می‌گردد (۱۱، ۱۲).

در بررسی رودخانه‌ها، نمونه‌هایی که از رودخانه‌های خروشان (قسمت جاری آب) گرفته شده بودند، فاقد آمیب نگلریا گزارش گردید، ولی نمونه‌گیری‌هایی که از رودخانه‌های پریشان (قسمت ساکن آب) انجام شد، به‌دلیل جریان کم آب و غنی بودن زنجیره غذایی کامل و مناسب برای تک‌یاخته‌ها، فرصت خوبی برای رشد و تکثیر نگلریا فراهم کرده بود. موارد مثبت در این تحقیق، از ۶۱ نمونه آب جدا شده از رودخانه‌های پریشان، ۱۳ مورد (۲۱/۳۱٪) نگلریا از این مناطق جدا گردیده است. اسپرانیزا و مونیکا از چشمه‌های گالیسیا در اسپانیا نیز مواردی از نگلریا و آکانتامبا جدا نمودند. آن‌ها نیز عادات اکولوژی مشابهی را برای تک‌یاخته‌ها گزارش نموده اند (۱۶). رضائیان و همکاران در رودخانه‌های پریشان کازرون توانستند با همین عادات اکولوژی، آمیب‌های آکانتامبا و نگلریا را جدا نمایند (۱۷).

در این تحقیق که باهدف جداسازی و شناسایی FLA: free living amoebae در رودخانه‌های منطقه تنکابن بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک و بررسی مولکولی بر اساس ترادف ژن های 18SrRNA انجام شد. ۱۰۰ نمونه مورد بررسی قرار گرفت که از این میان ۱۳ مورد (۱۳٪) برای آمیب نگلریا مثبت بوده است. بعد از بررسی‌های مولکولی، آمیب نگلریا کلارکی شناسایی شد. در تحقیقاتی که رضائیان و همکاران (۱۳۸۱) بر روی آب و خاک رودخانه‌ها و دریاچه پریشان کازرون با بررسی وجود آمیب آزادزی که با روش مورفولوژی انجام داده بودند، توانستند از ۳۵۴ نمونه ۱۰ مورد آکانتامبا و ۳ مورد نگلریا جدا کنند (۱۸). در این تحقیق اخیر آمیب آکانتامبا نسبت به نگلریا از درصد آلودگی بیشتری برخوردار است. ولی نسبت به تحقیق حاضر از درصد آلودگی کم‌تری برخوردار است. قدر جهرمی و همکاران (۱۳۹۱) در تحقیقاتی که بر روی آب‌های چاه، شبکه‌های آبرسانی و مخزن شیراز براساس ویژگی‌های مورفولوژی انجام دادند (۶). آن‌ها ۱۲۰ نمونه برای بررسی انتخاب کردند که از این بین ۴۲ مورد



شکل ۵. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک نگلریا بر اساس توالی 18SrRNA

بحث

نگلریا یک آمیب تاژک‌دار است که به‌همراه اکانتامباها در خاک، آب‌های شیرین، رودخانه‌ها، دریاچه‌ها، استخرهای شنا و چشمه‌های آب گرم در سرتاسر جهان یافت می‌شوند و می‌تواند سبب مننگو انسفالیت آمیبی اولیه در افراد گردد (۹). با توجه به این‌که مطالعه‌ای در خصوص جداسازی این آمیب از رودخانه‌های شهرستان تنکابن وجود ندارد این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی آمیب نگلریا از رودخانه‌های منطقه تنکابن در سال ۹۵-۹۴ به‌روش مورفولوژی و مولکولی انجام شد.

براساس نتایج تحقیقات گذشته، آمیب نگلریا در شرایط سخت مانند سرما در فصول سرد به شکل کیست درآمده و در کف رودخانه‌ها وجود دارد (۳). هم‌چنین با گرم شدن هوا در فصل تابستان با تغییر شکل خود به تروفوزئیت در سطح رودخانه به‌دلیل وجود اکسیژن برای فعالیت به‌صورت فعال دیده می‌شوند (۲۴، ۲۳) در تحقیق حاضر با توجه به نتایج تحقیقات اخیر نمونه‌ها از سطح آب در فصل تابستان انجام گردید. در تحقیق حاضر برای بررسی ترموفیل (گرمادوست) بودن این آمیب‌ها نمونه‌گیری را در ساعت‌های مختلف روز مانند رضائیان و همکاران انجام داده شد، در نتیجه در گرم‌ترین ساعت‌های روز ۱۲ الی ۱۴ بعدازظهر در فصل تابستان که از ۵۲ نمونه ۱۳ مورد (۲۵٪) آمیب نگلریا جدا گردید (۱۷، ۱۲، ۱۱). در واقع نتیجه تحقیق حاضر با نتایج تحقیقات اخیر مشابه بوده و حاکی از ترموفیل بودن این آمیب است. در اکثر تحقیقات آمیب‌ها در دریاچه‌ها، استخرها و آب‌های آلوده به

(۳۵٪) مثبت گزارش کردند. گونه های آکانتامبا (۳۹ مورد) نسبت به نگلریا (۱۴ مورد) از درصد آلودگی بیش تر برخوردار بوده است (۶٪). در تحقیق اخیر چاه ها (۴۴/۴٪) از میزان آلودگی بیش تری برخوردار بود، تحقیق اخیر از درصد آلودگی بیش تری برخوردار است. لیوا و همکاران در نیکارگوا (۲۰۰۷)، توانستند از مناطق شهری و گرمسیری، آمیب نگلریا به- ترتیب ۱۰٪ و ۱۹٪ جدا کنند (۱۳). نتایج این تحقیق نسبت به تحقیق حاضر از درصد آلودگی بیش تری برخوردار است. ولی در تحقیق حاضر که درصد آلودگی نگلریا در رودخانه های پریشان ۲۱/۳۱٪ است که نشان دهنده وجود آلودگی بیش تر این نوع رودخانه ها نسبت به تحقیق اخیر بوده است. در تحقیق آن ها مطرح گردید که درصد آلودگی نگلریا در مناطق گرمسیر ۱۹٪ است بیش تر از مناطق شهری ۱۰٪ است که نشان دهنده ترموفیل بودن گونه نگلریا است که با تحقیق حاضر که فقط در ساعت گرم در فصل تابستان گونه نگلریا جدا گردیده است، مطابقت دارد. لیانگ و همکاران (۲۰۱۰) از آب های مراکز تفریحی تایوان با استفاده از غنی سازی کشت و با تکنیک PCR توانستند آمیب نگلریا را شناسایی نمایند (۱۴). در این مطالعه، گونه نگلریا در ۱۹ مورد (۱۷/۸٪) نمونه- های آب شناسایی گردید. شکل گیری نگلریا در آب های خانگی (۲۸/۶٪) که بیش تر از رودخانه ها (۱۴/۷٪) و آب های چشمه (۶/۵٪) بود. شایع ترین گونه ها که روابط فیلوژنتیکی مشابهی با نگلریا استرالینزیز (۴ مورد)، نگلریا کانارینزیز (۴ مورد)، نگلریا کلارکی (۳ مورد) و نگلریا گروبری (۱ مورد) داشتند، گزارش شد. در این تحقیق تعداد آمیب نگلریا (۱۷/۸٪) بیش تر از تحقیق حاضر (۱۳٪) است. ولی در آب های رودخانه (۱۴/۷٪) جدا کرده است که این بیانگر این است، که درصد آلودگی کم- تری نسبت به رودخانه های پریشان (۲۱/۳۱٪) تحقیق حاضر برخوردار است، اما در تحقیقات قبلی گونه نگلریا کلارکی جدا شده است که با تحقیق حاضر هم خوانی دارد.

نتیجه گیری

نتیجه به دست آمده نشان دهنده حضور نگلریا کلارکی در رودخانه های این شهرستان است و با توجه به این که این آمیب می تواند باعث انتقال میکروارگانیسم های بیماری زا شود لذا مسئولین این منطقه، باید اقدامات لازم جهت برطرف کردن آلودگی در این رودخانه ها انجام دهند.

سپاسگزاری

نگارندگان این مقاله از همکاری دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن و مسئولان بخش های میکروبی شناسی و ژنتیک دانشگاه تنکابن که در انجام این تحقیق یاری رساندند، صمیمانه قدردانی می شود.

منابع

1. Abrahams-Sandi E, Retana-Moreira L, Castro-Castillo A, Reyes-Battle M, Lorenzo-Morales J. Fatal meningoencephalitis in child and isolation of *Naegleria fowleri* from hot springs in Costa Rica. *Emerg Infect Dis*. 2015 Feb;21(2):382-4. PubMed PMID: 25625800. Pubmed Central PMCID: 4313663.
2. Badirzadeh A, Niyyati M, Babaei Z, Amini H, Badirzadeh H, Rezaeian M. Isolation of free-living amoebae from sarein hot springs in ardebil province, iran. *Iran J Parasitol*. 2011 Jun;6(2):1-8. PubMed PMID: 22347281. Pubmed Central PMCID: 3279877.
3. Blair B, Sarkar P, Bright KR, Marciano-Cabral F, Gerba CP. *Naegleria fowleri* in well water. *Emerg Infect Dis*. 2008 Sep;14(9):1499-501. PubMed PMID: 18760036. Pubmed Central PMCID: 2603111.
4. Coskun KA, Ozcelik S, Tutar L, Elaldi N, Tutar Y. Isolation and identification of free-living amoebae from tap water in Sivas, Turkey. *Biomed Res Int*. 2013;2013:675145. PubMed PMID: 23971043. Pubmed Central PMCID: 3736494.
5. Gautam PL, Sharma S, Puri S, Kumar R, Midha V, Bansal R. A rare case of survival from primary amebic meningoencephalitis. *Indian J Crit Care Med*. 2012 Jan;16(1):34-6. PubMed PMID: 22557831. Pubmed Central PMCID: 3338237.
6. Ghadar-ghadr S, Solhjoo K, Norouz-nejad M, Rohi R, Zia-Jahromi S. Isolation and identification of free living amoeba (*Naegleria* and *Acanthamoeba*) in Shiraz water resources by morphological criteria. *Pars of Jahrom University of Medical Sciences*. 2012;10(3):33-42. eng %@ 2008.
7. Huizinga HW, McLaughlin GL. Thermal ecology of *Naegleria fowleri* from a power plant cooling reservoir. *Appl Environ Microbiol*. 1990 Jul;56(7):2200-5. PubMed PMID: 1975164. Pubmed Central PMCID :184583.
8. Init I, Lau YL, Arin Fadzlun A, Foead AI, Neilson RS, Nissapatorn V. Detection of free living amoebae, *Acanthamoeba* and *Naegleria*, in swimming pools, Malaysia. *Trop Biomed*. 2010 Dec;27(3):566-77. PubMed PMID: 21399599.
9. Kaushal V, Chhina DK, Ram S, Singh G, Kaushal RK, Kumar R. Primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *J Assoc Physicians India*. 2008 Jun;56:459-62. PubMed PMID: 18822627.
10. Kilvington S, Beeching J. Identification and epidemiological typing of *Naegleria fowleri* with DNA probes. *Appl Environ Microbiol*. 1995 Jun;61(6):2071-8. PubMed PMID: 7793928. Pubmed Central PMCID: 167479.
11. Kyle DE, Noblet GP. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. II. Lake Issaqueena. *J Protozool*. 1987 Feb;34(1):10-5. PubMed PMID: 3572836.
12. Kyle DE, Noblet GP. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. I. Willard's Pond. *J Protozool*. 1986 Aug;33(3):422-34. PubMed PMID: 3746723.
13. Leiva B, Clasdorfer E, Linder E, Winiecka-Krusnell J. Free-living *Acanthamoeba* and *Naegleria* spp. amebae in water sources of Leon, Nicaragua. *Rev Biol Trop*. 2008 Jun;56(2):439-46. PubMed PMID: 19256418.
14. Liang SY, Ji DR, Hsia KT, Hung CC, Sheng WH, Hsu BM, et al. Isolation and identification of *Acanthamoeba* species related to amoebic encephalitis and nonpathogenic free-living amoeba species from the rice field. *J Appl Microbiol*. 2010 Oct;109(4):1422-9. PubMed PMID: 20553339.

15. Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*. 2015;22:10. PubMed PMID: 25687209. Pubmed Central PMCID: 4330640.
16. Penas-Ares M, Paniagua-Crespo E, Madriñan-Choren R, Marti-Mallen M, Arias-Fernandez MC. Isolation of free-living pathogenic amoebae from thermal spas in N.W. Spain. *Water, Air, and Soil Pollution*. 1994;78(1):83-90.
17. Rezaian M, Bagheri F, Farnia S, Babai Z. Isolation of pathogenic amoeba (*Naegleria* and *Acanthamoeba*) from water sources and margin soils of Revere and lakes in Kazerun. *J. School of Public Health and Institute of Public Health Research*. 2003;1(3): 8-41. eng %@ 1735-7586 %[2003]
18. Salehi M. *Acanthamoeba* Strains genotypes prevalence in water Sources in Bojnurd City: Short Communication. *J. Birjand University of Medical Sciences*. 2014;21(2):260-6. eng %@ 1607-2197 %[2014.
19. Sawyer TK, Visvesvara GS, Harke BA. Pathogenic amoebas from brackish and ocean sediments, with a description of *Acanthamoeba hatchetti*, n. sp. *Science* 1977 Jun 17;196(4296):1324-5. PubMed PMID: 867031.
20. Shakoor S, Beg MA, Mahmood SF, Bandea R, Sriram R, Noman F, et al. Primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*, Karachi, Pakistan. *Emerg Infect Dis*. 2011 Feb;17(2):258-61. PubMed PMID: 21291600. Pubmed Central PMCID: 3204751.
21. Siddiqui R, Khan NA. Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*: an old enemy presenting new challenges. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Aug;8(8):e3017. PubMed PMID: 25121759. Pubmed Central PMCID: 4133175.
22. Su MY, Lee MS, Shyu LY, Lin WC, Hsiao PC, Wang CP, et al. A fatal case of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in Taiwan. *Korean J Parasitol*. 2013 Apr;51(2):203-6. PubMed PMID: 23710088. Pubmed Central PMCID: 3662064.
23. Szenasi Z, Endo T, Yagita K, Nagy E. Isolation, identification and increasing importance of 'free-living' amoebae causing human disease. *J Med Microbiol*. 1998 Jan;47(1):5-16. PubMed PMID: 9449945.
24. Visvesvara GS, Jones DB, Robinson NM. Isolation, identification, and biological characterization of *Acanthamoeba polyphaga* from a human eye. *Am J Trop Med Hyg*. 1975 Sep;24(5):784-90. PubMed PMID: 811126.
25. Wellings FM, Amuso PT, Chang SL, Lewis AL. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria* from Florida lakes. *Appl Environ Microbiol*. 1977 Dec;34(6): 7-661. PubMed PMID: 596870. Pubmed Central PMCID: 242727.
26. Zysset-Burri DC, Muller N, Beuret C, Heller M, Schurch N, Gottstein B, et al. Genome-wide identification of pathogenicity factors of the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *BMC Genomics*. 2014;15:496. PubMed PMID: 24950717. Pubmed Central PMCID: 4082629.

