مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هشتم، شماره سی و دوم- پائیز۱۳۹۷

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

جداسازی و شناسایی آمیب نگلریا از رودخانه‌های منطقه تنکابن مازندران در سال‌های ۹۵-۱۳۹۴

شاهین متاجی بندپی، محمد رضا خاتمی نژاد*

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

چکیده

سابقه و هدف: آمیب‌های جنس نگلریا، آمیب‌های تاژک‌دار هستند که در خاک و آب انتشار دارند و در هر منطقه آب و هوایی یافت می‌شوند. این تک‌یاخته موجب التهاب سیستم عصبی مرکزی که به مننگو آنسفالیت آمیبی اولیه شهرت دارد، می‌گردد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه با جمع‌آوری ۱۰۰ نمونه از آب رودخانه‌های شهرستان تنکابن و فیلتر نمودن آن‌ها، کشت در محیط کشت اصلاح شده نلسون انجام گردید. بعد از بررسی مورفولوژی و رنگ‌آمیزی، شناسایی مولکولی انجام گردید.

یافته‌ها: ۱۳ نمونه به‌روش 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 به‌دست آمده متعلق به یک گونه جدید نگلریا کلارکی (*Naegleria clarki*) بوده است.

نتیجه‌گیری: نتیجه به‌دست آمده نشان‌دهنده حضور نگلریا کلارکی در رودخانه‌های این شهرستان است.

با توجه به این‌که این آمیب می‌توانند باعث انتقال میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا شود لذا مسئولین این منطقه، باید اقدامات لازم جهت برطرف کردن آلودگی در این رودخانه‌ها انجام دهند.

واژه‌های کلیدی : نگلریا فولری، نگلریا کلارکی، رودخانه‌های شهرستان تنکابن، PCR

مقدمه

نگلریا یک آمیب تاژک‌دار در راسته شیزوپرینیدا و تیره والکامپفیده است. این آمیب در خاک، آب‌های شیرین، رودخانه‌ها، دریاچه‌ها، استخرهای شنا و چشمه‌های آب گرم در سرتاسر جهان یافت می‌شود (۱۰).

در چرخه زندگی نگلریا سه مرحله ترفوزوئیت آمیبی، ترفوزوئیت تاژک دار و کیست مشاهده می گردد. ترفوزوئیت پا های کاذب انگشتی شکل و گاهی پهن و بزرگ با انتهای نیم دایره دارد که به حالت انفجاری تشکیل می‌شوند، لذا نگلریا حرکتی پیش‌رونده دارد (۲۱). ترفوزوئیت تاژک‌دار یک مرحله گذرا و موقت بوده و گلابی شکل است. وقتی که غلظت یونی محیط در بردارنده ترفوزوئیت تغییر می‌کند، ترفوزوئیت آمیبی به ترفوزوئیت تاژک‌دار تغییر حالت می‌دهد و دارای ۴ - ۱ و به‌طور معمول دو تاژک قدامی می‌گردد. این حالت در آزمایشگاه با انتقال ترفوزوئیت‌ها به سرم فیزیولوژی و یا آب مقطر مشاهده می‌شود (۲۲). در ادامه مراحل زندگی این آمیب با کاهش منابع غذایی یا نامطلوب شدن شرایط محیطی ترفوزوئیت تبدیل به کیست می‌شود (۸). اندازه کیست ۱۶ - ۱۳ میکرون، بیش‌تر کروی، دارای جدار دو لایه از جنس مواد موکوپلی‌ساکارید است که جدار داخلی (اندوکیست) ضخیم و کلفت و جدار خارجی (اکتوکیست) نازک است (۸). این تک‌یاخته دارای گونه‌های مختلفی است که برخی از آن‌ها ازجمله *نگلریا فولری* در انسان ایجاد بیماری primary amoebic meningoencephalitis (PAM) می‌نمایند و سایر گونه‌های دیگر در موش آزمایشگاهی باعث PAM پاتوژنیک می‌گردند، اما از موارد انسانی شناسایی نشده‌اند. PAM، نوعی بیماری ناگهانی با دوره کمون ۷ تا ۱۰ روز است که در مواردی کشنده است و تشخیص زود هنگام و شروع

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-07-02]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.32.5.4]

درمان در زنده ماندن بیمار بسیار اهمیت دارد (۲۶، ۵). این آمیب‌ها در دمای زیاد رشد می‌کند و از دریاچه‌ها، چشمه های آب گرم، استخرها و رودهای آلوده گرم شناسایی می‌شوند. در آمریکا، ماه‌های تابستان زمانی است که بیش‌ترین موارد ابتلا دیده می‌شود. آمیب تروفوزوئیت و کیست‌های درون آب از طریق مسیر بینی به اپی‌تلیوم بینی نفوذ کرده و از طریق اعصاب بویایی به مغز می‌رسند هم‌چنین این آمیب‌ها می‌توانند حامل و ناقل باکتری‌های مهم و بیماری‌زا از قبیل *ویبریوکلرا*، *لژیونلا پنوموفیلا*، *سودوموناس*، *مایکوباکتریوم*، *هلیکوباکتر پیلوری* و *اشریشیاکلی* و ... هستند (۱). در نتیجه احتمال انتقال این عامل بیماری‌زا از طریق منابع آب به انسان توسط این آمیب‌ها وجود دارد (۲۰). با توجه به این که هیچ اطلاع قبلی از وجود نگلریا در رودخانه‌های شهرستان تنکابن وجود ندارد، این مطالعه با هدف شناسایی مولکولی نگلریا در رودخانه‌های شهرستان تنکابن صورت گرفت.

روش کار

تحقیق حاضر به‌روش توصیفی و با تعداد ۱۰۰ نمونه آب از ۲۱ رودخانه در شهرستان تنکابن در ماه‌های تیر، مرداد و شهریور ۱۳۹۴ در زمان‌های مختلف روز (۷-۹، ۹-۱۱، ۱۲-۱۴) به‌وسیله بطری‌های استریل از سطوح آب در کناره‌های رودخانه به‌مقدار ۵ لیتر جمع‌آوری گردید(۴). نمونه‌های با فیلتر نیترو سلولزی ۰/۴۵ میکرون به‌وسیله پمپ خلأ، فیلتر گردید (۱۵). سپس فیلتر را در سرم فیزیولوژی شستشو داده و ۲۰۰ ماکرولیتر از این سرم فیزیولوژی در مرکز پلیت حاوی محیط کشت اصلاح‌شده نلسون[1] (حاوی ۷/۲ - ۷/۴ : pH) و سوسپانسیون باکتری *اشریشیاکلی* کشته‌شده قرار داده و کشت متراکم انجام گردید. پلیت‌ها را در دمای ۳۷-۳۵ درجه سلسیوس به مدت یک تا دو هفته گرماگذاری گردیدند (۱۸). نمونه‌های مشکوک را چندین بار مورد کشت مجدد قرار داده شدند. برای کشت مجدد، نقطه‌ای که تراکم FLA (free living amoebae) بیش‌تر و فاقد قارچ بوده را انتخاب کرده و با تیغه اسکالپل استریل برش انجام گردید. سپس آن را در محیط جدید به‌صورت وارونه جاگذاری گردید. این عمل را چندین بار انجام داده تا محیطی فاقد قارچ و خالص تهیه گردد (۱۸، ۶).

به محیط کشت‌های خالص‌سازی بافر فسفات سالین (PBS) اضافه کرده و با تیغه اسکالپل استریل محیط را برش داده تا کیست‌ها و تروفوزئیت‌ها در PBS شناور شوند. سپس بافر PBS را جمع‌آوری کرده و با دور ۴۰۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب چندین بار با PBS شستشو گردید تا آگار موجود در رسوب به‌طور کامل حذف گردد (۱۸). درنهایت نمونه‌های جمع‌آوری شده با و بدون رنگ‌آمیزی تری-کروم در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی X ۱۰، X ۴۰ و X ۱۰۰ بررسی و از تمام نمونه‌ها عکس‌برداری انجام گردید. با توجه به‌ویژگی‌های مورفولوژی آمیب‌ها، محیط‌های مثبت و برای مراحل انتخاب شدند (۶).

در مرحله بعد PCR انجام شد. برای انجام PCR با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت ویوژن (Geno PlusTM Mini) استخراج انجام گردید و با استفاده از الکتروفورز روی ژل ۰/۸ درصد و نانودراپ ارزیابی کیفی و کمی تائید 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 ریورس۱۰ Pmol 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 سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد به-مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه و هم-چنین گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت 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 رنگ‌آمیزی با رنگ SYBR® Green از تولیدات شرکت QIAGeen، محصول نهایی PCR برای تعیین توالی جهت شناسایی مولکولی به شرکت ژن فن آوران (www.genfanavaran.com) ارسال گردید. نتایج سکانس‌های حاصل از تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزار Blast با توالی‌های موجود در بانک ژنی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (www.ncbi.nlm.nih.gov) مقایسه شدند. این کار جهت شناسایی ایزوله‌ها به‌روش مولکولی و با استفاده از توالی 18SrRNA موجود، در سطح جنس و گونه انجام گرفت (۹).

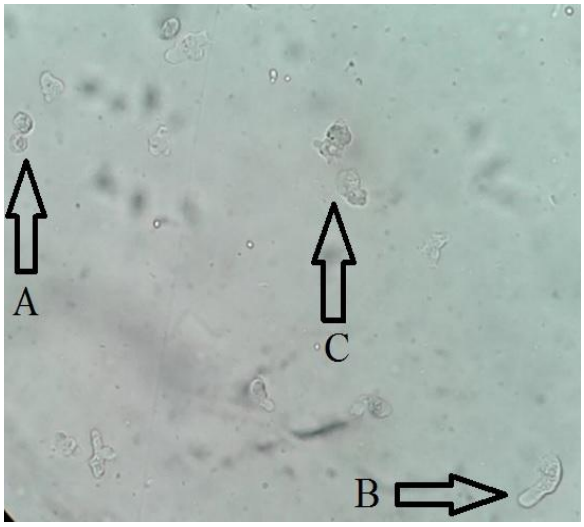
یافته‌ها

[1] Pag,s Salin

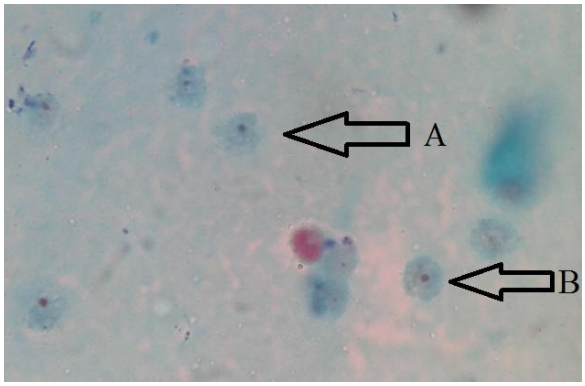
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.32.5.4]

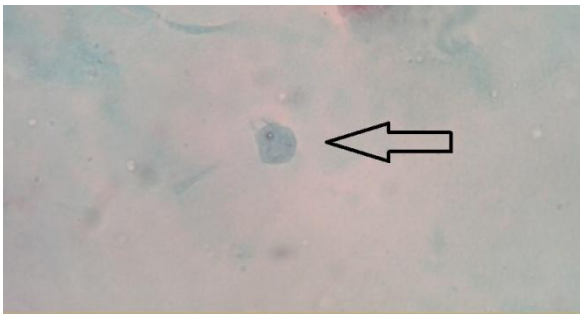
در این تحقیق با مشاهده مستقیم و گسترش تهیه شده رنگ‌آمیزی شده با تری‌کروم، تعداد ۱۳ نمونه (۱۳٪) مثبت در ۵ رودخانه مشاهده و گزارش شد (اشکال ۱ و۲). نتایج PCR با محصول به‌طول ۱۸۶ bpنتایج کشت و رنگ‌آمیزی را مورد تأیید قرار داد. در این مطالعه همه آمیب‌های نگلریا ایزوله شده از آب‌های رودخانه‌های پریشان جدا شدند (جدول ۱). هم-چنین همان‌گونه در جدول ۲ نشان داده‌شده است بالاترین فراوانی جداسازی آمیب نگلریا مربوط به ساعت‌های ۱۲-۱۴ بود و در ساعت‌های دیگر این امکان صفر بود.



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



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



شکل۳. فرم تاژک‌دار و گلابی شکل نگلریا با رنگ‌آمیزی تری‌کروم و بزرگنمایی 100X

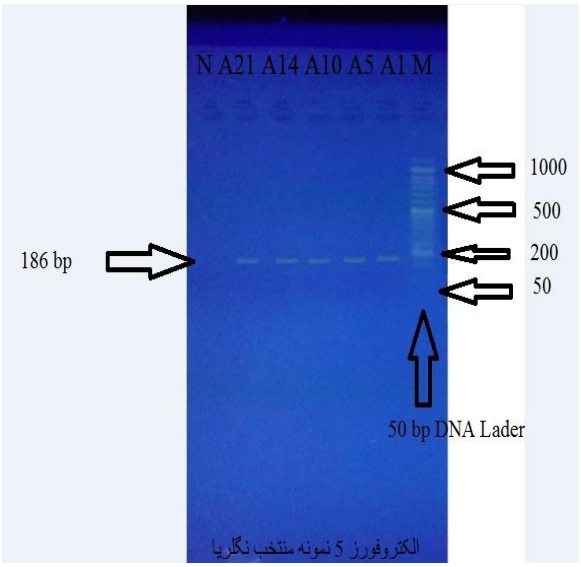
جدول ۲. فراوانی نگلریا بر اساس جریان آب

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 نمونه‌گیری از آب‌ها

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

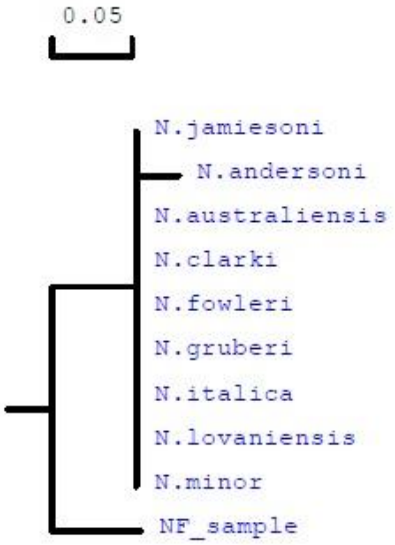
بررسی نتایج حاصل از توالی ژن 18SrRNA در ایزوله‌های نگلریاهای جدا شده از آب‌ها و با رسم دندورگرام و مقایسه سکانس به‌دست آمده با سکانس‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی به خصوص NCBI نشان داد، ژنوتایپ به‌دست آمده مربوط به *نگلریاکلارکی* strain TMR تعیین هویت گردید (شکل ۵).



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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.32.5.4]



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

بحث

نگلریا یک آمیب تاژک‌دار است که به‌همراه اکانتاماباها 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 (۲۳،۲۴) 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 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 رودخانه-های 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 تک یاخته‌ها 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 نگریا 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 مرفولوژی انجام دادند (۶). آن‌ها ۱۲۰ نمونه برای بررسی انتخاب کردند که از این بین ۴۲ مورد

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.32.5.4]

(۳۵٪) مثبت گزارش کردند. گونه‌های آکانتامبا (۳۹ مورد) نسبت به نگلریا (۱۴ مورد) از درصد آلودگی بیش‌تر برخوردار بوده است (۶). در تحقیق اخیر چاه‌ها (۴۴/۴٪) از میزان آلودگی بیش‌تری برخوردار بود، تحقیق اخیر از درصد آلودگی بیش‌تری برخوردار است. لیوا و همکاران در نیکارگوا (۲۰۰۷)، توانستند از مناطق شهری و گرمسیری، آمیب نگلریا به‌ترتیب۱۰٪ و ۱۹٪ جدا کنند (۱۳). نتایج این تحقیق نسبت به تحقیق حاضر از درصد آلودگی بیش‌تری برخوردار است. ولی در تحقیق حاضر که درصد آلودگی نگلریا در رودخانه‌های پریشان ۲۱/۳۱٪ است که نشان‌دهنده وجود آلودگی بیش‌تر این نوع رودخانه‌ها نسبت به تحقیق اخیر بوده است. در تحقیق آن‌ها مطرح گردید که درصد آلودگی نگلریا در مناطق گرمسیر ۱۹٪ است بیش‌تر از مناطق شهری ۱۰٪ است که نشان‌دهنده 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 آب‌های مراکز تفریحی تایوان با استفاده از غنی‌سازی کشت و با تکنیک PCR توانستند آمیب نگلریا را شناسایی نمایند (۱۴). در این مطالعه، گونه نگلریا در ۱۹ مورد (۱۷/۸٪) نمونه‌های آب شناسایی گردید. شکل‌گیری نگلریا در آب‌های خانگی (۲۸/۶٪) که بیش‌تر از رودخانه‌ها (۱۴/۷٪) و آب های چشمه (۶/۵٪) بود. شایع‌ترین گونه‌ها 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٪) بیش‌تر از تحقیق حاضر (۱۳٪) است. ولی در آب‌های رودخانه (۱۴/۷٪) جدا کرده است که این بیانگر این است، که درصد آلودگی کم‌تری نسبت به رودخانه‌های پریشان (۲۱/۳۱٪) تحقیق حاضر برخوردار است، اما در تحقیقات قبلی گونه *نگلریا کلارکی* جدا شده است که با تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد.

نتیجه‌گیری

نتیجه به‌دست آمده نشان دهنده حضور *نگلریا کلارکی* در رودخانه‌های این شهرستان است و با توجه به این‌که این آمیب می‌توانند باعث انتقال میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا 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 بخش‌های میکروب‌شناسی و ژنتیک دانشگاه تنکابن که در انجام این تحقیق یاری رساندند، صمیمانه قدردانی می‌شود.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.32.5.4]

منابع

1. Abrahams-Sandi E, Retana-Moreira L, Castro-Castillo A, Reyes-Batlle 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, Clasdotter 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.32.5.4]

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 Acnthameoba) from water sourcesand margin soils of Reveirs 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-07-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.32.5.4]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.32.5.4]
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-07-02]