

# جداسازی و شناسایی آمیب‌های آزادزی از منابع آبی جلغا شهرستان جلغا از استان آذربایجان شرقی

دکتر مریم نیتی<sup>۱\*</sup>، حامد بهنیا فر<sup>۲</sup>، ناصر ولایی<sup>۳</sup>

۱. دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. دانشجوی دکتری تخصصی انگل شناسی پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. پژوهشگر، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

## چکیده

**سابقه و هدف:** آمیب‌های آزادزی تک‌یاخته‌هایی یوکاریوتیک هستند که در منابع محیطی یافت می‌شوند. این آمیب‌ها شامل خانواده‌ها، جنس‌ها و گونه‌های مختلفی از جمله *آکانتامبا*، *والکامفیدا* و *ورمی‌امبا* می‌باشند و برخی از آنها برای انسان پاتوژن هستند. از آنجایی که تاکنون تحقیقی از نظر حضور *ورمی‌امبا* و *والکامفیدا* در منابع آبی شهرستان جلغا انجام نشده بود، لذا هدف از مطالعه‌ی حاضر، جداسازی و شناسایی این آمیب‌ها بر اساس ویژگی‌های مرفولوژیک در منابع آبی شهرستان جلغا از استان آذربایجان شرقی ایران بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، ۵۰ نمونه از منابع آبی شهرستان جلغا شامل آب آشامیدنی، آب حوض پارک‌ها، استخر و چشمه‌ی آب گرم جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه، با فیلترهای نیتروسولوز فیلتر شدند و سپس روی محیط آگار غیر مغذی ۱/۱/۵٪ حاوی باکتری *شریشیا کلی* در دمای محیط، کشت داده شدند و در نهایت پس از گذشت ۱ هفته و تا ۳ ماه به روش میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌ها به روش توصیفی تجزیه و تحلیل گردیدند.

**یافته‌ها:** ۱۸ نمونه از ۵۰ نمونه‌ی مورد آزمایش (۳۶٪ از نمونه‌ها) مثبت تشخیص داده شدند. ۱۰ نمونه به جنس *ورمی‌امبا*، ۶ نمونه به *والکامفیدا* و دو نمونه به هر دو جنس آلوده بودند.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که منابع آبی شهرستان جلغا دارای آلودگی بالا به آمیب‌های بالقوه پاتوژن هستند، لذا اتخاذ روش‌های پیشگیری مناسب ضروری است. تحقیقات بیشتر در این زمینه توصیه می‌گردد.

## واژگان کلیدی: آمیب‌های آزادزی، *ورمی‌امبا*، *والکامفیدا*، ایران، منابع آبی

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Niyyati M, Behniafar H, Velaie N. Isolation and characterization of potentially pathogenic free living amoebas (*Vermamoeba* and *Vahlkampfiids*) from water sources in Jolfa county, East Azerbaijan province, during 2013-2014. *Pejouhandeh* 2015;20(5):289-294.

## مقدمه

قارچ‌ها و باکتری‌ها هستند. اکثر آمیب‌های آزادزی در چرخه‌ی زندگی خود دارای دو شکل تروفوزوئیت و کیست هستند که با شکل کیستی خود قادر به تحمل شرایط نامساعد محیطی همچون دما و pH نامساعد، خشکی، عوامل شیمیایی و مواد ضد عفونی کننده می‌باشند (۵،۴). امروزه مشخص شده است که از خانواده‌ی *والکامفیدا* جنس‌های *نگلریا*، *والکامفیدا* و *پاراوالکامفیدا* به صورت بالقوه برای انسان پاتوژن هستند (۸-۶). این آمیب‌ها می‌توانند مسبب بیماری‌هایی همچون کراتیت و آنسفالیت شوند. جنس *نگلریا* شامل ۴۷ گونه‌ی مختلف است که ۲ گونه‌ی آن (*نگلریا فاولری* و *نگلریا استرالیسیس*) برای انسان پاتوژن بوده و سبب ایجاد مننگوانسفالیت برق‌آسا

آمیب‌های آزادزی شامل خانواده‌های مختلفی هستند که برخی از آنها به صورت بالقوه برای انسان و حیوان پاتوژن می‌باشند (۲،۱). این آمیب‌ها، در منابع محیطی مختلفی همچون آب، خاک و گرد و غبار یافت شده‌اند (۳). این تک‌یاخته‌های دوگانه‌زی (با زندگی آزاد و انگلی) قادر به تغذیه از میکروارگانیسم‌های موجود در محیط طبیعی همچون

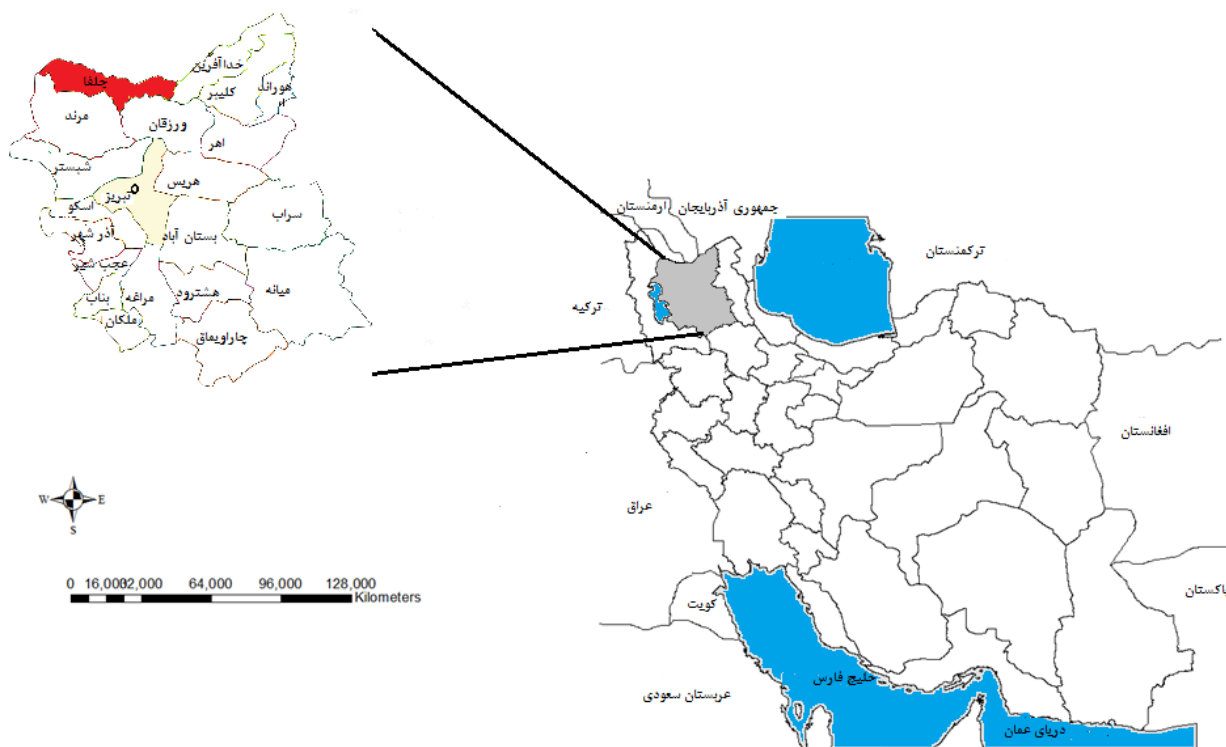
\*نویسنده مسؤوول مکاتبات: دکتر مریم نیتی؛ تهران، ولنجک، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی؛ پست الکترونیک: maryamniyyati@yahoo.com

سیستم ایمنی می‌باشند. از ایران گزارش‌هایی از وقوع کراتیت آمیبی به علت *والکامفییا* و *ورمی‌امبا* در افرادی که لنزهای تماسی استفاده می‌کنند، وجود دارد (۶).

شهرستان جلفا یکی از شهرستان‌های استان آذربایجان شرقی است که مرکز این شهرستان شهر جلفا است. مساحت این شهرستان ۱۶۷۰ کیلومترمربع است و از جنوب به شهرستان‌های مرنند و ورزقان، از شرق به شهرستان خداآفرین، از غرب به استان آذربایجان غربی و از شمال به کشورهای جمهوری آذربایجان و ارمنستان (رود ارس) محدود می‌شود (شکل ۱). جمعیت شهرستان جلفا حدود ۵۵۱۶۶ نفر، دارای آب و هوایی نیمه خشک و سرد و ارتفاعش از سطح دریا ۷۰۴ متر است (۱۳).

می‌شوند (۱). به این مطلب نیز باید توجه کرد که گونه‌های غیر پاتوژن *والکامفییدا* نیز به علت توانایی‌شان در انتقال میکروارگانیسم‌های پاتوژن از جمله *باکتری لژیونلا* تهدیدی مهم برای انسان محسوب می‌شوند (۹). مطالعات دیگری وجود دارد که آلودگی منابع آبی به *والکامفییدا* و *نگریا* را در دیگر نقاط ایران و استان آذربایجان شرقی گزارش نموده‌اند (۱۱،۱۰).

خانواده‌ی هارتمنلیده شامل جنس‌هایی همچون *ورمی‌امبا* و *ورمی‌رمیس* (هارتمنلای سابق) هستند و این آمیب نیز برای انسان پاتوژن می‌باشد. اخیراً گزارش‌هایی از پاتوژنیسیته و ایجاد کراتیت توسط این آمیب آزادی در ایران منتشر شده است (۱۲،۶). برخی گونه‌های *ورمی‌امبا* قادر به ایجاد بیماری در هر دو گروه افراد دارای سیستم ایمنی کارآمد و نقص



شکل ۱. موقعیت شهرستان جلفا (قسمت قرمز رنگ) روی نقشه ایران.

## مواد و روش‌ها

**نمونه‌گیری.** تحقیق به روش توصیفی انجام گرفت. تعداد نمونه در این مطالعه، ۵۰ نمونه آب در نظر گرفته شد. هر نمونه به حجم ۵۰۰ تا ۱۵۰۰ میلی‌لیتر از منابع آبی مختلف شهرستان جلفا واقع در استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری گردید. لازم به ذکر است که جهت نمونه‌گیری منابع آبی استفاده شدند که توسط مردم منطقه جهت شستشو یا

از آنجایی که شهرستان جلفا یکی از مراکز توریستی مهم منطقه است و مردم بومی و مسافری در معرض تماس با منابع آبی و در نتیجه آلودگی هستند، همچنین با توجه به این‌که تاکنون تحقیقی از نظر حضور *ورمی‌امبا* و *والکامفییدا* در منابع آبی این شهرستان انجام نشده بود، لذا هدف از مطالعه حاضر، جداسازی و شناسایی مرفولوژیک جنس‌های *ورمی‌امبا* و *والکامفییدا* در منابع آبی این شهرستان در استان آذربایجان شرقی بود.

میکس، کلونینگ انجام گردید. برای انجام این کار، قسمتی از محیط را که دارای بیشترین آمیب متعلق به یک جنس و کمترین قارچ و باکتری بود با استفاده از تیغ اسکالپل، برداشته شد و روی پلیت دیگری که حاوی محیط بود قرار داده شد و این عمل تا زمان حذف قارچ‌ها از محیط، ادامه یافت.

**آزمایش میکروسکوپی.** پس از کلونینگ و تخلیص نمونه‌ها، شناسایی هر کلون آمیب بر اساس کلیدهای تشخیصی page جنس ورمی/امبا بر اساس ویژگی‌های ظاهری همچون کیست‌های کوچک گرد یا تخم‌مرغی با اندازه‌ای در حدود ۸ تا ۱۰ میکرون و دیواره‌ی خارجی مجزای از هم، شناسایی شد. تروفوزوئیت‌های این آمیب‌ها با توجه به کشیده بودن و وجود هسته‌ی ای با کاریوزوم پراکنده و اندازه ۱۵ میکرون شناخته شدند (شکل ۲). همچنین شناسایی خانواده والکامفیدها بر اساس کیست‌های دو جداره گرد با اندازه‌ی در حدود ۲۰ تا ۲۵ میکرون شناخته شدند (شکل ۳). تروفوزوئیت‌های این خانواده نیز با حالتی کشیده و پاهای کاذب لوبوپودیایی ردیابی شدند، هسته‌ی تروفوزوئیت‌ها نیز دارای کاریوزوم نسبتاً درشت بودند. بررسی میکروسکوپی

آشامیدن از آنها استفاده می‌شد و در واقع مردم به نحوی با آن برخورد داشتند. نمونه‌ها شامل آب آشامیدنی، آب حوض پارک‌ها، استخر و چشمه‌ی آب گرم بود.

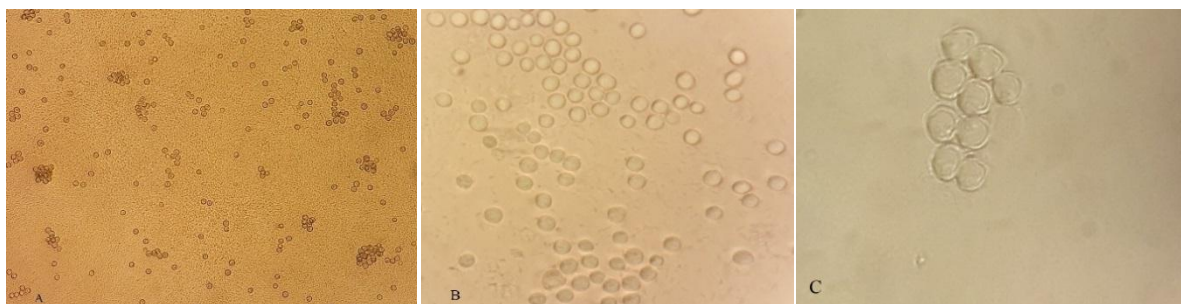
**روش ساخت محیط کشت آگار غیرمغذی.** جهت تهیه‌ی این محیط، ۱/۵ گرم از پودر دیفکواگار (USA) با ۹۹ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱ میلی‌لیتر بافر Page (10X) مخلوط گردید و روی شعله جوشانده شد تا کاملاً حل گردد. سپس در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو و سپس در شرایط کاملاً استریل در پلیت‌های یک‌بار مصرف پخش گردید. پس از آماده‌سازی، دور پلیت‌ها با پارافیلیم بسته شد و تا زمان استفاده، در یخچال ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۴).

**فیلتراسیون و کشت.** ۲۵۰ میلی‌لیتر از هر نمونه، با فیلترهای نیترات سلولز دارای منافذی معادل ۱/۶ میکرون، فیلتر گردیدند (۱۵). قسمت میانی فیلترها بریده شد و روی پلیت‌های حاوی آگار غیر مغذی ۱/۵٪ حاوی/شریشیا کلای کشت داده شدند. سپس پلیت‌ها به مدت چند ماه در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردیدند (۱۵).

**کلونینگ.** جهت حذف آلودگی‌های باکتریایی و قارچی و همچنین خالص‌سازی آمیب‌ها از پلیت‌های دارای آلودگی



شکل ۲. عکس‌های میکروسکوپی از کیست‌های ورمی‌آمبا با بزرگنمایی‌های (A) 100 X، (B) 400 X و (C) 1000 X.



شکل ۳. عکس‌های میکروسکوپی از کیست‌های والکامفیدها با بزرگنمایی‌های (A) 100 X، (B) 400 X و (C) 1000 X.

پلیت‌ها یک هفته پس از کشت آغاز گردید و تا سه ماه ادامه یافت و پلیت‌هایی که در طی این مدت رشد آمیب در آنها دیده نشد، به عنوان نمونه‌های منفی در نظر گرفته شدند. نمونه‌های مثبت با استفاده از میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی  $100\times$  شناسایی شدند (۱۶).

**تجزیه و تحلیل آماری.** تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نسخه ۲۲ نرم‌افزار SPSS و روش توصیفی انجام گرفت.

## یافته‌ها

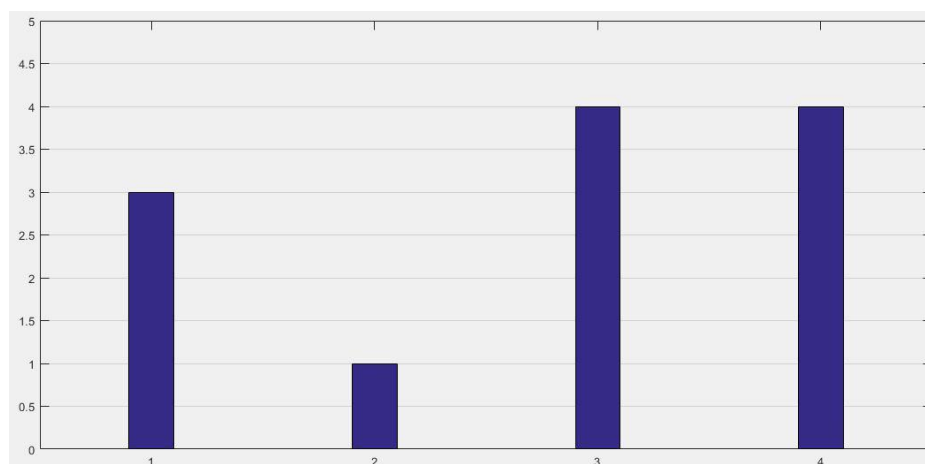
این اولین مطالعه از نظر حضور دو آمیب مذکور در منابع آبی شهرستان جلفا می‌باشد. از ۵۰ نمونه‌ی کشت داده شده روی محیط آگار غیر مغذی، ۱۸ نمونه‌ی آب (۳۶٪)، آلوده به

آمیب‌های *ورمی آمبا* و *والکامفیدا* بودند. میزان آلودگی به جنس *ورمی آمبا* (۱۰ نمونه) بیش از آلودگی به *والکامفیدا* (۶ نمونه) بود. دو نمونه نیز به‌طور همزمان به هر دو نوع آمیب آلوده بودند (جدول ۱). لازم به ذکر است که تعدادی از ایزوله‌ها دارای رشد کندی بودند و بعد از گذشت ۲ ماه در محیط کشت رشد نمودند. میزان آلودگی در آب حوضچه‌ی پارک‌ها، استخر و چشمه‌ی آب گرم، ۱۰۰٪ و در آب آشامیدنی ۱۸٪ بود. تجزیه و تحلیل آماری نشان داد:

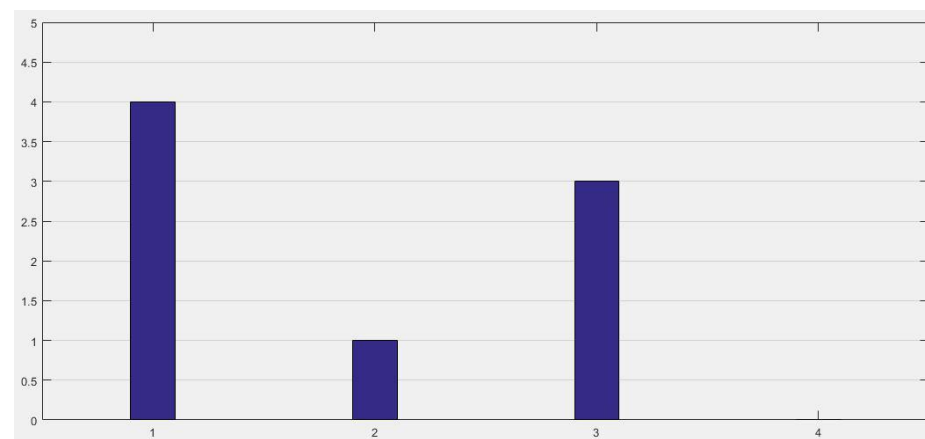
۱. حداقل نمونه‌های آلوده به *هارتمنلا* برابر صفر، بیشترین آنها ۴ و میانگین آلودگی ۲ بود (نمودار ۱).
۲. حداقل نمونه‌های آلوده به *والکامفیدا* برابر ۱، بیشترین آنها ۴ و میانگین آلودگی ۳ بود (نمودار ۲).

جدول ۱. میزان آلودگی منابع آبی به آمیب‌های بالقوه پاتوزن *ورمی آمبا* و *والکامفیدا* به تفکیک.

منبع نمونه	تعداد نمونه	تعداد نمونه‌های آلوده به <i>ورمی آمبا</i>	تعداد نمونه‌های آلوده به <i>والکامفیدا</i>	تعداد نمونه‌های با آلودگی میکس	کل
آب آشامیدنی	۳۹	۳	۴	-	۷ (۱۸٪)
چشمه آب گرم	۱	-	-	۱	۱ (۱۰۰٪)
حوضچه پارک	۶	۳	۲	۱	۶ (۱۰۰٪)
استخر	۴	۴	-	-	۴ (۱۰۰٪)
کل	۵۰	۱۰ (۲۰٪)	۶ (۱۲٪)	۲ (۴٪)	۱۸ (۳۶٪)



نمودار ۱. آلودگی منابع آبی شهرستان جلفا به *ورمی آمبا* (۱: آب‌های آشامیدنی، ۲: چشمه‌های آب گرم، ۳: آب حوض پارک‌ها، ۴: آب استخرها)



نمودار ۲. آلودگی منابع آبی شهرستان جلفا به *والکامفیدا* (۱: آب‌های آشامیدنی، ۲: چشمه‌های آب گرم، ۳: آب حوض پارک‌ها، ۴: آب استخرها)

## بحث

گونه‌های غیر پاتوژن این آمیب نیز می‌تواند باعث انتقال میکروارگانیسم‌های پاتوژنی همچون *لژیونلا پنوموفیلا* به انسان گردد (۲۱). در مطالعه‌ای که توسط رضاییان و همکاران انجام گرفت، ۳۵۴ نمونه از خاک و آب رودخانه‌ها و دریاچه‌های کازرون گرفته شد که در نهایت ۱۰ مورد *آکانتامبا* و ۳ مورد *نگریا* جدا گردید (۲۲). در مطالعه‌ای که توسط بهنیا فر و همکاران بر منابع آبی شهرستان‌های کلبهر و خداآفرین از استان آذربایجان شرقی و به روش میکروسکوپی انجام گرفت، ۴۰٪ از ۵۰ نمونه‌ی مورد آزمایش، آلوده به آمیب‌هایی متعلق به جنس‌های *آکانتامبا*، *تکامبا*، *هارتمنلا*، *والکامفیلا* و *ونلا* بودند، که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (۱۱). در مطالعه‌ای که توسط بدیرزاده و همکاران بر چشمه‌های آب گرم شهرستان سرعین از استان اردبیل و به روش مولکولی صورت گرفت که ۱۲ نمونه (۴۲/۹٪) از ۲۸ نمونه‌ی جمع‌آوری شده، آلوده به *آکانتامبا* و *والکامفیلا* بودند (۲۳). در مطالعه‌ی دیگری که توسط سلگی و همکاران بر چشمه‌های آب گرم استان اردبیل و به روش مولکولی صورت گرفت، از مجموع ۳۰ نمونه‌ی جمع‌آوری شده ۸ نمونه (۲۶/۷٪) آلوده به *ورمی‌امبا* و *ورمیفرمیس* و *نگریا* بودند (۱۰). شایان ذکر است که هر دو آمیب جدا شده در این مطالعه، قبلاً در جهان و ایران به عنوان عامل کراتیت آمیبی و آنسفالیت گزارش شده‌اند (۲۳، ۶).

از محدودیت‌های این بررسی عدم امکان استفاده از روش‌های مولکولی بود که به دلیل عدم وجود منابع مالی، این امر صورت نپذیرفت. امید است در آینده بتوانیم با مطالعات مولکولی، جنس‌های آمیب‌های *والکامفیلا* را شناسایی نماییم.

## نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که درصد بالایی از منابع آبی شهرستان جلفا، آلوده به آمیب‌های *ورمی‌امبا* و *والکامفیلا* هستند. لذا نیاز است که روش‌های کنترلی مؤثری جهت پیشگیری از ابتلای انسانی مانند نصب تابلوهای اعلام خطر در حاشیه‌ی منابع آبی و اطلاع‌رسانی به مردم جهت پیشگیری از بیماری‌های مرتبط، مدنظر قرار گیرد. همچنین، استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده مناسب و نظارت مداوم به خصوص در مورد چشمه‌های آب گرم، ضروری به نظر می‌آید.

نتایج به دست آمده نشان داد که درصد بالایی از منابع آبی شهرستان جلفا آلوده به دو نوع آمیب *ورمی‌امبا* و *والکامفیلا* می‌باشد که با توجه به تماس افراد با این منابع، می‌تواند عامل مهمی در ایجاد آلودگی‌های انسانی و یا انتقال عوامل بیماری‌زا توسط آمیب‌های مذکور به انسان باشد. در این مطالعه مشخص گردید که چشمه‌ی آب گرم و استخرهای تفریحی مورد آزمایش، آلوده بوده‌اند که با توجه به استفاده‌ی مردم شهرستان و همچنین گردشگران از این منابع با اهداف درمانی و تفریحی، این موضوع می‌تواند خطر آلودگی را به مراتب افزایش دهد. البته، با توجه به این‌که استخرها باید مرتباً ضدعفونی شوند، آلودگی بالای آنها دور از ذهن بود. همچنین، کمترین میزان آلودگی مربوط به آب‌های آشامیدنی بود که با توجه به ضدعفونی نمودن و فیلتراسیون این منابع آبی، این نتیجه مورد انتظار بود. این آمیب‌ها پیش از این نیز از منابع محیطی مختلف از جمله آب‌های آشامیدنی و تفریحی در ایران جدا شده‌اند (۱۸، ۱۷، ۱۱، ۱۰).

مطالعات نشان داده‌اند که *ورمی‌امبا* و *ورمیفرمیس* به صورت بالقوه برای قرنیه‌ی انسان پاتوژن است (۱۹، ۱۲). همچنین، برخی گونه‌های *ورمی‌امبا* میزبان مناسبی برای میکروارگانیسم‌های پاتوژنی همچون *لژیونلا پنوموفیلا* و *سودوموناس* است و آمیب‌های *هارتمنلید* فاکتور مهمی جهت رشد *لژیونلا پنوموفیلا* هستند (۲۰). در واقع فاکتورهای مختلفی شامل رشد *ورمی‌امبا* در دمای بالای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و جداسازی آن از بیماران مبتلا به کراتیت آمیبی ثابت می‌کند که *ورمی‌امبا* می‌تواند برای انسان پاتوژن باشد (۱۲). به علاوه، با توجه به مطالعات انجام گرفته، *ورمی‌امبا* جدا شده از بیماران کراتیتی می‌تواند در سلول‌های اپی‌تلیال قرنیه، توکسیسیته‌ی ایجاد نماید (۱۲). پس با توجه به مطالب فوق باید به حضور گونه‌های *ورمی‌امبا* در منابع آبی به خصوص چشمه‌های آب گرم به عنوان یک خطر بهداشتی توجه نمود. در این مطالعه آمیب‌های آزادی خانوادگی *والکامفیلا* نیز ردیابی گردید. در خانوادگی *والکامفیلا*، جنس‌ها و گونه‌های مختلفی وجود دارد. گونه‌هایی از جنس *نگریا* از جمله *نگریا فلوری* می‌تواند برای انسان پاتوژن باشد و از سوی دیگر

## REFERENCES

1. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. FEMS Immunol Med Mic 2007;50(1):1–26.
2. Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev 2006; 30(4): 564–95.

3. Bagheri H, Shafiei R, Shafiei F, Sajjadi S. Isolation of *Acanthamoeba* Spp. from drinking waters in several hospitals of Iran. *Iran J Parasitol* 2010;5(2):19.
4. Stockman LJ, Wright CJ, Visvesvara GS, Fields BS, Beach MJ. Prevalence of *Acanthamoeba* spp. and other free-living amoebae in household water, Ohio, USA—1990–1992. *Parasitol Res* 2011;108(3):621–7.
5. Pelletier JS, Miller D, Liang B, Capriotti JA. In vitro efficacy of a povidone–iodine 0.4% and dexamethasone 0.1% suspension against ocular pathogens. *J Cataract Refract Surg* 2011;37(4):763–6.
6. Niyiyati M, Lorenzo-Morales J, Rezaie S, Rahimi F, Martín-Navarro CM, Mohebbali M, et al. First report of a mixed infection due to *Acanthamoeba* genotype T3 and *Vahlkampfia* in a cosmetic soft contact lens wearer in Iran. *Exp Parasitol* 2010;126(1):89–90.
7. Visvesvara GS, Sriram R, Qvarnstrom Y, Bandyopadhyay K, Da Silva AJ, Pieniazek NJ, et al. *Paravahlkampfia francinae* n. sp. masquerading as an agent of primary amoebic meningoencephalitis. *J Eukaryot Microbiol* 2009;56(4):357–66.
8. Marciano-Cabral F, Jamerson M, Kaneshiro E. Free-living amoebae, *Legionella* and *Mycobacterium* in tap water supplied by a municipal drinking water utility in the USA. *J Water Health* 2010;8(1):71–82.
9. Jamerson M, Remmers K, Cabral G, Marciano-Cabral F. Survey for the presence of *Naegleria fowleri* amoebae in lake water used to cool reactors at a nuclear power generating plant. *Parasitol Res* 2009;104(5):969–78.
10. Solgi R, Niyiyati M, Haghghi A, Mojarad EN. Occurrence of thermotolerant *Hartmannella vermiformis* and *Naegleria* spp. in hot springs of Ardebil Province, Northwest Iran. *Iran J Parasitol* 2012;7(2):47.
11. Behniafar H, Niyiyati M, Lasjerdi Z, Dodangeh S. High Occurrence of Potentially Pathogenic Free Living Amoebae in Water Bodies of Kaleybar and Khodaafarin, East Azerbaijan Province. *Curr World Environ* 10 (Special Issue). شماره سال
12. Lorenzo-Morales J, Martínez-Carretero E, Batista N, Álvarez-Marín J, Bahaya Y, Walochnik J, et al. Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Parasitol Res* 2007;102(1):167–9.
13. Governer EAP. 2015. ?
14. Mosayebi M, Ghorbanzadeh B, Eslamirad Z, Ejtehadifar M, Rastad B. The isolation and detection of *Acanthamoeba* in rural water sources of Arak, Iran. *Med Lab J* 2014;7(4):66–71. (Full Text in Persian)
15. Rezaeian M, Niyiyati M, Farnia S, Haghi AM. Isolation of *Acanthamoeba* spp. from different environmental sources. *Iran J Parasitol* 2008;3(1):44–7.
16. Page FC. A new key to freshwater and soil *Gymnamoebae*: with instructions for culture. 1988.
17. Niyiyati M, Lasgerdi Z, Lorenzo-Morales J. Detection and molecular characterization of potentially pathogenic free-living Amoebae from water sources in Kish Island, Southern Iran. *Microbiol Insights* 2015;8(Suppl 1):1.
18. Behniafar H, Niyiyati M, Lasjerdi Z. Molecular characterization of pathogenic *Acanthamoeba* isolated from drinking and recreational water in East Azerbaijan, Northwest Iran. *Environ Health Insights* 2015;9:7–12.
19. Kennedy S, Devine P, Hurley C, Ooi Y-S, Collum L. Corneal infection associated with *Hartmannella vermiformis* in contact-lens wearer. *Lancet* 1995;346(8975):637–8.
20. Centeno M, Rivera F, Cerva L, Tsutsumi V, Gallegos E, Calderon A, et al. *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitis and bronchopneumonia. *Arch Med Res* 1996;27:579–86.
21. Huang SW, Hsu BM. Survey of *Naegleria* and its resisting bacteria-*Legionella* in hot spring water of Taiwan using molecular method. *Parasitol Res* 2010;106(6):1395–402.
22. Rezaian M, Bagheri F, Farnia S, Babai Z. Isolation of pathogenic amoeba (*Naegleria* and *Acanthameoba*) from water sources and margin soils of rivers and lakes in Kazerun. *J Sch Pub Health Ins Pub Health Res* 2003;1(3):41–8. (Full Text in Persian)
23. Solgi R, Niyiyati M, Haghghi A, Mojarad EN. Occurrence of thermotolerant *Hartmannella vermiformis* and *Naegleria* spp. in hot springs of Ardebil Province, Northwest Iran. *Iran J Parasitol* 2012;7(2):47.
24. Abedkhozasteh H, Niyiyati M, Rahimi F, Heidari M, Farnia S, Rezaeian M. First report of *Hartmannella* keratitis in a cosmetic soft contact lens wearer in Iran. *Iran J Parasitol* 2013;8(3):481.