

جداسازی و شناسایی آمیب‌های آزادی از منابع آبی جلفا شهرستان جلفا از استان آذربایجان شرقی

دکتر مریم نیتی^{*}، حامد بهنیافر^۱، ناصر ولایی^۲

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

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۵۰ نمونه از منابع آبی شهرستان جلفا شامل آب آشامیدنی، آب حوض پارک‌ها، استخر و چشمه‌ی آب گرم جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه، با فیلترهای نیتروسلولز فیلتر شدند و سپس روی محیط آگار غیر مغذی 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 والکامفیدها و دو نمونه به هر دو جنس آلوده بودند.

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

وازگان کلیدی: آمیب‌های آزادی، ورمی‌امبا، والکامفید، 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 آزادی در چرخه 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 ضدغذوی کننده می‌باشند (۵،۶). امروزه مشخص شده است که از خانواده والکامفیده جنس‌های نگلریا، والکامفیا و پاراوالکامفیا به صورت بالقوه برای انسان پاتوژن هستند (۶-۸). این آمیب‌ها می‌توانند مسبب بیماری‌هایی همچون کراتیت و آسفالیت شوند. جنس نگلریا شامل ۴۷ گونه‌ی مختلف است که ۲ گونه‌ی آن (نگلریا فاولری و نگلریا استرالینسیس) برای انسان پاتوژن بوده و سبب ایجاد مننگوانسفالیت برق‌آسا

آمیب‌های آزادی 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 میکرووارگانیسم‌های موجود در محیط طبیعی همچون

*نویسنده مسؤول مکاتبات: دکتر مریم نیتی؛ تهران، ولنجک، دانشگاه علوم

پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی؛ پست

maryamniyati@yahoo.com

سیستم اینمی باشند. از ایران گزارش‌هایی از وقوع کراتیت آمیبی به علت *والکامفیدا* و *ورمی/امبا* در افرادی که لزهای 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 خدا آفرین، 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 *والکامفیدها* نیز به علت توانایی شان در انتقال میکرووارگانیسم‌های پاتوژن از جمله باکتری *لیثیونلا* تهدیدی مهم برای انسان محسوب می‌شوند^(۹). مطالعات دیگری وجود دارد که آلدگی منابع آبی به *والکامفیدها* و *نگلریبا* را در دیگر نقاط ایران و استان آذربایجان شرقی گزارش نموده‌اند^(۱۱,۱۰).

خانواده‌ی هارتمنلیده شامل جنس‌هایی همچون *ورمی/امبا* و *ورمیفرمیس* (هارتمنلای سابق) هستند و این آمیب نیز برای انسان پاتوژن می‌باشد. اخیراً گزارش‌هایی از پاتوژنیته و ایجاد کراتیت توسط این آمیب آزادی در ایران منتشر شده است^(۱۲,۶). برخی گونه‌های *ورمی/امبا* قادر به ایجاد بیماری در هر دو گروه افراد دارای سیستم اینمی 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 مسافرین در معرض تماس با منابع آبی و در نتیجه آلدگی هستند، همچنین با توجه به این که تاکنون تحقیقی از نظر حضور *ورمی/امبا* و *والکامفیدها* در منابع آبی این شهرستان انجام نشده بود، لذا هدف از مطالعه حاضر، جداسازی و شناسایی مرفولوژیک جنس‌های *ورمی/امبا* و *والکامفیدها* 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 و شکل و اندازهٔ مراحل تروفوزوئیت و کیست انجام گرفت. جنس ورمی/آمیبا بر اساس ویژگی‌های ظاهری همچون کیست‌های کوچک گرد یا تخم‌مرغی با اندازه‌ای در حدود ۸ تا ۱۰ میکرون و دیوارهٔ خارجی مجزای از هم، شناسایی شد. تروفوزوئیت‌های این آمیب‌ها با توجه به کشیده بودن وجود هسته ای با کاریوزوم پراکنده و اندازه ۱۵ میکرون شناخته شدند (شکل ۲). همچنین شناسایی خانواده والکامفیدها بر اساس کیست‌های دو جداره گرد با اندازه ای در حدود ۲۰ تا ۲۵ میکرون شناخته شدند (شکل ۳).

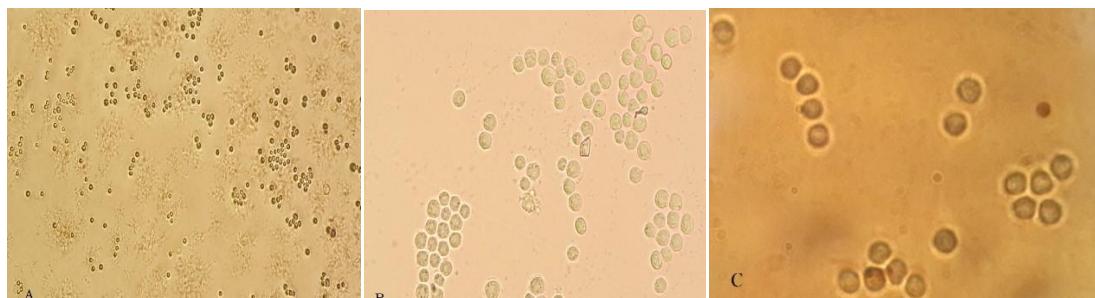
کاذب لوبوپدیایی ردیابی شدند، هسته‌ی تروفوزوئیت‌ها نیز دارای کاریوزوم نسبتاً درشت بودند. بررسی میکروسکوپی

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

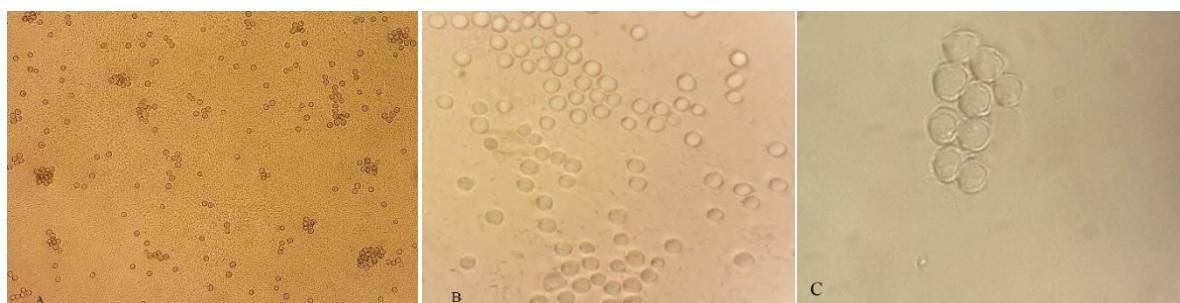
روش ساخت محیط کشت آگار غیرمعذی. جهت تهیهٔ این محیط، ۱/۵ گرم از پودر دیفکوآگار (USA) با ۹۹ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱ میلی‌لیتر بافر (10X) Page مخلوط گردید و روی شعله جوشانده شد تا کاملاً حل گردد. سپس در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو و سپس در شرایط کاملاً استریل در پلیت‌های یکبار مصرف پخش گردید. پس از آماده‌سازی، دور پلیت‌ها با پارافیلم بسته شد و تا زمان استفاده، در یخچال ۴ درجهٔ 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 معذی ۱/۵٪ حاوی اشريشیا کلای کشت داده شدند. سپس پلیت‌ها به مدت چند ماه در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجهٔ 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 ورمی آمیبا با بزرگنمایی‌های (A) ۱۰۰ X، (B) ۴۰۰ X و (C) ۱۰۰۰ X.



شکل ۳. عکس‌های میکروسکوپی از کیست‌های والکامفیدها با بزرگنمایی‌های (A) ۱۰۰ X، (B) ۴۰۰ X و (C) ۱۰۰۰ X.

آمیب‌های ورمی/امبا و والکامفیدها بودند. میزان آلودگی به جنس ورمی/امبا (۱۰ نمونه) بیش از آلودگی به والکامفیدها (۶ نمونه) بود. دو نمونه نیز به طور 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 والکامفیدها برابر ۱، بیشترین آنها ۴ و میانگین آلودگی ۳ بود (نمودار ۲).

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 مشبت با استفاده از میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی $\times 100$ شناسایی شدند (۱۶).

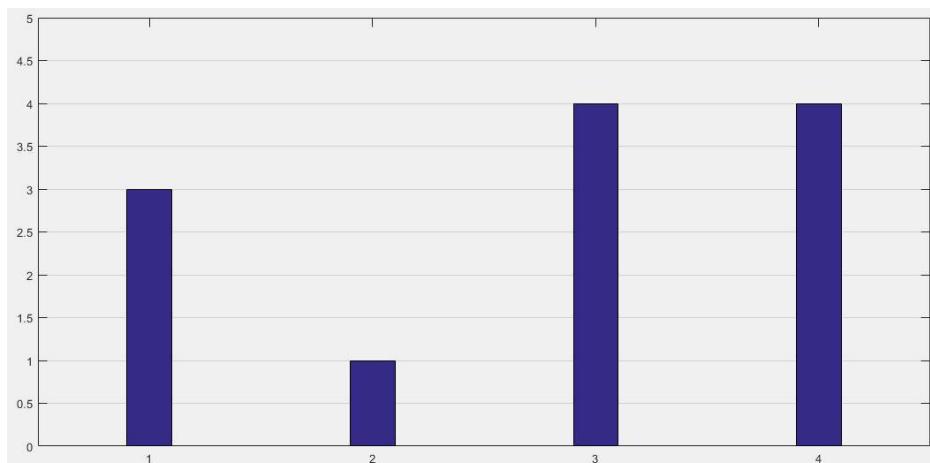
تجزیه و تحلیل آماری. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نسخه‌ی ۲۲ نرم‌افزار SPSS و روش توصیفی انجام گرفت.

یافته‌ها

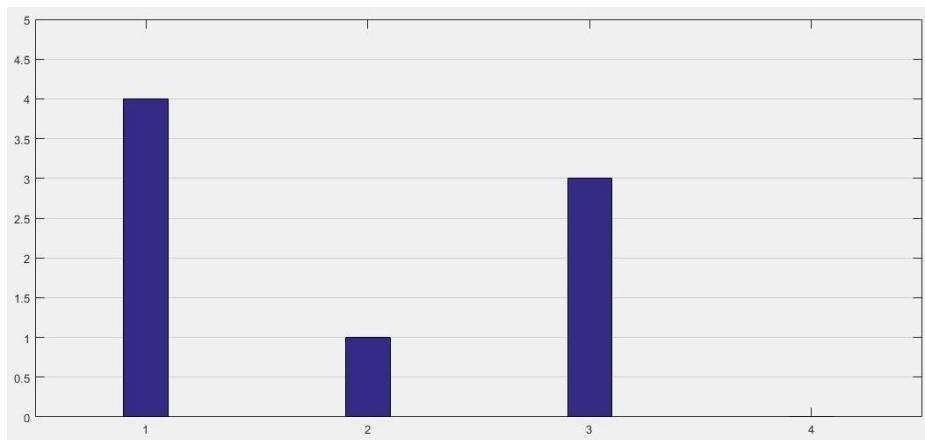
این اولین مطالعه از نظر حضور دو آمیب مذکور در منابع آبی شهرستان جلفا می‌باشد. از ۵۰ نمونه‌ی کشت داده شده روی محیط آگار غیر مغذی، ۱۸ نمونه‌ی آب (۳۶٪)، آلوده به

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

منبع نمونه	تعداد نمونه	تعداد نمونه‌های آلوده به ورمی آمبا	تعداد نمونه‌های آلوده به والکامفیدها	تعداد نمونه‌های آلوده به والکامفیدها	کل
آب آشامیدنی	۳۹	۳	۴	-	(٪۱۸)
چشمه آب گرم	۱	-	-	۱	(٪۱۰۰)
حوضچه پارک	۶	۳	۲	۱	(٪۱۰۰)
استخر	۴	۴	-	-	(٪۱۰۰)
کل	۵۰	(٪۲۰) ۱۰	(٪۱۲) ۶	(٪۴) ۲	(٪۳۶) ۱۸



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 والکامفیدها (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 نگلریا جدا گردید (۲۲). در مطالعه‌ای که توسط بهنیافر و همکاران بر منابع آبی شهرستان‌های کلیبر و خدآ Afrin از استان آذربایجان شرقی و به روش میکروسکوپیک انجام گرفت، ۵۰٪ از نمونه‌ی مورد آزمایش، آلوده به آمیب‌هایی متعلق به جنس‌های آکانتامبا، تکامبا، هارتمنلا، والکامفیا و ونلا بودند، که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (۱۱). در مطالعه‌ای که توسط بدیرزاده و همکاران بر چشم‌های آب گرم شهرستان سرعین از استان اردبیل و به روش مولکولی صورت گرفت که ۱۲ نمونه (۴۲٪) از ۲۸ نمونه‌ی جمع‌آوری شده، آلوده به آکانتامبا و والکامفیدها بودند (۲۳). در مطالعه‌ی دیگری که توسط سلگی و همکاران بر چشم‌های آب گرم استان اردبیل و به روش مولکولی صورت گرفت، از مجموع ۳۰ نمونه‌ی جمع‌آوری شده ۸ نمونه (۲۶٪) آلوده به ورمی‌آمبا ورمیفرمیس و نگلریا 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 ملکولی بود که بهدلیل عدم وجود منابع مالی، این امر صورت نپذیرفت. امید است در آینده بتوانیم با مطالعات ملکولی، جنس‌های آمیب‌های والکامفید را شناسایی نماییم.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که درصد بالایی از منابع آبی شهرستان جلفا، آلوده به آمیب‌های ورمی‌آمبا و والکامفیدها 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 ضدغوفونی کننده مناسب و نظارت مداوم به خصوص در مورد چشم‌های 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 ورمی‌آمبا و والکامفیدها 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 چشم‌های 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 آلوودگی را به مراتب افزایش دهد. البته، با توجه به این‌که استخرها باید مرتبأً ضدغوفونی شوند، آلوودگی بالای آنها دور از ذهن بود. همچنین، کمترین میزان آلوودگی مربوط به آب‌های آشامیدنی بود که با توجه به ضدغوفونی 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 ورمی‌آمبا ورمیفرمیس به صورت بالقوه برای قرنیه‌ی انسان پاتوژن است (۱۹،۱۲). همچنین، برخی گونه‌های ورمی‌آمبا 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 ورمی‌آمبا در دمای بالای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و جداسازی آن از بیماران مبتلا به کراتیت آمیبی ثابت می‌کند که ورمی‌آمبا می‌تواند برای انسان پاتوژن باشد (۱۲). به علاوه، با توجه به مطالعات انجام گرفته، ورمی‌آمبا‌ی جدا شده از بیماران کراتیتی می‌تواند در سلول‌های اپی‌تیال قرنیه، توکسیستی ایجاد نماید (۱۲). پس با توجه به مطالب فوق باید به حضور گونه‌های ورمی‌آمبا در منابع آبی به خصوص چشم‌های آب گرم به عنوان یک خطر بهداشتی توجه نمود. در این مطالعه آمیب‌های آزادی خانواده‌ی والکامفیده نیز رديابی گردید. در خانواده‌ی والکامفیده، جنس‌ها و گونه‌های مختلفی وجود دارد. گونه‌هایی از جنس نگلریا از جمله نگلریا فاولری می‌تواند برای انسان پاتوژن باشد و از سوی دیگر

REFERENCES

- 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.
- 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. Niyyati M, Lorenzo-Morales J, Rezaie S, Rahimi F, Martín-Navarro CM, Mohebali 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 amebae in lake water used to cool reactors at a nuclear power generating plant. *Parasitol Res* 2009;104(5):969–78.
10. Solgi R, Niyyati M, Haghghi A, Mojarrad 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, Niyyati 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* 2010 (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, Niyyati 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. Niyyati 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, Niyyati 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 Acanthamoeba) 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, Niyyati M, Haghghi A, Mojarrad 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. Abedkhasteh H, Niyyati 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.