

## Research Paper

Investigating *Acanthamoeba* in Coastal Waters of Caspian Sea in Guilan Province, Iran\***Mohammad Reza Mahmoudi**<sup>1,2,3</sup> , **Yasaman Vahedi**<sup>1</sup>, **Keyhan Ashrafi**<sup>1</sup>

1. Department of Microbiology and Parasitology, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

2. Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

3. Medical Biotechnology Research Center, School of Paramedicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

**Citation** Mahmoudi MR, Vahedi Y, Ashrafi K. Investigating *Acanthamoeba* in Coastal Waters of Caspian Sea in Guilan Province, Iran. Journal of Guilan University of Medical Sciences. 2021; 29(4):146-153. <https://doi.org/10.32598/JGUMS.29.4.1467.2> <https://doi.org/10.32598/JGUMS.29.4.1467.2>

Received: 27 Jul 2020

Accepted: 01 Oct 2020

Available Online: 01 Jan 2021

**Keywords:***Acanthamoeba*,  
Water, Caspian Sea,  
Guilan Province**ABSTRACT****Background** *Acanthamoeba* spp., can cause severe and fatal diseases including encephalitis, skin granulomatous and keratitis. Contaminated waters can be a threat to high risk people such as contact lens wearers, patients with eye surgery or eye trauma, and immunocompromised patients.**Objective** The present study aims to investigate the presence of potentially pathogenic *Acanthamoeba* in coastal water of Caspian Sea in Guilan Province, Iran based on morphological criteria and thermotolerance assay.**Materials and Methods** In this descriptive study conducted in 2018, a total of 60 water samples were collected randomly from the shores of Rudsar, Chamkhaleh, Kiyashahr, Zibakenar and Bandar-e Anzali (12 samples of 500 mL from each site). Water was filtered by cellulose nitrate membranes with a 0.45 µm pore size and then cultured on non-nutrient agar. They were checked daily for the presence of Free-Living Amoeba (FLA) based on morphologic characteristics of both trophozoite and cyst using a light microscope (100X). Thermotolerance assay was used to determine the potential pathogenicity of *Acanthamoeba* spp., and its growth was examined at a temperature of 42°C.**Results** FLA were grown in 30 out of 60 samples (50%) at a room temperature and in 8 (26.6 %) at a temperature of 42°C. *Acanthamoeba* were identified in all sampling sites, where 8 samples were potentially pathogenic using thermotolerance assay.**Conclusion** There is pathogenic *Acanthamoeba* spp in coastal waters of Caspian Sea in Guilan Province. Since this province attracts many tourists annually, it is necessary that high-risk people including contact lens wearers and immunocompromised patients in this area be warned by health organizations.**Extended Abstract****1. Introduction****A***canthamoeba* spp, can cause severe and fatal diseases including encephalitis, skin granulomatous and keratitis [1]. Water canbe a source of *Acanthamoeba* spp.; thus, contaminated waters can be a threat to high risk people such as contact lens wearers, patients with eye surgery or eye trauma, and immunocompromised patients [2]. There are numerous examples of microorganisms such as *Vibrio cholera* and *Legionella* which survive, grow, or proliferate inside amoebae [3]. Northern Iran including Guilan Province, attract many**\* Corresponding Author:****Mohammad Reza Mahmoudi, PhD.****Address:** Department of Microbiology and Parasitology, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.**Tel:** +98 (131) 33849411**E-Mail:** mrmahmoodi2002@yahoo.com

tourists due to its mediterranean climate and existence of many recreational beaches; however, there is no report regarding the presence of *Acanthamoeba* genotypes in coastal waters of Caspian Sea.

The present study aims to investigate the presence of potentially pathogenic *Acanthamoeba* genus in coastal waters of Caspian Sea based on morphological criteria and thermotolerance assay.

## 2. Materials and Methods

In this descriptive study, 60 water samples were collected from sea shore of Caspian Sea in Guilan, Iran in 2018. Samples were collected at a depth of 10-30 cm from the shores of Rudsar, Chamkhaleh, Kiyashahr, Zibakenar and Bandar-e Anzali. From each site, 12 samples of 500 mL were collected, filtered by cellulose nitrate membranes with 0.45 µm pore size, and cultured on Non-Nutrient Agar (NNA) according our previous studies [4, 5]. To determine potential pathogenicity of *Acanthamoeba spp.* grown in the agar by thermotolerane assay, culture positive sample were transferred to a new NNA plate and kept at 42°C. The presence of Free-Living Amoeba (FLA) examined daily for up to 14 days using a light microscope (100X). FLAs were identified by morphologic characteristics of both trophozoite and cyst.

## 3. Results

Out of 60 samples, FLA were grown in 30 samples (50%) at a room temperature, and in 8 samples (26.6 %) at a temperature of 42°C. *Acanthamoeba* were identified in all sampling sites, where 8 samples were potentially pathogenic using thermotolerance assay.

## 4. Discussion and Conclusion

The study of FLA, especially in environmental waters, is dramatically increasing due to their increased prevalence and their capability to cause human diseases. The presence of FLA in water sources has been reported in various studies; however, there are few studies on the presence of these amoebae in seawater [6-10]. In Guilan Province, some studies have reported the presence of FLA in surface water [4, 5, 11]; however, no study has been conducted on the presence of FLA in the Caspian Sea water. The present study is the first study on the presence of FLA in the shores of Caspian Sea. FLA and the potentially pathogenic *Acanthamoeba spp.*, were identified in 50% and 26.6% of water samples collected from recreational beaches of the Caspian Sea, respectively. In a study in Jamaica, West Indies, *Acanthamoeba* were identified in 49.6% of the sea-water samples, of which 40.4% were reported potentially pathogenic

based on the morphologies of the cysts and trophozoites, and using thermotolerance and osmotolerance assays [7]. In Booton et al.'s study, *Acanthamoeba* strains were isolated from beach sand (n = 20) and nearly all beach isolates were genotype T4 [12].

Interestingly, in the present study, *Acanthamoeba* were isolated from high-salinity coastal water. It seems that some *Acanthamoeba* species can grow in waters with high osmolarity (high salinity) can be pathogenic [13]. Since *Acanthamoeba spp.* (pathogenic and non-pathogenic) can act as natural vectors for pathogenic microorganisms, it can have an impact on the public health sector [14]. The presence of pathogenic and non-pathogenic *Acanthamoeba spp.* in the Caspian Sea indicates a risk for human health. In this regard and considering that Guilan province attracts many tourists annually and all water samples were collected from recreational beaches where swimming activity usually takes place, it is necessary that high-risk people including contact lens wearers and immunocompromised patients in this area be warned by health organizations.

## Ethical Considerations

### Compliance with ethical guidelines

The present study has been approved by the Ethics Committee of Guilan University of Medical Sciences (Code: IR.GUMS.REC.1397.079).

### Funding

This research didn't receive any grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sector.

### Authors' contributions

Conceptualization: Mohammad Reza Mahmoudi, Keyhan Ashrafi; Sample collection and Methodology: Mohammad Reza Mahmoudi, Yasaman Vahedi; Supervision and funding: Mohammad Reza Mahmoudi; Writing: Mohammad Reza Mahmoudi, Keyhan Ashrafi.

### Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Acknowledgements

The authors would like to thank Ms. Behnam Rahmati.

This Page Intentionally Left Blank

---

مقاله پژوهشی

بررسی وجود آکانتامبا در شناگاه‌های دریای خزر در سواحل استان گیلان

\* محمدرضا محمودی<sup>۱،۲،۳</sup>، یاسمن واحدی<sup>۱</sup>، کیهان اشرفی<sup>۱</sup>

۱. گروه میکروپزشکی و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.
۲. مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.
۳. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.

چکیده

تاریخ دریافت: ۰۶ مرداد ۱۳۹۹  
تاریخ پذیرش: ۱۰ مهر ۱۳۹۹  
تاریخ انتشار: ۱۲ دی ۱۳۹۹

**زمینه:** گونه‌های مختلف آکانتامبا قادر به ایجاد بیماری‌های کشنده، از جمله انسفالیت، ضایعات پوستی و کراتیت چشمی می‌شوند. آب‌های آلوده می‌توانند یک منبع خطر برای گروه‌های در معرض خطر، مانند افراد استفاده‌کننده از لنزهای تماسی، افراد دچار ترومای چشم و افراد دچار ضعف سیستم ایمنی باشند.

**هدف:** در این مطالعه، بررسی وجود آکانتامبای بالقوه بیماری‌زا، در آب‌های سواحل خزر، با استفاده از فیلتراسیون، کشت و مشاهده انگل انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه توصیفی، نمونه‌های آب دریای خزر، در سواحل رودسر، چمخاله، کیاشهر و بندرانزلی در استان گیلان، در سال ۱۳۹۷ بررسی شد. در مجموع شصت نمونه، هر نمونه ۵۰۰ میلی‌لیتر، جمع‌آوری شدند. هر کدام از نمونه‌های آب، با استفاده از فیلترهای غشایی و با کمک پمپ خلأ فیلتر شدند و سپس روی محیط آگار غیرمغذی کشت داده شدند. محیط‌های کشت، روزانه از نظر وجود آمیب‌های آزادزی با استفاده از میکروسکوپ نوری و مشخصات ظاهری تروفوزوایت و یا کیست بررسی شدند. به منظور تعیین توانایی بالقوه بیماری‌زا بودن آمیب‌های رشدیافته، آزمایش تحمل حرارتی و بررسی توانایی رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

**یافته‌ها:** با توجه به مشخصات ظاهری انگل و تست تحمل حرارتی، آمیب‌های آزادزی، در سی نمونه (۵۰ درصد) از شصت نمونه، در دمای اتاق و هشت نمونه (۲۶/۶ درصد) نیز در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد رشد کردند. آکانتامبا در تمام شناگاه‌های تفریحی مورد بررسی، شناسایی شد و با انجام تست تحمل حرارتی مشخص شد که هشت نمونه (۲۶/۶ درصد)، بالقوه بیماری‌زا هستند.

**نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج مطالعه حاضر، وجود ایزوله‌های بیماری‌زا و وجود خطر بالقوه برای انسان‌ها، در آب‌های سواحل خزر تأیید می‌شود. هر ساله میلیون‌ها توریست از استان گیلان، به‌ویژه از سواحل که بررسی شده، بازدید می‌کنند؛ بنابراین اطلاع‌رسانی توسط سازمان‌های بهداشتی، به منظور پیشگیری از ابتلا به عفونت، به‌ویژه در گروه‌های پرخطر مانند افراد استفاده‌کننده از لنزهای چشمی و افراد دچار ضعف سیستم ایمنی توصیه می‌شود.

کلیدواژه‌ها:

آکانتامبا، آب، دریای خزر، گیلان

مقدمه

جمله انسفالیت، ضایعات پوستی و کراتیت چشمی می‌شوند. بیشتر موارد آکانتامبیازیس به صورت کراتیت چشمی است که در افراد سالم گزارش می‌شود و غالباً در افراد استفاده‌کننده از لنزهای تماسی نرم و طی تماس با آب به وجود می‌آید. این عفونت در افراد با ضعف سیستم ایمنی و مبتلایان به بیماری‌های مزمن، ممکن است، موجب ایجاد ضایعات ریوی، پوستی و مغزی شود [۱].

آکانتامبا از زیستگاه‌های متنوعی چون آب شیرین، آب شور، شن‌های ساحل، فاضلاب و خاک مناطق گرمسیر تا قطب شمال جدا شده است و یک انتشار جهانی دارد [۲، ۱]. تاکنون گونه‌های فراوانی از آکانتامبا یافت شده که بعضی از آن‌ها با ایجاد بیماری در انسان مرتبط دانسته شده است [۳].

آب، یکی از محل‌های زندگی آکانتامباست؛ بنابراین آب‌های

گونه‌های مختلف آکانتامبا، سبب بیماری‌های کشنده، از

\* نویسنده مسئول:

دکتر محمدرضا محمودی

نشانی: رشت، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دانشکده پزشکی، گروه میکروپزشکی و انگل‌شناسی.

تلفن: ۳۳۸۴۹۴۱۱ (۱۳۱) +۹۸

رایانامه: mrmahmoodi2002@yahoo.com

جمع‌آوری شد. هر کدام از نمونه‌های آب، با استفاده از فیلترهای غشایی و با کمک پمپ خلأ فیلتر شدند و فیلترها، جهت کشت آمیب آزادی، روی محیط آگار غیرمغذی قرار داده شدند.

#### پایش انگل در محیط کشت و انجام تست تحمل حرارتی

در ابتدا، محیط‌های کشت در دمای اتاق نگهداری شدند و حداقل به مدت دو هفته، روزانه از نظر وجود آمیب‌های آزادی با استفاده از میکروسکوپ نوری و مشخصات ظاهری تروفوزوایت و یا کیست بررسی شدند.

به منظور تعیین توانایی بالقوه بیماری‌زا بودن آمیب‌های رشدیافته در محیط کشت، نمونه‌های کشت مثبت، به محیط آگار غیرمغذی جدیدی منتقل شدند و در این مرحله، در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و روزانه به مدت دو هفته رشد و تکثیر آن‌ها بررسی شد.

#### نتایج

با توجه به مشخصات شکل ظاهری آمیب‌های آزادی و تست تحمل حرارتی، در مطالعه حاضر، آمیب‌های آزادی، در سی نمونه (۵۰ درصد) از شصت نمونه، در دمای اتاق و هشت نمونه (۲۶/۶ درصد) نیز در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد رشد کردند.

آمیب‌های آزادی، از جمله آکانتامبا، از تمام شناگاه‌های مورد بررسی شناسایی شد و با توجه به نتایج تست تحمل حرارتی نیز، وجود آکانتامبای بالقوه بیماری‌زا در تمام شناگاه‌های مورد بررسی، تأیید شد (جدول شماره ۱).

#### بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به افزایش موارد ابتلا به آمیب‌های آزادی، مطالعه این گروه از آمیب‌ها، به‌ویژه در آب‌های محیطی، به دلیل توانایی این

آلوده می‌توانند یک منبع خطر برای گروه‌های در معرض خطر، مانند افراد استفاده‌کننده از لنزهای تماسی، افراد دچار ترومای چشم و افراد دچار ضعف سیستم ایمنی باشد [۴]. علاوه بر این، برخی ارگانیسیم‌ها، مانند ویبریو کلرا و لژیونلا قادر هستند که داخل این آمیب‌ها رشد و تکثیر داشته باشند که این مسئله نیز از نظر بهداشت عمومی و انتقال بیماری‌ها حائز اهمیت است [۵].

استان گیلان به خاطر داشتن سواحل تفریحی، هر ساله پذیرای تعداد زیادی مهمان است، اگرچه در برخی مطالعات این آمیب از رودخانه‌ها و چشمه‌های استان گیلان گزارش شده [۸-۶]، اما با وجود این، گزارشی جامعی در رابطه با پراکندگی آمیب‌های آزادی، از جمله آکانتامبا، در سواحل شنای این استان، وجود ندارد. در سراسر جهان نیز مطالعات محدودی در زمینه شناسایی آکانتامبا در آب دریاها و اقیانوس‌ها وجود دارد [۱۳-۹].

بنابراین مطالعه حاضر با توجه به نگرانی ابتلا به بیماری‌های خطرناکی، از جمله کراتیت و انسفالیت آمیبی در افراد مستعد و عدم وجود اطلاعات دقیقی در مورد آب‌ها در سواحل شنای دریای خزر، طراحی و اجرا شد. تا بتوان، وجود آکانتامبای بالقوه بیماری‌زا را در آب‌های سواحل خزر، با استفاده از فیلتراسیون، کشت و بررسی مشخصات ظاهری انگل بررسی کرد.

#### مواد و روش‌ها

##### جمع‌آوری نمونه‌ها و کشت در محیط آگار غیرمغذی

در این مطالعه توصیفی، نمونه‌های آب سواحل خزر در استان گیلان، در سال ۱۳۹۷ بررسی شد. نمونه‌ها در محدوده طرح سالم‌سازی دریا، از عمق ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متری سواحل شنا در رودسر، چمخاله، کیشهر، زیباکنار و بندرانزلی جمع‌آوری شدند.

از هر کدام از سواحل یادشده، دوازده نمونه ۵۰۰ میلی‌لیتری،

جدول ۱. فراوانی آمیب آکانتامبا در آب‌های سواحل شنای دریای خزر بر اساس نتایج کشت و تست تحمل حرارتی

محل نمونه‌برداری	تعداد نمونه	نتیجه کشت	نتیجه تست تحمل حرارتی	تعداد (درصد)
رودسر	۱۲	۷ (۵۸)	۱ (۱۴)	
چمخاله	۱۲	۸ (۶۶)	۳ (۳۷)	
کیشهر	۱۲	۵ (۴۲)	۱ (۲۰)	
زیباکنار	۱۲	۵ (۴۲)	۱ (۲۰)	
بندرانزلی	۱۲	۵ (۴۲)	۲ (۴۰)	
کل	۶۰	۳۰ (۵۰)	۸ (۲۶/۶)	

استفاده‌کننده از لنزهای تماسی و افراد دچار ضعف سیستم ایمنی باشند.

نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که ایزوله‌های بالقوه بیماری‌زا و ایزوله‌های غیربیماری‌زای آکانتامبا، در آب‌های دریای خزر وجود دارد.

شایان ذکر است که تمام گونه‌های آکانتامبا، از جمله گونه‌های غیربیماری‌زا، از نظر بهداشت عمومی حائز اهمیت هستند؛ زیرا برخی ارگانسیم‌های بیماری‌زا مانند باکتری‌ها، قادر هستند که در داخل این آمیب‌ها زنده بمانند و بدین طریق خود را از تأثیر مواد ضدعفونی‌کننده محافظت کنند و نهایتاً به میزبانان انسانی منتقل شده و منجر به بیماری شوند [۵].

از طرفی، این مطالعات بیانگر آن است که گونه‌هایی که در آب‌های با غلظت نمک بالا قادر به رشد هستند، توانایی بیماری‌زایی دارند؛ لذا با توجه به این نکته که نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه نیز از نمونه‌های آب شور دریا هستند، می‌تواند تأییدی بر وجود ایزوله‌های بیماری‌زا در آب دریای خزر باشد.

نظر به اینکه استان گیلان دارای سواحل زیادی است و در فصول مختلف، خصوصاً بهار و تابستان تعداد زیادی از علاقه‌مندان به سیر و سفر را به خود جلب می‌کند و این منابع به سهولت در دسترس افراد ساکن در منطقه و مسافری قرار می‌گیرد؛ بنابراین آگاه ساختن افرادی که از لنز تماسی استفاده می‌کنند یا افراد دچار ضعف سیستم ایمنی، از خطرات احتمالی تماس با آب‌های ساحلی ضروری به نظر می‌رسد.

با توجه به تأیید وجود گونه‌های بالقوه بیماری‌زا در سواحل استان گیلان، اطلاع‌رسانی توسط سازمان‌های بهداشتی، نصب علائم هشدار در سواحل دریا و استفاده از عینک‌های مخصوص شنا، به منظور پیشگیری از ابتلا به عفونت، به‌ویژه در گروه‌های پرخطر مانند افراد استفاده‌کننده از لنزهای چشمی و افراد دچار ضعف سیستم ایمنی توصیه می‌شود.

## ملاحظات اخلاقی

### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

مطالعه حاضر توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی گیلان تأیید شده است (کد: IR.GUMS.REC.1397.079)

### حامی مالی

این تحقیق هیچ گونه کمک مالی از سازمان‌های تأمین مالی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرد.

آمیب‌ها در ایجاد بیماری‌های خطرناک و جدی در انسان‌ها، به طور چشمگیری در حال افزایش است [۱۴].

حضور آمیب‌های آزادزی در منابع آبی، در مطالعات مختلف گزارش شده، اما در رابطه با وجود این آمیب‌ها در آب دریاها در سراسر دنیا، از جمله آب دریای خزر، مطالعات کمی وجود دارد.

اگرچه مطالعاتی در زمینه وجود این آمیب‌ها در آب‌های سطحی استان گیلان انجام شده [۸-۶]، اما در رابطه با وضعیت آب دریای خزر از نظر وجود این آمیب‌ها مطالعه‌ای انجام نشده است.

مطالعه حاضر، نخستین مطالعه در زمینه بررسی آمیب‌های آزادزی در شناگاه‌های مختلف سواحل دریای خزر در استان گیلان است که وجود آکانتامبا بالقوه بیماری‌زا، در شناگاه‌های سواحل دریای خزر در استان گیلان به اثبات رسید.

بر اساس نتایج این مطالعه، فراوانی آمیب‌های آزادزی و ایزوله‌های آکانتامبا بالقوه بیماری‌زا در نمونه‌های مورد بررسی به ترتیب ۵۰ درصد و ۲۶/۶ درصد است (جدول شماره ۱). در مطالعات مشابه، از جمله در مطالعه انجام‌شده روی نمونه‌های آب دریا در جامائیکا، ۴۹/۶ درصد نمونه‌ها از نظر آکانتامبا مثبت بودند [۱۵] که نتایج آن مشابه نتایج مطالعه حاضر در گیلان است.

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، وجود آکانتامبا در شناگاه‌های سواحل خزر تأیید می‌شود و بیانگر آن است که آکانتامبا به آب‌های شور دریای خزر مقاوم است و می‌تواند در این آب‌ها رشد و تکثیر داشته باشد. به نظر می‌رسد که گونه‌هایی از آکانتامبا که توانایی رشد و تکثیر در چنین آب‌هایی با اسمولاریته بالا را دارند می‌توانند به طور بالقوه بیماری‌زا باشند [۱۳].

آکانتامبا در نمونه‌های رسوبات اقیانوسی نیز شناسایی شده است [۱۵، ۱۲]. به علاوه، این آمیب‌ها می‌توانند به عنوان یک مخزن طبیعی برای برخی ارگانسیم‌های حائز اهمیت در پزشکی و بهداشت عمومی، عمل کنند [۵].

همچنین، گونه‌های مختلفی از انگل آکانتامبا وجود دارد که توانایی بیماری‌زایی آن‌ها متفاوت است و برخی از آن‌ها نیز غیربیماری‌زا هستند. توانایی تحمل حرارتی، یک نشانگر بیماری‌زایی آکانتامبا است و با انجام تست تحمل حرارتی می‌توان تا حدی سویه‌های بالقوه بیماری‌زا را شناسایی کرد.

مشابه مطالعه حاضر، سویه‌های مقاوم به حرارت از نمونه‌های آب دریا در برخی نقاط دنیا گزارش شده است [۱۷، ۱۶]. در مطالعه انجام‌شده روی نمونه‌های آب دریا در جامائیکا، ۴۰/۴ درصد نمونه‌ها با انجام تست تحمل حرارتی و تحمل اسمز به طور بالقوه بیماری‌زا بودند [۱۰] که بیانگر آن است که سویه‌های بیماری‌زای آکانتامبا نیز در آب‌های شور وجود دارد و می‌توانند منبع بالقوه‌ای برای عفونت‌های آکانتامبایی، به‌ویژه در افراد

### مشارکت نویسندگان

طراحی: محمدرضا محمودی، کیهان اشرفی؛ جمع‌آوری نمونه و اجرا: محمدرضا محمودی و یاسمن واحدی؛ نظارت و تأمین مالی: محمدرضا محمودی؛ پیش‌نویس اولیه مقاله: محمدرضا محمودی.

### تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله هیچ‌گونه تعارض منافی ندارد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان از خانم بهناز رحمتی، کارشناس ارشد آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی، تشکر می‌کنند.

## References

- [1] Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*. 2004; 34(9):1001-27. [DOI:10.1016/j.ijpara.2004.06.004] [PMID]
- [2] La Scola B, Boyadjiev I, Greub G, Khamis A, Martin C, Raoult D. Amoeba-resisting bacteria and ventilator-associated pneumonia. *Emerging Infectious Diseases*. 2003; 9(7):815-21. [doi: 10.3201/eid0907.020760] [PMCID]
- [3] Feiz Haddad MH, Habibpour H, Mahmoudi MR. Isolation and molecular identification of free-living amoebae (*Naegleria* spp., *Acanthamoeba* spp. and *Vermamoeba* spp.) from mineral springs in Guilan Province, northern Iran. *Journal of Water and Health*. 2020; 18(1):60-6. [DOI:10.2166/wh.2020.191]
- [4] Gornik K, Kuzna-Grygiel W. Presence of virulent strains of amphizoic amoebae in swimming pools of the city of Szczecin. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2004; 11(2):233-6. [PMID]
- [5] Patrick S. Free-living amoebae as human parasites and hosts for pathogenic microorganisms. *Proceedings*. 2018; 2(11):692. [DOI:10.3390/proceedings2110692]
- [6] Mahmoudi MR, Taghipour N, Eftekhari M, Haghghi A, Karanis P. Isolation of *Acanthamoeba* species in surface waters of Gilan province-north of Iran. *Parasitology Research*. 2012; 110:473-7. [DOI:10.1007/s00436-011-2530-1] [PMID]
- [7] Mahmoudi MR, Kazemi B, Haghghi A, Karanis P. Detection of *Acanthamoeba* and *Toxoplasma* in river water samples by molecular methods in Iran. *Iranian Journal of Parasitology*. 2015; 10(2):250-7. [PMCID]
- [8] Mahmoudi MR, Rahmati B, Seyedpour SH, Karanis P. Occurrence and molecular characterization of free-living amoeba species (*Acanthamoeba*, *Hartmannella*, and *Saccamoeba limax*) in various surface water resources of Iran. *Parasitology Research*. 2015; 114:4669-74. [DOI:10.1007/s00436-015-4712-8] [PMID]
- [9] Munson DA, Timothy AP. Distribution of *Acanthamoeba* in more and less polluted North Sea coastal sediments. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2006; 53(S1):S12-4. [DOI:10.1111/j.1550-7408.2006.00157.x] [PMID]
- [10] Lorenzo-Morales J, Lindo JF, Martinez E, Calder D, Figueruelo E, Valladares B, et al. Pathogenic *Acanthamoeba* strains from water sources in Jamaica, West Indies. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 2005; 99(8):751-8. [DOI:10.1179/136485905X65215] [PMID]
- [11] Jonckheere JF. Molecular identification of free-living amoebae of the Vahlkampfiidae and Acanthamoebidae isolated in Arizona (USA). *European Journal of Protistology*. 2007; 43(1):9-15. [DOI:10.1016/j.ejop.2006.09.001] [PMID]
- [12] Sawyer TK, Visvesvara GS, Harke BA. Pathogenic amoebas from brackish and ocean sediments, with a description of *Acanthamoeba hatchetti*, n. sp. *Science*. 1977; 196(4296):1324-5. [DOI:10.1126/science.867031] [PMID]
- [13] Liu H, Ha YR, Lee ST, Hong YC, Kong HH, Chung DI. Genetic diversity of *Acanthamoeba* isolated from ocean sediments. *The Korean Journal of Parasitology*. 2006; 44(2):117-25. [DOI:10.3347/kjp.2006.44.2.117] [PMID] [PMCID]
- [14] Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, et al. Use of subgenomic 18S ribosomal DNAPCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39(5):1903-11. [DOI:10.1128/JCM.39.5.1903-1911.2001] [PMID] [PMCID]
- [15] Khan NA. *Acanthamoeba*, biology and pathogenesis. 1<sup>st</sup> ed. United Kingdom: Caister Academic Press; 2009. [https://books.google.com/books/about/Acanthamoeba.html?id=7cx8zQEACAAJ&source=kp\\_book\\_description](https://books.google.com/books/about/Acanthamoeba.html?id=7cx8zQEACAAJ&source=kp_book_description)
- [16] Górnik K. Pathogenic properties of free-living amoebae isolated from natural and man-made bathing sites in the province of Western Pomerania. *Annales Academiae Medicae Stetinensis*. 2005; 51(1): 127-33. [PMID]
- [17] Łanocha N, Kosik-Bogacka D, Maciejewska A, Sawczuk M, Wilk A, Kuźna-Grygiel W. The Occurrence *Acanthamoeba* (Free Living Amoeba) in Environmental and Respiratory Samples in Poland. *Acta Protozoologica*. 2009; 48(3):271-9. <http://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-article-9b81eae1-714b-4516-b2f0-b571b6089514>