

جداسازی آمیب نگلریا و شناسایی نگلریا آسترالینسیس از آب استخرهای شنای استان کرمان

نویسندگان:

راحله افتخاری کنزری^۱، کاوس صلح جو^{۱،۲*}، زهرا بابایی^۳، حسن رضائزاد^{۱،۲}، احمد ابوالقاسی^۱

۱- گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیماریهای زئونوز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

۳- مرکز تحقیقات لیشمانیوز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.18, No.2, Summer 2020

چکیده:

مقدمه: در بین آمیب های آزادی، گونه های *N. australiensis* و *N. fowleri* علت مرگ ناشی از مننگوآنسفالیت آمیبی اولیه به حساب می آیند. از آن جا که آب استخرها منبع آمیب های آزادی است، این مطالعه با هدف جداسازی آمیب نگلریا و شناسایی نگلریا آسترالینسیس از آب استخرهای شنای استان کرمان انجام شد.

روش کار: ۸۰ نمونه آب از ۲۰ استخر استان کرمان در تابستان ۱۳۹۷ جمع آوری و میزان کلر باقی مانده، pH و دمای آن ها اندازه گیری شد. نمونه های آب فیلتر و کشت داده شدند. پس از شناسایی مورفولوژیکی آمیب، تعیین جنس به روش PCR و تایید گونه با مقایسه توالی محصول PCR در بانک ژن انجام شد.

یافته ها: دما و باقیمانده کلر به ترتیب در ۵۰٪ و ۹۳٪ از استخرها به میزان استاندارد بود. به طور کلی ۸/۷۵٪ از نمونه آب استخرها، آلوده به آمیب با مورفولوژی نگلریا بودند. نتیجه PCR حاکی از وجود نگلریا در هفت نمونه بود. درصد آلودگی در سانس آقایان و در یک متری کناره استخر بیشتر بود. توالی محصول PCR درصد بالایی از هم پوشانی و شباهت با توالی های ثبت شده *N. australiensis* نشان داد که در بانک ژنی NCBI با شماره MT292609 به ثبت رسید.

نتیجه گیری: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که آب ۲۵٪ از استخرهای شنا در استان کرمان به نگلریا آسترالینسیس آلوده هستند. با توجه به توانایی بیماری زایی این گونه آمیب در انسان و حیوان، لازم است تمهیدات لازم برای ضد عفونی هر چه بیشتر آب استخرهای شنا توسط دست اندرکاران مسائل بهداشتی برای جلوگیری از آلودگی احتمالی اتخاذ شود.

واژگان کلیدی: آمیب های آزادی، نگلریا آسترالینسیس، استخر شنا، کرمان

Pars J Med Sci 2020;18(2):19-25

مقدمه:

ناشی از مننگوآنسفالیت آمیبی اولیه primary amoebic meningoencephalitis (PAM) محسوب می شوند. PAM به شکل آنسفالیت برق آسا و وخیم ظاهر شده و در مدت ۷-۵ روز بدون دخالت پزشکی منتهی به مرگ می شود [۳]. از سال ۱۹۷۰ *N. fowleri* علت شناخته شده مننگوآنسفالیت آمیبی اولیه در انسان معرفی شده است و تا سال ۱۹۸۱، به عنوان تنها گونه بیماری زای در جنس نگلریا مورد توجه بوده است [۴]

آمیب های آزادی میکروارگانیسم هایی هستند که در محیط های آبی زندگی و تکثیر می کنند و گسترش جهانی دارند [۱]. سازمان بهداشت جهانی چهار گونه مهم آمیب های آزادی با توانایی ایجاد عفونت های کشنده سیستم مرکزی اعصاب در انسان را *Balamuthia spp.*، *Acanthamoeba spp.*، *Naegleria spp.* و *Sappinia spp.* معرفی کرده است [۲]. در بین چهار آمیب آزادی معرفی شده، گونه های نگلریا علت بیشترین تعداد مرگ

* نویسنده مسئول، نشانی: گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران.

پست الکترونیک: SOLHJOUK@YAHOO.COM

تلفن تماس: 09171928549

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۲۵

اصلاح: ۱۳۹۹/۰۵/۲۰

دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۰۴

و [۵]. مطالعات ایمونولوژیکی و شاخص‌های ایزوآنزیمی در سال ۱۹۸۱ منجر به معرفی گونه بیماری‌زای جدیدی به نام *N. australiensis* شد که می‌تواند در انسان و حیوان باعث بروز بیماری و خیم و کشنده PAM شود [۶ و ۷]. اولین بار این گونه آمیب در سال ۱۹۷۳ در استرالیا و سپس در پژوهش‌هایی در فرانسه، آلمان و هند جدا شد [۸]. *N. australiensis* در مقایسه با *N. fowleri* توانایی بیماری‌زایی کمتری دارد [۹]، در حیوانات کمتری باعث مرگ می‌شود و به دوره کمون بیشتری برای ایجاد علائم مغزی نیاز دارد [۶].

روش کار:

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، ۸۰ نمونه آب از ۲۰ استخر شهرهای کرمان، جیرفت و کهنوج در استان کرمان در مقطع زمانی تیرماه تا شهریور ماه سال ۱۳۹۷، در دو سانس آقایان و خانم‌ها و از دو مکان استخر (یک متری دیواره و وسط استخر) جمع‌آوری شد. نمونه‌های آب درون بطری‌های شیشه‌ای ۵۰۰ میلی‌لیتری استریل جمع‌آوری و به آزمایشگاه انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی کرمان منتقل شدند. در محل نمونه‌گیری میزان کلر، pH و دمای آب نیز اندازه‌گیری شد.

هر نمونه آب پس از تکان آرام، با کمک پمپ خلاء و کاغذ واتمن با منافذ ۲/۵ میکرون فیلتر شد. کاغذ فیلتر به صورت وارونه روی محیط‌های کشت منتقل و برای جلوگیری از آلودگی و خشک شدن با پارافیلیم مسدود شد. محیط‌های کشت در دمای اتاق (۲۵-۳۰ درجه سلسیوس) انکوبه شدند. محیط کشت مورد استفاده Non nutrient agar ۱/۵٪ بود که با محلول Pages saline تهیه و با یک لایه باکتری کشته شده *Escherichia coli* پوشیده شده بود. محیط‌های کشت از روز دوم با میکروسکوپ اینورت بررسی شدند. کشت‌های مثبت اولیه، پس از کشت مجدد و تهیه کشت خالص، به منظور شناسایی مورفولوژیکی آمیب و مرحله تشخیص مولکولی استفاده شدند [۱۹]. گونه نگلریا در زیر میکروسکوپ نوری دارای کیست‌های کروی به قطر تقریبی ۱۰µm با دو دیواره کاملاً متمایز (اندوکیست و اکتوکیست‌های گرد) و یک هسته مرکزی و تروفوزوئیت‌ها دارای سیتوپلاسم گرانولار، پای کاذب تکی و حرکت مستقیم و آرام بودند [۲۰].

برای تایید جنس و شناسایی گونه نگلریا از روش PCR و تعیین توالی استفاده شد. برای این منظور پس از جمع‌آوری کیست و تروفوزوئیت آمیب از سطح محیط کشت، با استفاده از کیت شرکت کیاژن (DNAeasy kit, Qiagen, Basel, Switzerland) DNA استخراج و تایید جنس نگلریا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ITS1,2 انجام شد [۲۰]. برنامه زمانی واکنش PCR، پس از یک مرحله دناتوره اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه، به صورت ۳۵ سیکل شامل دناتوره در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، آنیلینگ در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه و طولیل شدن در دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه تنظیم شد. پس از آن با ۵ دقیقه زمان برای

مطالعات ایمونولوژیکی و شاخص‌های ایزوآنزیمی در سال ۱۹۸۱ منجر به معرفی گونه بیماری‌زای جدیدی به نام *N. australiensis* شد که می‌تواند در انسان و حیوان باعث بروز بیماری و خیم و کشنده PAM شود [۶ و ۷]. اولین بار این گونه آمیب در سال ۱۹۷۳ در استرالیا و سپس در پژوهش‌هایی در فرانسه، آلمان و هند جدا شد [۸]. *N. australiensis* در مقایسه با *N. fowleri* توانایی بیماری‌زایی کمتری دارد [۹]، در حیوانات کمتری باعث مرگ می‌شود و به دوره کمون بیشتری برای ایجاد علائم مغزی نیاز دارد [۶].

در میان گونه‌های مختلف نگلریا، علاوه بر *N. fowleri* و *N. australiensis* گونه‌های دیگری همچون *N. italica* و *N. philippinensis* برای انسان و حیوان از نظر بیماری‌زایی حائز اهمیت بوده [۱۰] و قادرند در موش PAM ایجاد کند [۱۱]. بررسی‌ها نشان داده است که این دو گونه مدل‌های حیوانی تجربی را می‌کشند [۱۲]. با توجه به این که تاکنون در خصوص *N. fowleri* در ایران گزارشی ارائه نشده است که نیاز به بررسی و پژوهش‌های بیشتر در این زمینه را تایید می‌کند، اما در رابطه با مشاهده PAM در ایران فقط یک گزارش از یک نوزاد شش ماهه وجود دارد که پس از تشخیص به طور موفقیت‌آمیز درمان شده است [۱۳].

در ایران پژوهش‌های متعددی در خصوص بررسی آلودگی استخرهای شنا، رودخانه‌ها و چشمه‌های آب گرم به آمیب‌های آزادزی انجام شده است و طی سال‌های اخیر بعضی از گونه‌های نگلریا همچون *N. pagei*, *N. fultoni*, *N. clarki*, *N. americana*, *N. dobsoni* و *N. Polaris* از منابع آب گرم معدنی شمال و شمال غرب ایران و رودخانه تفریحی تهران شناسایی شده است [۱۴-۱۶]. همچنین اولین بار *N. australiensis* در سال ۱۳۹۵ از چشمه‌های آب گرم رامسر جدا و شناسایی شد [۱۷].

اگرچه مطالعات ایمونولوژیکی و بررسی شاخص‌های ایزوآنزیمی، بیماری‌زایی *N. australiensis* را تایید کرده است [۶ و ۷]، اما توانایی بیماری‌زایی سویه ایرانی *Naegleria australiensis* که از منابع محیطی جدا شده است توسط لطیفی و همکاران [۱۸] در مدل یک موش به طور تجربی مورد بررسی قرار گرفته و مشخص شده است که این سویه می‌تواند در موش Balb/C علائم کلینیکی منگوانسفالیت ایجاد کند.

برای اطمینان از سلامت شناگران و پیشگیری از ابتلای آنان به بیماری‌های مزمن و واگیردار، اولین گام شناسایی وضعیت آلودگی‌های میکروبی استخرهاست تا با بهسازی و آموزش بهداشت از انتقال بیماری‌ها جلوگیری شود. از آن جا که آب استخرها به عنوان منبع آمیب‌های آزادزی از جمله *Naegleria*

ژنی و مقایسه آن با ژن های ثبت شده در بانک ژنی NCBI، بر اساس بیشترین تشابه، گونه آمیب شناسایی شود [۲۲]. تجزیه و تحلیل داده ها با نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و تعیین توالی ژنی با برنامه Blast در سایت NCBI انجام شد.

طول شدن در دمای ۷۲ درجه سلسیوس فرایند پایان یافت [۲۱].

از آن جایی که این پرایمرها قادرند تمامی گونه های نگلریا را مورد شناسایی قرار دهند، محصول PCR به منظور تخلیص و تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست ارسال شد تا بر اساس توالی

جدول ۱: توالی اولیگونوکلئوتیدهای پرایمرهای ITS1,2

Primer	توالی اولیگونوکلئوتیدهای	طول
Forward (ITS1)	۵'- GAACCTGCGTAGGGATCATTT-۳'	۲۱
Reverse (ITS2)	۵'- TTTCTTTTCTCCCTTATTA-۳'	۲۱

یافته ها:

بود. همچنین درصد آلودگی در یک متری کناره استخر (۱۲/۵ درصد) بیشتر از وسط استخر بود (جدول ۲)، اما اختلاف معنادار آماری بین دو سانس و یا محل نمونه گیری مشاهده نشد ($P \geq 0.05$).

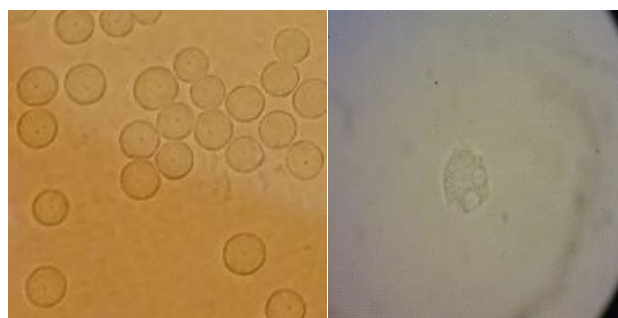
بررسی مولکولی فقط روی کشت های مثبت (۷ نمونه) انجام شد و نتایج PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی نگلریا نشان داد که محصول PCR همه کشت های مثبت روی ژل آگاروز باند 450bp تشکیل دادند (شکل ۲) که تایید کننده جنس نگلریای آمیب بودند.

از هفت نمونه محصول PCR فقط یک نمونه برای تعیین توالی ارسال شد. بررسی و مقایسه توالی محصول با توالی های ثبت شده آمیب نگلریا در ژن بانک نشان داد که این توالی درصد بالایی از هم پوشانی و شباهت با *Naegleria australiensis* دارد (جدول ۳). توالی مذکور در بانک ژنی NCBI با شماره MT292609 به ثبت رسید.

نتایج بررسی نشان داد که میانگین دما، pH و باقیمانده کلر در آب استخرهای شنا به ترتیب $2/5 \pm 30/2$ ، $0/2 \pm 7/7$ و $1/6 \pm 0/7$ ppm بود و دما و باقیمانده کلر به ترتیب در ۵۰ درصد و ۹۳/۷ درصد از استخرها به میزان استاندارد بود.

محیط های کشت مثبت با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند و تروفوزوئیت ها و کیست های نگلریا مشاهده شد (شکل ۱) در این پژوهش بر اساس مشاهده آمیب هایی با مورفولوژی نگلریا در ۸۰ نمونه آب کشت داده شده در ۷ محیط کشت، تعداد استخرها و نمونه های آب آلوده به نگلریا تعیین شدند. در این پژوهش ۲۰ استخر در هر سانس مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که سه استخر در سانس آقایان، سه استخر در سانس خانمها و یک استخرها در هر دو سانس به نگلریا آلوده بودند.

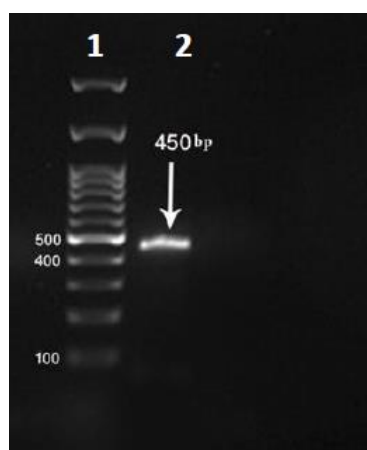
به طور کلی از ۸۰ نمونه آب استخر بررسی شده، تعداد ۷ نمونه (۸/۷۵ درصد) آلوده به نگلریا بود. درصد آلودگی به نگلریا در سانس آقایان (۱۰ درصد) بیشتر از سانس خانمها (۷/۵ درصد)



شکل ۱: تروفوزوئیت نگلریا دارای سیتوپلاسم گرانولار و پای کاذب تکی (سمت راست)؛ کیست نگلریا کروی با دو دیواره کاملا متمایز و یک هسته مرکزی (سمت چپ)

جدول ۲: درصد آلودگی استخر به نگلریا بر حسب سانس و محل نمونه گیری

P-value	جمع	خانم ها	آقایان	محل نمونه گیری	
				سانس	یک متری از دیواره استخر
۰,۹۹	۱۲,۵	۵	۷,۵	۲,۵	وسط استخر
	۵	۲,۵	۲,۵		



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی نگلریا (ITS1,2) لاین یک: مارکر- 100 bp و لاین دو: باند 450bp

جدول ۳: مقایسه توالی محصول PCR با توالی های ثبت شده در ژن بانک

Accession N	Strain	Query Coverage	Identity
KU380481.1	<i>Naegleria australiensis</i>	95%	100%
LC191897.1	<i>Naegleria australiensis</i>	94%	100%
GU597033.1	<i>Naegleria australiensis</i>	95%	99%
GU597027.1	<i>Naegleria australiensis</i>	95%	99%
AB128053.1	<i>Naegleria australiensis</i>	95%	99%
GU597029.1	<i>Naegleria australiensis</i>	95%	99%
KU380488.1	<i>Naegleria australiensis</i>	96%	99%

بحث:

کمتری از کلر باقیمانده به صورت اسید هیپوکلروس در می آید و قدرت گندزدایی کلر کاهش می یابد [۲۳].

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که از ۸۰ نمونه آب جمع آوری شده تعداد ۷۵ نمونه (۹۳/۷ درصد) دارای میزان باقیمانده کلر استاندارد بودند. همچنین ۴۰ نمونه آب (۵۰ درصد) دارای دمای استاندارد

پارامترهای فیزیکی و شیمیایی همچون pH و کلر باقیمانده در کیفیت آب استخرها بسیار مهم هستند. زمانی که کلر آزاد باقیمانده کمتر از ۰/۴ میلی گرم در لیتر و pH بین ۸/۹- می باشد، فعالیت میکروارگانیسمها در آب استخرها افزایش می یابد. این بدان علت است که با افزایش pH آب استخر، درصد

آمیب همچون دو پژوهش یادشده از روش های مولکولی PCR و بررسی و مقایسه توالی ژنومی به کمک بانک ژنی NCBI استفاده شده است.

گزارش جداسازی و شناسایی این گونه آمیب نگلریا از آب استخرهای شنا در ایتالیا [۲۶] به روش سرولوژی آنتی بادی فلورسنت غیرمستقیم و از آب دریاچه ای بزرگ در فلیپین به روش مولکولی [۳۲] نیز وجود دارد.

نتیجه گیری:

نتایج این پژوهش برای اولین بار شناسایی آلودگی به نگلریا استرالینسیس به روش مولکولی در استخرهای شنا در ایران و در استان کرمان را نشان داد. مشخص شد که آب ۲۵ درصد از استخرهای شنا در استان کرمان آلوده به نگلریا استرالینسیس است. اگرچه آلودگی در سانس آقایان و در یک متری نزدیک دیواره استخر بیشتر بود، اما تفاوت معنادار آماری بین نتایج مشاهده نشد. از آن جایی که بیماری زایی این گونه آمیب در انسان و حیوان تأیید شده است، لازم است تمهیدات لازم و کافی برای ضدعفونی و گندزدایی هر چه بیشتر آب استخرهای شنا توسط دست اندرکاران بهداشتی و مسئولین مراکز ورزشی و تفریحی اتخاذ شود تا از آلودگی احتمالی جلوگیری شود.

تشکر و قدردانی:

این مقاله بخشی از پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جهرم است که با بودجه پژوهشی این دانشگاه و طرح مصوب به شماره ۱۲۷/۹۶ و کد اخلاق IR.JUMS.REC.1396.139 انجام شده است. بدین وسیله از همکاری مدیریت و اعضای محترم گروه انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی کرمان در انجام پژوهش و همچنین اداره ورزش و جوانان استان کرمان در جمع آوری نمونه ها همچنین از واحد توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان پیمانیه شهرستان جهرم جهت همکاری در اجرای این مقاله تشکر و قدردانی می شود.

(محدوده دمایی ۲۸-۲۶ درجه سلسیوس) و ۷۸ نمونه (۹۷/۵ درصد) از نظر pH اندازه گیری شده در محدوده استاندارد (۸-۷/۲) بودند. در عین حال بر اساس نتایج سایر پژوهش ها، کلر آزاد با غلظت استاندارد قادر به از بین بردن این آمیبها نیست [۲۴]. نتایج این پژوهش نشان داد که از ۲۰ استخر بررسی شده، ۲۵ درصد آلوده به نگلریا بودند، در حالی که در پژوهش ایتو و همکاران [۲۵] در مالزی از ۱۴ استخر بررسی شده ۵۷/۱۴ درصد آلوده به نگلریا بودند. درصد آلودگی در ۳۰ استخر آب گرم بررسی شده در ایتالیا [۲۶] این میزان ۱۰ درصد بود.

درصد آلودگی به نگلریا در نمونه های آب استخر پژوهش حاضر ۸/۷۵ درصد و بیشتر از پژوهش ایتو و همکاران در مالزی (۵/۷۵ درصد) و کمتر از نمونه های آب گرم استخرهای شنای ایتالیا (۲۳/۳۳ درصد) بود. این نتایج نشان می دهد که آب بیشتر استخرهای شنا به آمیب نگلریا آلوده هستند و تفاوت درصد آلودگی در پژوهش های مختلف می تواند به روش های مختلف نمونه گیری، حجم نمونه، فرآیند آماده سازی نمونه و فصل نمونه گیری مرتبط باشد.

درصد آلودگی به نگلریا در یک متری کناره استخر در پژوهش حاضر و پژوهش ایتو و همکاران در مالزی بیشتر از میانه استخر بود. این درصد در پژوهش حاضر (۱۲/۵ درصد) بیشتر از پژوهش انجام شده در مالزی (۱۰/۷۱ درصد) بود. این موضوع می تواند به تجمع بیشتر شناگران در کنار استخر مرتبط باشد.

آلودگی آب به آمیب نگلریا در ایران در پژوهش های متعدد و نمونه های آب مختلفی بررسی شده است. درصد آلودگی به نگلریا در آب های تفریحی ایلام ۶۴ درصد [۲۷]، در چشمه های آب گرم شمال ایران ۵۴ درصد [۲۸]، در آب رودخانه های تفریحی تهران ۲۰ درصد [۲۹] و در چشمه های آب گرم استان اردبیل ۲۶/۷ درصد [۳۰] گزارش شده است و کمتر به شناسایی گونه نگلریا پرداخته شده است.

گزارش های مختلفی از شناسایی و جداسازی *Naegleria australiensis* از چشمه های آب گرم شمال ایران [۲۸] و چشمه های معدنی استان گیلان [۳۱] وجود دارد، اما پژوهش حاضر اولین گزارش از جداسازی و شناسایی این گونه از استخرهای شنا در ایران است که در آن برای تعیین جنس و گونه

References:

1. Scheikl U, Sommer R, Kirschner A, Rameder A, Schrammel B, Zweimüller I, et al. Free-living amoebae (FLA) co-occurring with legionellae in industrial waters. *Eur J Protistol*. 2014;50(4):422-9
2. World Health Organization. Guidelines for Safe Recreational Water, Coastal and Fresh Waters WHO, Geneva, Switzerland. ۲۰۰۲; Vol. 1,
3. Visvesvara, GS, Moura, H. & Schuster, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* ۲۰۰۷; 50 (1), 1-26.
4. Carter, R. F. Description of a *Naegleria* sp. Isolated from two cases of primary amoebic

- meningoencephalitis, and the experimental pathological changes induced by it. *J. Pathol.* 1970; 100:217-244.
5. Ferrante A. Experimental pneumonitis induced by *Naegleria fowleri* in mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981; 75(6):907-8.
 6. De Jonckheere, J. F. *Naegleria australiensis* sp. nov., another pathogenic *Naegleria* from water. *Protistologica* 1981; 17:423-429.
 7. Visvesvara GS, Sriram R, Qvarnstrom Y et al. *Paravahlkampfia francinae* n. sp. masquerading as an agent of primary amoebic meningoencephalitis. *J Eukaryot Microbiol.* 2009; 56(4):357-66.
 8. Michel, R., and J. De Jonckheere. Erster Nachweiseiner pathogenen *Naegleria*-Art (*N. australiensis* De Jonckheere 1981) in Deutschland. *Z. Parasitenkd.* 1983; 69:395-396.
 9. Scaglia M, Gatti S, Cevini C et al. *Naegleria australiensis* ssp. *italica*: experimental study in mice. *Exp Parasitol.* 1989; 69(3):294-9.
 10. Visvesvara GS. Infections with free-living amoebae. *Handb Clin Neurol.* 2013; 114:153-68.
 11. De Jonckheere JF, Aerts M, Martinez AJ. *Naegleria australiensis*: experimental meningoencephalitis in mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983; 77(5):712-6.
 12. De Jonckheere JF. What do we know by now about the genus *Naegleria*? *Exp Parasitol.* 2014; 145 Suppl: S2-9.
 13. Movahedi Z, Shokrollahi MR, Aghaali M, Heydari H. Primary amoebic meningoencephalitis in an Iranian infant. *Case Rep Med.* 2012; 2012:782854.
 14. Niyyati M, Lasjerdi Z, Zarein-Dolab S et al. Morphological and Molecular Survey of *Naegleria* spp. in Water Bodies Used for Recreational Purposes in Rasht city, Northern Iran. *Iran J Parasitol.* 2015; 10(4):523-9.
 15. Solgi R, Niyyati 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):47-52.
 16. Niyyati M, Lasjerdi Z, Nazar M et al. Screening of recreational areas of rivers for potentially pathogenic free-living amoebae in the suburbs of Tehran, Iran. *J Water Health.* 2012; 10(1):140-6.
 17. Latifi AR, Niyyati M, Lorenzo-Morales J et al. Occurrence of *Naegleria* species in therapeutic geothermal water sources, Northern Iran. *Acta Parasitol.* 2017; 62(1):104-109.
 18. Latifi A, Niyyati M, Tabaei SJ, Biderouni FT, Haghghi A, Lasjerdi Z. An Experimental Model of Primary Amoebic Meningoencephalitis Due to *Naegleria australiensis* in Iran. *Iran J Parasitol.* 2018 Jul;13(3):369.
 19. Solgi R., Niyyati M., Haghghi A., Taghipour N., Tabaei S.J., Eftekhari M., et al. Thermotolerant *Acanthamoeba* spp. isolated from therapeutic hot springs in northwestern Iran. *J Water and Health.* 2012; 10:650–656. DOI: 10.2166/wh.2012.032
 20. Page F.C. 1988. A new key to freshwater and soil gymnamoebae: with instructions for culture. Ambleside, Cumbria, England, pp 92–96.
 21. Pe'landakis M, Serre S, Pernin P (2000) Analysis of the 5.8S rRNA gene and the internal transcribed spacers in *Naegleria* spp. and in *N. fowleri*. *J Eukaryot Microbiol.* 47: 116–121.
 22. Caumo K, Rott MB. *Acanthamoeba* T3, T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. *Acta tropica.* 2011 Mar 1; 117(3):233-5.
 23. Seyfried PL, Fraser DJ. Persistence of *Pseudomonas areuginosa* in chlorinated swimming pools. *Can J Microbiol.* 1980; 26(3): 350-5.
 24. Rasti S, Assadi MA, Iranshahi L, Saffari M, Gilasi HR, Pourbabaee M. Assessment of microbial contamination and physicochemical condition of public swimming pools in Kashan, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* (2012), 5: 450-455. DOI: 10.5812/jjm.2478
 25. Ithoi I, Lau YL, Fadzlan AA, Foad AI, Neilson RS, Nissapatorn V. Detection of free living amoebae, *Acanthamoeba* and *Naegleria*, in swimming pools, Malaysia. *Tropical Biomedicine.* 2010;27(3):566-77.
 26. Scaglia M, Strosselli M, Grazioli V, Gatti S, Bernuzzi AM, De Jonckheere JF. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria australiensis* (Amoebida, Vahlkampfiidae) from a spa in northern Italy. *Appl Environ Microbiol.* 1983 Dec 1;46(6):1282-5.
 27. Niyyati M, Saberi R, Lorenzo-Morales J, Salehi R. High occurrence of potentially-pathogenic free-living amoebae in tap water and recreational water sources in South-West Iran. *Trop Biomed.* 2016 Mar 1;33(1):95-101.
 28. Latifi AR, Niyyati M, Lorenzo-Morales J, Haghghi A, Tabaei SJ, Lasjerdi Z, Azargashb E. Occurrence of *Naegleria* species in therapeutic geothermal water sources, Northern Iran. *Acta Parasitologica.* 2017 Jan 1;62(1):104-9.
 29. Niyyati M, Lasjerdi Z, Nazar M, Haghghi A, Nazemalhosseini Mojarad E. Screening of recreational areas of rivers for potentially pathogenic free-living amoebae in the suburbs of Tehran, Iran. *J water and health.* 2012 Mar;10(1):140-6.
 30. Solgi R, Niyyati 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.
 31. 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. *J Water and Health.* 2020 Feb;18(1):60-6.
 32. Milanez G, Masangkay F, Somsak V, Kotepui M, Tangpong J, Karanis P. Occurrence and the first report of *Naegleria australiensis* presence in a major lake in the Philippines. *J water and health.* 2019 Aug 1;17(4):647-53.

Detection of *Naegleria* and Identification of *Naegleria australiensis* from Swimming pools in Kerman Province

Raheleh Eftekhari-Kenzerki¹, Kavous Solhjoo^{*1,2}, Zahra Babaei³, Hassan Rezanezhad^{1,2}
Ahmad Abolghazi¹

Received: 2020.07.25

Revised: 2020.08.10

Accepted: 2020.08.15

1. Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran
2. Zoonoses Research Center, School of Medicine, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran
3. Leishmaniasis Research Center, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.18, No.2, Summer 2020

Pars J Med Sci 2020;18(2):19-25

Abstract:

Introduction:

Among the free living amoeba, *Naegleria fowleri* and *Naegleria australiensis* are considered as the cause of death due to primary amoebic meningoencephalitis (PAM). As the water of swimming pools are the sources of free living amoeba, this study conducted to detection of *Naegleria* and identification of *N.australiensis* from swimming pools.

Materials and Methods:

Eighty water samples were collected from 20 swimming pools of Kerman province in summer 2018 and the residual chlorine, pH and temperature were measured, then filtered and cultured. After morphological identification of amoeba, genus identification and species confirmation were performed by PCR and comparison of PCR product sequence in gene bank, respectively.

Results:

The temperature and residual chlorine of water were at standard level in 50% and 93.7%, respectively. Overall 8.75% of water swimming pool samples were contaminated with amoeba with similar morphology to *Naegleria*. The results of PCR were confirmed the present of *Naegleria* in 7 samples. The contamination percent was higher in men timetable (10%) and in one meter of wall of swimming pools (12.5%). Comparison of PCR products showed the high percentages of Identity and Query Coverage with recorded sequences of *N.australiensis* and it was deposited in NCBI with accession number MT292609.

Conclusion:

The present research showed that 25% of swimming pools in Kerman province are contaminated with *N. australiensis*. Regarding to the pathogenic potential of *N. australiensis* for human and animals, it is necessary, the health workers think about for more disinfection of swimming pools water for preventing of possible infection.

Keywords: Free living amoeba, *Naegleria australiensis*, Swimming pool, Kerman

* Corresponding author Email: solhjoo@jums.ac.ir