

Jurnal Sains Kesihatan Malaysia 8 (2) 2010: 15-19

Kertas Asli/Original Article

Pemencilan *Acanthamoeba* spp. daripada Persekitaran Akuatik
[Isolation of *Acanthamoeba* spp. from Aquatic Environment]

NURUL FARIZA ROSSLE, MOHAMED KAMEL ABD GHANI, ANISAH NORDIN, YUSOF SUBOH & NORAINA AB RAHIM

ABSTRAK

Kajian ini dijalankan untuk memencilkan Acanthamoeba spp. daripada pelbagai persekitaran akuatik di Semenanjung Malaysia. Sebanyak 160 sampel diambil dengan 140 sampel menggunakan kaedah swab manakala 20 sampel lagi menggunakan kaedah pensampelan air dengan botol Schott 500 ml yang steril. Sampel swab diambil daripada kepala paip air (50), sinki (50), serta kolam renang (40) manakala sampel air diambil dari laut. Sampel swab diinokulasi secara terus ke atas agar tanpa nutrien (NNA) yang dilapisi dengan Escherichia coli matian haba secara aseptik. Sampel air dituras menggunakan membran turas bersaiz liang 0.45 µm sebelum membran turas itu dipindahkan secara aseptik ke atas piring NNA yang dilapisi dengan E. coli matian haba. Semua piring dieram pada suhu 30°C dan diperiksa setiap hari untuk kehadiran Acanthamoeba spp. sehingga hari ke-14 sebelum disahkan negatif. Secara keseluruhannya, terdapat 20% sampel yang positif untuk kehadiran Acanthamoeba. Acanthamoeba spp. paling banyak dipencilkan daripada sampel air laut dengan peratusan sebanyak 40% manakala paling sedikit dipencilkan daripada swab paip air dengan peratusan sebanyak 4% sahaja. Pencilan positif Acanthamoeba spp. daripada sinki dan kolam renang masing-masing adalah 20% dan 30%. Ketiga-tiga kumpulan genus Acanthamoeba dalam bentuk sista dapat ditemui dalam sampel yang diambil.

Kata kunci: Isolasi Acanthamoeba; kolam renang; air laut

ABSTRACT

This study was carried out to isolate Acanthamoeba spp. from various aquatic environments in Peninsular Malaysia. A total of 160 samples were collected with 140 samples using direct swab method and 20 samples using water collection method with 500 ml sterile Schott bottle. The swab samples were taken from water tap (50), sink (50), and swimming pool (40) while the water samples were from seawater. Swab samples were inoculated directly onto non-nutrient agar (NNA) seeded with heat-killed Escherichia coli using aseptic technique. Water samples were first filtered through a 0.45 µm pore size membrane before the membrane was transferred aseptically onto NNA plate seeded with heat-killed E. coli. All plates were incubated at 30°C and examined daily for the presence of Acanthamoeba spp. up to 14 days after incubation before being declared negative. Overall, 20% samples were positive for the presence of Acanthamoeba. Positive isolation of Acanthamoeba spp. from sink and swimming pool were 20% and 30%, respectively. All three groups of Acanthamoeba genus in cyst form could be found from the collected samples.

Keywords: Isolation of Acanthamoeba; swimming pool; seawater

PENDAHULUAN

Acanthamoeba ialah protozoa hidup bebas yang boleh menjadi parasit oportunistik yang tersebar secara meluas pada persekitaran. *Acanthamoeba* telah berjaya dipencilkan daripada air tawar, paya, air laut, pasir pantai, air kumbahan, air mineral, air suling, tanah, pasu bunga, paip air, sinki, kepala paip mandian, air mandian hidroterapi, paip pengudaraan, pendingin hawa, kolam renang, paip basuhan mata keceemasan di makmal, serta larutan salin kanta sentuh. Disebabkan itu, *Acanthamoeba* telah dilabel sebagai salah satu organisma yang mempunyai sebaran kosmopolitan dan boleh ditemui hampir di mana-mana (De Jonckheere 1991; Khan & Paget 2002; Kilvington & White 1994; Ma et al. 1990).

Kitar hidup *Acanthamoeba* terdiri daripada dua peringkat iaitu peringkat trofozoit yang aktif dan bereplikasi serta peringkat sista yang dorman dan rintang terhadap keadaan persekitaran yang tidak sesuai (Martinez 1985 & Page 1988). Di Malaysia, sebaran *Acanthamoeba* telah dikenal pasti di beberapa kawasan di Semenanjung Malaysia termasuk air laut, air sawah, air sungai, dan air tasik (Anisah et al. 2004; Marliana 2007; Mohd Hasrul 2004; Nurulhuda 2002). Walaupun begitu, terdapat banyak lagi kawasan di Malaysia yang belum dikaji kehadiran organisma ini dan risikonya untuk menjadi patogen kepada manusia.

Punca *Acanthamoeba* spp. daripada paip air domestik dalam keratitis *Acanthamoeba* telah dijelaskan buat pertama kalinya pada tahun 1990 (Kilvington et al. 1990). Ramai pesakit keratitis mengaku membasuh atau menyimpan kanta

sentuh dalam larutan salin yang bercampur dengan air paip, menguatkan lagi hujah yang air paip meningkatkan faktor risiko untuk mendapat jangkitan keratitis (Kilvington et al. 1990; Radford et al. 2002; Stehr-Green et al. 1989).

Oleh sebab kerintangan tinggi sista *Acanthamoeba* terhadap keadaan persekitaran yang tidak sesuai bagi kebanyakan mikroorganisma lain untuk berploriferasi dan saiznya yang kecil, organisma ini dapat tersebar secara meluas di persekitaran dan boleh dipencilkan daripada udara, air dan tanah (Ma et al. 1990). Justeru itu, sebaran protozoa ini perlu dikaji dan dikenal pasti untuk membentuk kaedah pencegahan dan pengawalan risiko daripada mendapat jangkitan *Acanthamoeba* di sesuatu kawasan.

BAHAN DAN KAEDAH

PENGAMBILAN SAMPEL

Sebanyak 50 sampel swab paip air dan 50 sampel swab sinki diambil dari beberapa lokasi berbeza di Kolej Kediaman UKM, Kuala Lumpur. Sampel diambil dengan menggores bahagian dalam kepala paip dan permukaan mangkuk sinki menggunakan swab kapas steril. Sebanyak 40 sampel swab dinding kolam renang diambil dari beberapa lokasi berbeza di kawasan kolam renang awam di Setapak, Kuala Lumpur dan Tambun, Perak. Sampel diambil dengan menggores dinding kolam renang menggunakan swab kapas steril. Sebanyak 20 sampel air laut diambil menggunakan botol Schott 500 ml dari beberapa lokasi berbeza di Pantai Kuala Linggi, Negeri Sembilan dan Tanjung Bidara, Melaka.

PEMROSESAN SAMPEL

Kaedah pemrosesan sampel diubah suai daripada kaedah Khan et al. (2001) dan Khan & Paget (2002). Sampel air yang diambil menggunakan botol Schott 500 ml dituras menggunakan pam vakum dengan membran turas berdiameter 47 mm dengan saiz liang 0.45 μ m. Setelah penurasan selesai, membran turas dipindahkan menggunakan forsep yang steril dan diletakkan secara terbalik di atas piring agar tanpa nutrien yang mengandungi *E. coli* matian haba. Sampel swab diambil dengan menggores permukaan yang dikehendaki sebelum swab dikultur secara aseptik pada agar tanpa nutrien yang mengandungi *E. coli* matian haba. Piring agar dililit kedap menggunakan parafilm dan dieram pada suhu 30°C. Sampel diperiksa di bawah mikroskop keterbalikan selama 14 hari sebelum disahkan negatif jika tiada pertumbuhan *Acanthamoeba*. Subkultur dilakukan jika terdapat sebarang kontaminasi oleh mikroorganisma lain.

PENGESAHAN *ACANTHAMOEBA* SP.

Acanthamoeba spp. yang dipencilkan disahkan melalui perisian 'Image Analysis with Video TesT 4.0' (Ista-Video

TesT, Rusia) menggunakan kamera video berwarna yang dipasang bersama mikroskop kompaund (Leica, Jepun).

Bagi melihat morfologi dan mengesahkan trofozoit atau sista *Acanthamoeba* spp., sediaan basah dilakukan. Beberapa titis larutan PAS dititiskan pada kawasan piring NNA yang mengandungi *Acanthamoeba* spp. yang telah ditandakan sebelumnya. Gegelung dawai yang steril disapu di atas permukaan agar untuk menanggalkan *Acanthamoeba* spp. Larutan PAS yang mengandungi *Acanthamoeba* spp. diambil menggunakan gegelung dawai dan diletakkan di atas slaid kaca sebelum dilitupi dengan slip kaca. Apusan sista dititiskan dengan metilena biru 0.01% untuk pewarnaan. Slaid dilihat di bawah fasa kontras mikroskop kompaun pada pembesaran x1000 bagi trofozoit dan fasa normal bagi sista.

KEPUTUSAN

Sebanyak 32 daripada 160 sampel yang diambil adalah positif bagi kehadiran *Acanthamoeba* spp. Jumlah ini merangkumi 20% daripada bilangan sampel keseluruhan. Bilangan dan peratusan sampel positif ditunjukkan dalam Jadual 1. mengikut lokasi pemencilan. Terdapat pertumbuhan *Acanthamoeba* spp. pada kesemua piring agar kawalan positif menunjukkan bahawa sista *Acanthamoeba* spp. yang digunakan adalah *viable*. Bagi piring agar kawalan negatif pula, tiada pertumbuhan *Acanthamoeba* spp. dapat diperhatikan sepanjang jangka masa ujian menunjukkan bahawa media yang digunakan tidak terkontaminasi. Hasil kultur kawalan positif dan kawalan negatif ditunjukkan dalam Jadual 2.

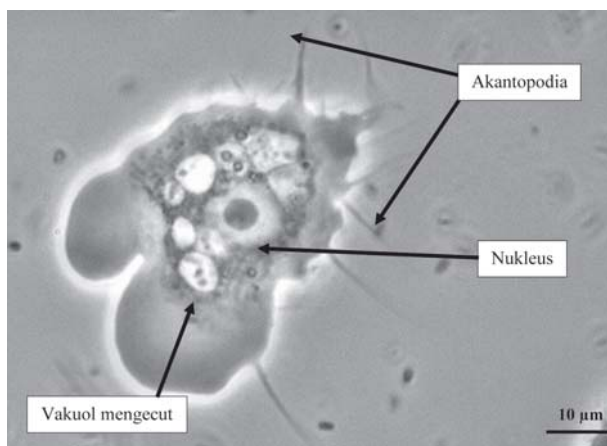
JADUAL 1. Pemencilan *Acanthamoeba* spp. daripada sampel persekitaran

Jenis sampel	Bilangan sampel positif <i>Acanthamoeba</i> sp. / Jumlah keseluruhan sampel	Peratus sampel positif <i>Acanthamoeba</i> sp. (%)
Swab paip air	2/50	4
Swab sinki	10/50	20
Air laut	8/20	40
Swab kolam renang	12/40	30

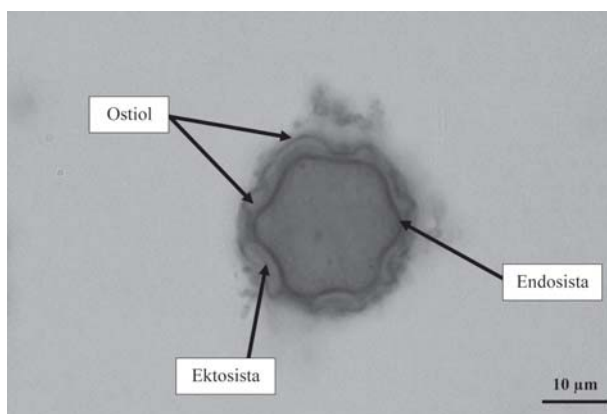
JADUAL 2. Hasil pengkulturan piring agar kawalan positif dan kawalan negatif

	Sampel pemencilan	Sampel kawalan positif	Sampel kawalan negatif
Kultur positif	32	5	0
Kultur negatif	128	0	5
Jumlah keseluruhan	160	5	5

Secara amnya, trofozoit *Acanthamoeba* spp. menunjukkan kehadiran akantopodia, nukleus tunggal, vakuol mengecut yang muncul setiap 30-60 saat, vakuol makanan berisi bakteria, serta saiz keseluruhan di antara 20-40 μm . Contoh trofozoit yang berjaya dipencilkan ditunjukkan pada Rajah 1. Sista *Acanthamoeba* spp. yang berjaya dipencilkan pula mempunyai ciri am seperti kehadiran ostiol, dua lapisan dinding sista, serta bersaiz di antara 10-20 μm . Namun begitu, terdapat perbezaan pada bentuk endosista dan ektosista bagi sampel yang dipencilkan, menunjukkan *Acanthamoeba* yang dipencilkan adalah terdiri daripada pelbagai spesies berbeza. Contoh sista yang berjaya dipencilkan ditunjukkan pada Rajah 2. Kumpulan sista yang berjaya dipencilkan pula dirumuskan dalam Jadual 3.



RAJAH 1. Peringkat trofozoit fasa kontras di bawah pembesaran x1000. Unjuran akantopodia, vakuol mengecut dan nukleus ditunjukkan oleh anak panah



RAJAH 2. Peringkat sista pewarnaan metilena biru di bawah pembesaran x1000. Sista adalah jenis Kumpulan II. Ektosista beralun, endosista yang tebal dan ostiol yang menghubungkan ektosista dan endosista ditunjukkan oleh anak panah

JADUAL 3. Pengelasan pencilan *Acanthamoeba* spp. berdasarkan morfologi sista

Jenis sampel	Kumpulan sista		
	I (Astronyxids)	II (Polyphagids)	III (Culbertsonids)
Swab paip air	-	-	+
Swab sinki	+	+	+
Air laut	-	+	+
Swab kolam renang	+	+	+

Petunjuk:

'+' hadir/positif
'-' tiada/negatif

PERBINCANGAN

Berdasarkan keputusan kajian, *Acanthamoeba* spp. dapat dipencilkan daripada kesemua tempat pensampelan, iaitu paip air, sinki, air laut, dan kolam renang. Pengenalan *Acanthamoeba* spp. dilakukan dengan melihat morfologi kedua-dua peringkat kitar hidup protozoa ini. Trofozoit adalah peringkat aktif bagi *Acanthamoeba* spp. dan dibezakan dengan trofozoit ameba hidup bebas lain melalui kehadiran vakuol mengecut yang muncul setiap 30-60 saat dan struktur unjuran pseudopodia berbentuk jejaram yang disebut akantopodia (Khan 2006). Peringkat dorman *Acanthamoeba* spp. dicirikan dengan pembentukan sista yang mempunyai dua lapisan dinding iaitu ektosista dan endosista (Khan 2006; Page 1988).

Morfologi sista adalah lebih banyak digunakan dalam pengenalan dan pengelasan *Acanthamoeba* berbanding morfologi trofozoit (Page 1988; Pussard & Pons 1977). Ektosista dan endosista dihubungkan melalui liang ostiol yang diliputi oleh plag mukus yang dipanggil operkulum. Ostiol berperanan untuk mengesan perubahan keadaan persekitaran *Acanthamoeba* dan merangsang permulaan proses eksistasi apabila keadaan yang bersesuaian ditemui (Khan 2006). Percantuman antara ektosista dan endosista membentuk struktur morfologi yang digunakan sebagai asas pengelasan sista *Acanthamoeba* kepada tiga kumpulan (Pussard & Pons 1977). Kumpulan I (Astronyxids) mempunyai sista yang besar dengan diameter 18 μm atau lebih dengan endosista berbentuk bintang. Kumpulan II (Polyphagids) mempunyai diameter sista kurang daripada 18 μm dengan endosista berbentuk poligon dan ektosista yang beralun. Kumpulan III (Culbertsonids) mempunyai endosista berbentuk bulat dengan diameter sista kurang daripada 18 μm (De Jonckheere 1987; Page 1988; Pussard & Pons 1977; Visvesvara 1991).

Berdasarkan hasil yang diperolehi, sampel swab sinki dan sampel swab kolam renang menunjukkan kehadiran ketiga-tiga kumpulan morfologi sista seperti yang dikelaskan oleh Pussard dan Pons (1977). Kumpulan II dan III dapat dipencilkan daripada sampel air laut manakala hanya Kumpulan III sahaja yang berjaya dipencilkan

daripada swab paip air. Sehingga kini kumpulan II dan III telah dipencilkan daripada spesimen klinikal tetapi belum lagi bagi kumpulan I. Dalam kajian ini, terdapat beberapa sampel yang mempunyai lebih daripada satu jenis kumpulan *Acanthamoeba* yang dapat dipencilkan pada masa yang sama. Ini menunjukkan *Acanthamoeba* mempunyai taburan yang meluas dan tidak terhad kepada satu spesies bagi satu kawasan sahaja.

Air laut mempunyai peratusan pemencilan *Acanthamoeba* yang paling tinggi dengan 40% sampel positif berbanding kawasan lain ($p < 0.05$). Ini disebabkan air laut mempunyai sumber makanan yang banyak untuk *Acanthamoeba* pada lapisan mikro yang terdapat di atas permukaan air (Preston et al. 2001; Sawyer et al. 1982). Sumber makanan *Acanthamoeba* yang utama adalah bakteria (Weekers et al. 1993) namun alga, yis (Allen & Dawidowicz 1990), serta protista dan fitoplankton lain juga menjadi makanannya. Kyle dan Noblet (1985) mendapati *Acanthamoeba* spp. dapat dipencilkan dengan banyak pada kawasan yang padat dengan bahan partikulat dan sedimen seperti air laut dan air tasik. Bagi kajian ini, air laut diambil berhampiran permukaan untuk mengelakkan kemasukan terlalu banyak pasir dan sedimen pantai kerana boleh menyukarkan pengenalpastian *Acanthamoeba* di bawah mikroskop.

Sampel swab kolam renang mempunyai peratusan pemencilan kedua terbanyak iaitu 30%. Ini mungkin disebabkan *Acanthamoeba* telah dapat beradaptasi di dalam air berklorin, sekaligus menunjukkan ketinggian kebolehan kelenturan ekologi organisma ini. Tambahan pula, sista *Acanthamoeba* dapat bertahan pada kepekatan klorin sehingga 100 mg/l (Storey et al. 2004) tetapi kepekatan klorin maksimum yang dibenarkan oleh Persatuan Kesihatan Sedunia (WHO) (2006) untuk disinfeksi kolam renang awam hanyalah pada aras 3 mg/l. Walaupun masih terdapat kekurangan hasil epidemiologi, John (1993) berpendapat bahawa kolam renang berklorin mungkin akan menjadi salah satu nic baru untuk jangkitan ameba hidup bebas. Beberapa disinfektan alternatif telah diuji terhadap ameba hidup bebas untuk ditambah kepada air seperti Baquacil (hidroklorida bikuanida poliheksametilena), sianurat berklorin, serta klorin dioksida (Marciano-Cabral 1988).

Dalam kajian ini, *Acanthamoeba* spp. dapat dipencilkan daripada 4% sampel swab paip air, menunjukkan yang kontaminasi *Acanthamoeba* boleh berpunca daripada air yang telah dirawat. Nilai ini adalah tinggi sedikit daripada 2.38% yang dilaporkan oleh Anisah et al. pada tahun 2003. Walau bagaimanapun, nilai ini adalah lebih rendah jika dibandingkan dengan laporan daripada negara lain, mungkin disebabkan oleh penggunaan saiz sampel yang lebih kecil. Jeong dan Yu (2005) menjumpai *Acanthamoeba* spp. pada 7.7% sampel air paip di daerah Pusan, Korea. Boost et al. (2008) mendapati *Acanthamoeba* pada 10% sampel air paip di Hong Kong manakala Seal et al. (1992) berjaya memencilkan *Acanthamoeba* daripada 12% sampel air paip di Scotland. Kehadiran lapisan biofilm di bahagian dalam paip air mungkin menyumbang kepada kewujudan

Acanthamoeba serta organisma patogen lain dalam air paip (Kilvington et al. 2004). Tangki air domestik yang tidak diurus dengan baik dan tanpa pantauan berkala boleh menjadi tempat pengkolonian mikroorganisma merbahaya, termasuklah *Acanthamoeba* spp. dan seterusnya tersebar sehingga ke paip-paip air yang dibekal oleh tangki tersebut (Kilvington et al. 2004; Seal et al. 1992).

Berbeza dengan swab paip air, swab pada permukaan sinki berjaya memencilkan *Acanthamoeba* daripada 30% sampel. Ini adalah kerana sista *Acanthamoeba* boleh disebarkan melalui udara (Kingston & Warhurst 1969) dan terlekat di atas sinki melalui tarikan graviti. Selain itu, sinki yang jarang dibersihkan akan mempunyai banyak fungus dan bakteria berdasarkan prinsip yang sama dengan sebaran sista dan menjadi sumber makanan bagi *Acanthamoeba* seterusnya meningkatkan lagi jumlah protoza yang mengkoloni permukaan sinki.

Daripada hasil pemencilan *Acanthamoeba* yang didapati, taburan dan prevalens *Acanthamoeba* spp. di kawasan pensampelan yang dikaji dapat dilihat dengan jelas. Namun begitu, hasil dari kajian ini sahaja adalah tidak mencukupi untuk mengkaji taburan *Acanthamoeba* di Malaysia, dan harus digabungkan dengan maklumat-maklumat yang diperolehi daripada kajian terdahulu serta masa hadapan untuk mendapat skop geografi yang lebih meluas dan terperinci.

KESIMPULAN

Acanthamoeba spp. telah berjaya dipencilkan daripada pelbagai persekitaran akuatik seperti paip air, sinki, air laut dan kolam renang dengan peratusan paling tinggi daripada sampel air laut. Ketiga-tiga kumpulan *Acanthamoeba* spp. hadir pada pencilan persekitaran akuatik yang didominasi oleh Kumpulan II dan III, yang juga merupakan kumpulan yang sering menyebabkan jangkitan pada manusia.

RUJUKAN

- Allen, P.G. & Dawidowicz, E.A. 1990. Phagocytosis in *Acanthamoeba*: a mannose receptor is responsible for the binding and phagocytosis of yeast. *Journal of Cellular Physiology* 145: 508-513.
- Anisah, N., Yusof, S., Wan Norliana, A., Noraina, A.R. & Norhayati, M. 2004. *Acanthamoeba* sp. isolated from salt water in the west coast of peninsular Malaysia. *Tropical Biomedicine* 21(1): 109-111.
- Boost, M., Cho, P., Lai, S. & Sun, W.M. 2008. Detection of *Acanthamoeba* in tap water and contact lens cases using polymerase chain reaction. *Optometry and Vision Science* 85(7): 526-530.
- De Jonckheere, J.F. 1987. Taxonomy. Dlm. *Amphizoic Amoebae Human Pathology*, Rondanelli, E.G. (pnyt.). Italy: Piccin Nuova Libreria.
- De Jonckheere, J.F. 1991. Ecology of *Acanthamoeba*. *Reviews of Infectious Diseases* 13: S385-387.

- Jeong, H.J. & Yu, H.S. 2005. The role of domestic tap water in *Acanthamoeba* contamination in contact lens storage cases in Korea. *The Korean Journal of Parasitology* 43(2): 47-50.
- John, D.T. 1993. Opportunistically pathogenic free-living amoebae. Dlm. *Parasitic Protozoa*. Krier, J.P. & Baker, J.R. (pnyt.). San Diego: Academic Press.
- Khan, N.A. 2006. *Acanthamoeba*: Biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiological Reviews* 30: 564-595.
- Khan, N.A. & Paget, T.A. 2002. Molecular tools for speciation and epidemiological studies of *Acanthamoeba*. *Current Microbiology* 44: 444-449.
- Khan, N.A., Jarroll, E.L. & Paget, T.A. 2001. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. *Current Microbiology* 43: 204-208.
- Kilvington, S. & White, D.G. 1994. *Acanthamoeba*: Biology, ecology and human disease: review. *Medical Microbiology* 5: 12-20.
- Kilvington, S., Gray, T., Dart, J., Morlet, N., Beeching, J.R., Frazer, D.G. & Matheson, M. 2004. *Acanthamoeba* keratitis: The role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 45: 165-169.
- Kilvington, S., Larkin, D.F., White, D.G. & Beeching, J.R. 1990. Laboratory investigation of *Acanthamoeba* keratitis. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 2711-2725.
- Kingston, D. & Warhurst, D.C. 1969. Isolation of amoebae from the air. *Journal of Medical Microbiology* 2: 27-36.
- Kyle, D.E. & Noblet, G.P. 1985. Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes. *Journal of Protozoology* 33: 422-434.
- Ma, P., Visvesvara, G.S., Martinez, A.J., Theodore, F.H., Daggett, P.M. & Sawyer, T.K. 1990. *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections: Review. *Reviews of Infectious Diseases* 12: 490-513.
- Marciano-Cabral, F. 1988. Biology of *Naegleria* spp. *Microbiological Reviews* 52: 114-133.
- Marliana, M. 2007. Kaedah pengambilan sampel akuatik untuk pemencilan *Acanthamoeba* spp. dan faktor-faktor yang mempengaruhi sebarannya. Tesis Ijazah Sarjana Muda Sains Bioperubatan. Universiti Kebangsaan Malaysia.
- Martinez, A.J. 1985. *Free Living Amoebas: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology and Treatment of Disease*. Boca Raton: CRC Press.
- Mohd Hasrul, A.H. 2004. Pemencilan *Acanthamoeba* sp. daripada persekitaran akuatik, tanah dan udara. Tesis Ijazah Sarjana Muda Sains Bioperubatan. Universiti Kebangsaan Malaysia.
- Nurulhuda, S. 2002. Pemencilan *Acanthamoeba* spp. daripada persekitaran akuatik. Tesis Ijazah Sarjana Muda Sains Bioperubatan. Universiti Kebangsaan Malaysia.
- Page, F.C. 1988. *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae*. United Kingdom: The Freshwater Biological Association.
- Preston, T.M., Richards, H. & Wotton, R.S. 2001. Locomotion and feeding of *Acanthamoeba* at the water-air interface of ponds. *FEMS Microbiology Letters* 194: 143-147.
- Pussard, M. & Pons, R. 1977. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida) [Morfologi dinding sista dan taksonomi bagi genus *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida)]. *Protistologica*. 8: 557-598.
- Radford, C.F., Minassian, D.C. & Dart, J.K. 2002. *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: Incidence, outcome, and risk factors. *British Journal of Ophthalmology* 86: 536-542.
- Sawyer, T.K., Lewis, E.J., Galassa, M., Lear, D.W., O'Malley, M.L., Adams, W.N. & Gaines, J. 1982. Pathogenic amoebae in ocean sediments near wastewater sludge disposal sites. *Journal of the Water Pollution Control* 54: 1318-1323.
- Seal, D.V., Stapleton, F. & Dart, J. 1992. Possible environmental sources of *Acanthamoeba* spp. in contact lens wearers. *British Journal of Ophthalmology* 6: 424-427.
- Stehr-Green, J.K., Bailey, T.M. & Visvesvara, G.S. 1989. The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. *American Journal of Ophthalmology* 107: 331-336.
- Storey, M.V., Winiacka-Krusnell, J., Ashbolt, N.J. & Stenström, T.A. 2004. The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant *Acanthamoeba* and *Legionella*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 36(9): 656-662.
- Weekers, P.H., Bodelier, P.L.E., Wijen, J.P. & Vogels, G.D. 1993. Effects of grazing by the free-living soil amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on various bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 2317-2319.
- WHO. 2006. *Guidelines for Safe Recreational Water Environments. Volume 2: Swimming Pools and Similar Environments*. Geneva: World Health Organization.

Nurul Fariza Roslee
 Mohamed Kamel Abd Ghani
 Jabatan Sains Bioperubatan
 Fakulti Sains Kesihatan Bersekutu
 Universiti Kebangsaan Malaysia
 50300 Jalan Raja Muda Abdul Aziz
 Kuala Lumpur, Malaysia.

Corresponding author: Mohamed Kamel Abd. Ghani
 Email address: mkamal@fskb.ukm.my
 Tel: 603-92897634; Fax: 603-26929032

Received: August 2010
 Accepted for publication: September 2010

Anisah Nordin
 Yusof Suboh
 Noraina Ab Rahim
 Jabatan Parasitologi Perubatan
 Fakulti Perubatan
 Universiti Kebangsaan Malaysia
 50300 Jalan Raja Muda Abdul Aziz
 Kuala Lumpur, Malaysia.