

Rola pełzaków wolno żyjących w wywoływaniu i transmisji chorób u ludzi i zwierząt

The role of free-living amoebae in pathogenesis and transmission of human and animal diseases

NATALIA ŁANOCHA, DANUTA KOSIK-BOGACKA, WANDA KUŻNA-GRYGIEL

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Medycznej, Pomorska Akademia Medyczna

Pełzaki z grupy „limax”, szczególnie gatunki z rodzajów *Acanthamoeba*, *Naegleria* i *Balamuthia*, mogą być fakultatywnymi pasożytami człowieka i zwierząt. Występują one powszechnie w glebie, powietrzu, wodach słodkich i słonych. W pracy opisano epidemiologię, patogenezę, metody diagnostyczne oraz sposoby leczenia pierwotnego zapalenia mózgu i opon mózgowych (PAM) wywołane przez *Naegleria fowleri*, ziarniakowego zapalenia mózgu (GAE) i pełzakowego zapalenia rogówki oka (AK) wywołane przez pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba*.

Inwazje pełzaków wolno żyjących u ludzi i zwierząt stanowią nowy problem w parazytologii lekarskiej, wymagający dalszych i kompleksowych badań. Powszechność występowania pełzaków sprawia, że stanowią one duże zagrożenie dla zdrowia ludzi zwłaszcza u osób o obniżonym poziomie odporności, przy czym brak jest jednoznacznych metod leczenia schorzeń przez nie wywoływanych.

Słowa kluczowe: chorobotwórczość, epidemiologia, pełzaki wolno żyjące

Amoebae of the “limax” group and the species of the *Acanthamoeba*, *Naegleria* and *Balamuthia* genera in particular, can be facultative parasites of humans and animals. They are ubiquitous in soil, air, and fresh – as well as sea waters. The presently reported study describes epidemiology, pathogenesis, diagnostic methods, and treatment methods of primary amoebic meningoencephalitis (PAM) caused by *Naegleria fowleri*, granulomatous amoebic encephalitis (GAE), and acanthamoebic keratitis (AK) induced by the species of the *Acanthamoeba* genus.

Human and animal infections of free-living amoebae constitute an emerging problem in medical parasitology, requiring additional, complex studies. The wide distribution range of those amoebae contributes to the fact that they are hazardous to humans, immunocompromised individuals in particular. The absence of reliable, effective, and widely approved treatment methods makes the situation even more difficult.

Key words: pathogenicity, epidemiology, free-living amoebae (FLA)

© Probl Hig Epidemiol 2009, 90(2): 165-170

www.phie.pl

Nadesłano: 14.03.2009

Zakwalifikowano do druku: 22.06.2009

Adres do korespondencji / Address for correspondence

dr n. med. Danuta Kosik-Bogacka

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Medycznej PAM

al. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin

tel/fax: (0-91) 4661671, e-mail: kodan@sci.pam.szczecin.pl

Wykaz skrótów:

AK – pełzakowe zapalenie rogówki oka

GAE – ziarniniakowe zapalenie mózgu

PAM – pierwotne zapalenie mózgu i opon mózgowych

Wprowadzenie

Organizmy wolno żyjące, w tym pełzaki z grupy „limax” mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. W sprzyjających warunkach transmisja tych pierwotnie wolno żyjących ameb do wnętrza organizmów może prowadzić do ich patogeniczności [1]. W związku z tym, że mogą być one zarówno fakultatywnymi pełzakami wolno żyjącymi (egzozoicznymi) jak i fakultatywnymi patogenami (endozoicznymi), określa się je mianem organizmów amfizoicznych [2, 3]. Dla ludzi i zwierząt wirulentne są szczepy z rodzaju *Acanthamoeba* i *Naegleria* oraz gatunek *Balamuthia mandrillaris* [3].

Epidemiologia

Pełzaki wolno żyjące występują w dwóch formach: cysty i trofozoitu.

Trofozoity pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* i *Balamuthia* występują w formie pełzakowej. Natomiast u przedstawicieli rodzaju *Naegleria* oprócz postaci pełzakowej obecna jest postać wiciowa trofozoitów. Trofozoity wiciowe tworzą się z trofozoitów pełzakowych w niesprzyjających warunkach środowiska. Są formami, które nie odżywiają się i nie rozmnażają, natomiast przyczyniają się do rozprzestrzeniania ameb w środowisku [1].

Cysty są formami odpornymi na działanie wielu czynników fizycznych i chemicznych, w tym na: niską temperaturę, zmiany wilgotności, wysychanie, promieniowanie ultrafioletowe [4], zmienne ciśnienie osmotyczne oraz zmiany stężenia jonów wodorowych, związków organicznych i nieorganicznych

[5]. Jednakże udowodniono inaktywujące działanie promieniowania ultrafioletowego na cysty pełzaków [6], pulsującego pola elektrycznego [7], a także mikrofal [8]. Zdolność cyst do przeżywania w tych ekstremalnych warunkach środowiska jest możliwa dzięki celulozowej budowie ścian cyst [9].

Jak wykazały badania Mazura i wsp. [10] cysty *Acanthamoeba* mogą zachowywać żywotność w wodzie destylowanej w temperaturze 4°C przez 25 lat, natomiast cysty *Naegleria* w tych warunkach przeżywają kilka miesięcy. Niska wrażliwość cyst *Acanthamoeba* na czynniki biotyczne i abiotyczne związana jest z ich morfofizjologią. Cysty charakteryzują się wewnątrzgatunkowym polimorfizmem pełniącym ważną rolę w utrzymaniu się dyspersji oraz skutecznej transmisji szczepów w środowisku naturalnym [2].

Formami inwazyjnymi dla człowieka mogą być zarówno cysty, jak i trofozoity pełzaków. Do zarażenia dochodzi poprzez inhalację powietrza lub aspirację wody zanieczyszczonych formami inwazyjnymi pierwotniaków. Wrotami inwazji, oprócz jamy nosowej, może być także błona śluzowa jamy ustnej, uszkodzona skóra oraz śluzówka jelita [11].

Kosmopolityczne pełzaki z grupy „limax” wyizolowano z gleby, powietrza, wód słodkich i słonych. Trofozoity i cysty *Acanthamoeba* spp. wykryto między innymi: w butelkowej wodzie mineralnej, na grzybach i jarzynach, w osadach oceanów, ściekach, basenach do fizykoterapii, basenach kąpielowych, urządzeniach klimatyzacyjnych, a nawet wieżach chłodniczych elektrowni węglowych i atomowych. Pełzaki mogą być obecne w hodowlach bakterii, komórkach ssaków, popłuczynach żołądka i jelit oraz nosogardzieli zdrowych osób [1, 12]. Ameby wykryto także na śluzówkach jamy nosowej, gardzieli oraz w ropnej wydzielinie z ucha i luźnym kale [13].

Pełzaki z rodzaju *Balamuthia* wyizolowano z podobnych środowisk jak pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba*. Trofozoity i cysty tego rodzaju wykryto na warzywach, w grzejnikach i klimatyzatorach, na narzędziach lekarskich i stomatologicznych oraz w roztworach do płukania soczewek kontaktowych, w słodkiej i sonej wodzie [3].

Pełzaki zaliczane do rodzaju *Naegleria* są termofilne, namnażają się w temperaturze 40-45°C [5]. Wyizolowano je z gleby, kurzu, basenów kąpielowych i do hydroterapii, naturalnych źródeł ciepłej wody, zbiorników wodnych, w tym skażonych termicznie ścieków [14].

Chorobotwórczość

Pierwszy przypadek śmiertelnego zapalenia opon mózgowych i mózgu wywołany przez pełzaki z grupy „limax” opisali Fowler i Carter w roku 1965 [15].

Dalsze badania epidemiologiczne doprowadziły do wyznaczenia dwóch kategorii inwazji wolno żyjących ameb do ośrodkowego układu nerwowego człowieka. Pierwotne zapalenie mózgu i opon mózgowych o ostrym przebiegu (*primary amoebic meningo-encephalitis* – PAM) wywołane przez *Naegleria fowleri* oraz ziarniniakowe zapalenie mózgu (*granulomatous amoebic encephalitis* – GAE) wywołane przez pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba* i gatunek *Balamuthia mandrillaris*. Opisane powyżej jednostki chorobowe (PAM i GAE) różnią się od siebie sposobem zarażenia, penetracją pasożyta w tkankach żywiciela, okresem inkubacji, zmianami w tkankach, klinicznym przebiegiem i czasem trwania [16].

Pierwotne zapalenie mózgu i opon mózgowych u człowieka przebiega w sposób ostry i najczęściej doprowadza do zgonu w ciągu 72 godzin. W przebiegu klinicznym występują silne bóle głowy, wzrost temperatury ciała do 39-40°C, brak łaknienia, nudności, wymioty oraz podrażnienie opon mózgowych [3, 16, 17] (tab. I). Częstym powikłaniem towarzyszącym inwazji jest rozległe zapalenie mięśnia sercowego. PAM występuje zwykle u osób młodych po kąpielach lub nurkowaniu w basenach kąpielowych z chlorowaną wodą [1, 18].

Do tej pory na świecie opisano około 180 śmiertelnych przypadków PAM, w tym 80 w USA. Inwazje *Naegleria fowleri* po kontakcie z wodą z naturalnych ciepłych źródeł opisano, między innymi, w Australii, Nowej Zelandii, Afryce, Indiach i południowych stanach USA. Najnowsze doniesienia dotyczące zachorowań na PAM u ludzi pochodzą z Tajlandii, Japonii i Indii [19].

Pierwsze opisane przypadki PAM w Europie pochodzą z terenów byłej Czechosłowacji. Cerva i Novak [20] opisali 16 śmiertelnych przypadków PAM po kąpielach w basenie z chlorowaną i ogrzewaną wodą w Usti nad Łabą. Ponadto w Europie przypadki PAM stwierdzono na terenie Belgii, Anglii i na Węgrzech po kontakcie z podgrzanyymi wodami zrzutowymi z dużych zakładów przemysłowych oraz z naturalnych cieplic [20]. W Niemczech opisano także PAM u pacjenta z toczniem rumieniowatym układowym (*Systemic lupus erythematosus* – SLE) [21]. Do tej pory na terenie Polski nie stwierdzono przypadków PAM, pomimo, że w ciepłych wodach jezior konińskich wykryto *Naegleria fowleri* [22]. Pełzaki te posiadały właściwości wirulentne dla myszy, co świadczy o potencjalnej groźbie inwazji PAM w Polsce.

W literaturze opisano również przypadki wystąpienia PAM u zwierząt, między innymi u bydła i tapirów [23].

W przeciwieństwie do PAM liczba przypadków ziarniniakowego zapalenia mózgu (GAE) jest znacz-

Tabela I. Porównanie cech klinicznych zapalenia mózgu i opon mózgowych (GAE), pierwotnego ziarniniakowego zapalenia mózgu (PAM) i pełzakowego zapalenia rogówki oka (AK) (cytowane za: Martinezem i Visvesvarem [1])

Table I. Comparison of clinical signs of granulomatous amoebic encephalitis (GAE), primary amoebic meningoencephalitis (PAM), and acanthamoebic keratitis (AK) (cited after Martinez and Visvesvara [1])

Charakterystyka/ Background	GAE	PAM	AK
Czynnik etiologiczny /Etiologic factor	<i>Acanthamoeba spp.</i> , <i>Balamuthia mandrillaris</i>	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i> , <i>A. culberstoni</i> , <i>A. polyphaga</i> , <i>A. hatchetti</i> , <i>A. rhyodes</i>
Występowanie geograficzne/ Geographic distribution	Kosmopolityczne, niezależne od pór roku	Kosmopolityczne, w gorących miesiącach letnich	Kosmopolityczne, niezależne od pór roku
Wrota inwazji /Infection pattern	Płuca, skóra, nabłonek węchowy	Nabłonek węchowy	Rogówka oka
Okres inkubacji /Incubation period	Od kilku tygodni do kilku miesięcy	1-15 dni	Kilka dni
Najczęstsze objawy kliniczne /Most frequent clinical signs	Zmiana osobowości, senność, splątanie, drażliwość, drgawki, porażenie połowicze, afazja, porażenie nerwów czaszkowych, podwójne widzenie, nudności, bóle i zawroty głowy	Bóle głowy, nudności, wymioty, sztywność karku, gorączka, śpiączka	Silny ból oka, typowy pierścieniowaty naciek w rogówce, światłowstręt, nieostre widzenie
Diagnostyka/ Diagnostic methods	Preparaty bezpośrednie, hodowla pełzaków in vitro na podłożu NN Agar (podłoże Culberstonia), metody molekularne	Preparaty bezpośrednie oraz trwałe barwione, hodowla pełzaków in vitro na podłożu NN Agar (podłoże Culberstonia), lub na bulionie mięsny, metody molekularne	Hodowla pełzaków in vitro na podłożu NN Agar z zeszkrobiny rogówki oka, metody molekularne
Leczenie /Treatment	Pochodne azolowe (itrazonazol, ketokonazol, flukonazol) z flucytozyną	Amfoterycyna B 1 mg/kg/24 h i.v. (nie określono czasu leczenia)	Neomycyna i gramicydyna (Neosporin) i 0,02% roztwór bigwanidu poliheksametyleno do stosowania miejscowego

nie mniejsza. W większości opisanych przypadków GAE, wystąpienie objawów nie wiązało się z wcześniejszym pływaniem w jeziorach lub basenach. Okres inkubacji GAE jest dłuższy niż w przypadku PAM i często przekracza 10 dni. Przebieg inwazji ma charakter przewlekły. Choroba rozpoczyna się w sposób nagły z silnym bólem głowy, podwyższeniem temperatury ciała, objawami podrażnienia opon mózgowych, zaburzeniami psychicznymi: dezorientacją i halucynacjami, zaburzeniami smaku, węchu oraz wzroku [11, 16] (tab. I). W opisanych 103 przypadkach GAE inwazja *Acanthamoeba* rozwinęła się u osób z zaburzoną mechanizmem immunologicznym [21], przewlekle chorych, u osób upośledzonych umysłowo i pacjentów przyjmujących leki immunosupresyjne po przeszczepie narządów, natomiast 50 przypadków dotyczyło chorych na AIDS [3, 12]. Predyspozycją do inwazji może być również alkoholizm, anoreksja, choroba nowotworowa, chemioterapia i radioterapia [3, 12]. W związku z tym GAE zaliczono do inwazji oportunistycznych [3, 12, 24].

Stwierdzono, że penetracja ośrodkowego układu nerwowego (OUN) przez pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba* i *Balamuthia* następuje drogą krwionośną, prawdopodobnie z pierwotnych zmian: w skórze, w układach oddechowym lub moczowym.

Inwazje pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* i *Balamuthia* mogą obejmować także inne narządy takie jak: nadnercza, skórę, oczy oraz żuchwę objawiając się przewlekłymi nieżytami nosa, zapaleniem zatok przynosowych, zapaleniem węzłów chłonnych, błon śluzowych narządów rodnych, a także gośćcowym

zapaleniem stawów [25-27]. W literaturze opisano także przypadek śmiertelnego zapalenia płuc u 7. miesięcznego koreańskiego dziecka (z małopłytkowością) wywołanego przez *Acanthamoeba spp.* [28].

W Polsce dotychczas nie stwierdzono przypadków płucnej akantamebozy. Jednak pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba* wyizolowano z bronchoaspiratu pacjentów z objawami zapalenia płuc o różnym przebiegu klinicznym [29].

U człowieka biotopem wirulentnych szczepów *Acanthamoeba* jest także rogówka oka. Do roku 2004 na świecie odnotowano łącznie ponad 3000 zachorowań na pełzakowate zapalenie rogówki w większości u osób stosujących soczewki kontaktowe i stosujących roztwory do ich pielęgnacji [30, 31]. U pacjentów, którzy nigdy nie korzystali z soczewek, kontaktowych wystąpienie AK wiąże się z mechanicznym uszkodzeniem rogówki [32, 33], co wydaje się potwierdzać zdiagnozowanie pełzakowatego zapalenia rogówki u pacjenta po zabiegu refrakcyjnym [34]. Schorzenie to manifestuje się silnym bólem oka, zaburzeniami widzenia i fotofobią (tab. I). Najbardziej charakterystycznym objawem AK jest pierścieniowaty naciek zapalny w centralnej części rogówki połączony z zanikiem keratocytów [31]. W Polsce stwierdzono kilka przypadków AK, między innymi w Lublinie i Wrocławiu [31, 33].

Na terenie Polski szczepy z rodzaju *Acanthamoeba* patogeniczne dla myszy stwierdzono w wodzie zbiorników rekreacyjnych w okolicy Poznania [35], Gdańska [36], Lublina [37] oraz Szczecina [38]. Ponadto opisano także przypadki inwazji *Acanthamoeba*

u domowych i dzikich zwierząt (bydło, owce, konie, psy, kangury), u których ameby stwierdzono w ogniskach martwiczo-krwotocznych w sercu, płucach, trzustce, mięśniach i nerkach [39, 40].

Dowiedziano, że nie każdy kontakt żywiciela z patogenicznym szczepem pełzaków musi kończyć się inwazją. Chappell i wsp. [41] wykazali, że aż 80% populacji ludzkiej posiada naturalne przeciwciała IgG anty-*Acanthamoeba* spp. we krwi obwodowej. Może to sugerować, że częsty kontakt z wolno żyjącymi niepatogennymi pełzakami może prowadzić do reakcji immunologicznych [41].

Diagnostyka zarażeń pełzakami

W diagnostyce zarażenia pełzakami stosuje się materiał pobrany w czasie biopsji, z którego wykonuje się preparaty histologiczne. W przypadku podejrzenia PAM i GAE wskazane jest również badanie osadu płynu mózgowo-rdzeniowego, w którym pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba* stwierdza się rzadziej niż *Naegleria*. Jednakże z materiału tego do tej pory nie udało się wyizolować trofozoitów *Balamuthia mandrillaris*. Pomocne w rozpoznaniu pełzaków są metody molekularne, przede wszystkim analiza DNA jądrowego i mitochondrialnego oraz badanie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) [12]. Do rozpoznania pełzakowego zapalenia rogówki poleca się hodowlę ameb in vitro z zeszkobin rogówki lub biopsji, a także metodę immunofluorescencyjną oraz PCR [42-44].

Ponieważ etiologia pełzakowa ma często złożony charakter, dlatego też należy ją uwzględnić u pacjentów z ropnym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych, atypowym zapaleniem płuc różnicując z zarażeniami bakteryjnymi, mikobakteryjnymi i wirusowymi.

Leczenie

Do tej pory nie opracowano skutecznego leczenia chorób wywoływanych przez pełzaki z grupy „limax”. Opisano korzystny efekt leczenia GAE po zastosowaniu pochodnych azolowych (itakonazolu, ketokonazolu, flukonazolu) z flucytozyną [45]. Do stosowania miejscowego w zapaleniu rogówki wywołanego przez *Acanthamoeba* zaleca się połączenie propamidu, roztworu polimyksyny B, neomycyny

i gramicydyny (Neosporin) oraz 0,02% roztworu bigwanidu poliheksametyleny [46]. Wśród różnych substancji, ocenianych pod kątem działania przeciwpełzakowego, wymienia się także chlorheksydynę, na którą w badaniach in vitro były wrażliwe niektóre izolaty *Acanthamoeba* [2].

Pełzaki jako organizmy wektorowe

Jak wykazały badania ostatnich lat, pełzaki nie mające właściwości wirulentnych mogą transmitować w wakuolach bakterie symbiotyczne, w tym również bakterie chorobotwórcze dla człowieka [47]. Po raz pierwszy obecność drobnoustrojów w komórkach pełzaków wolno żyjących i pasożytniczych stwierdził Wenyon [4]. Wykazał on, że bakterie mogą namnażać się w powiększonych wakuolach pokarmowych doprowadzając do lizy komórek.

Dowiedziano, że rozwój bakterii w komórkach pierwotniaków może wpływać modyfikująco na ich morfologiczne, fizjologiczne i behawioralne właściwości [48]. Prawdopodobnie ma to związek z preadaptacją bakterii do późniejszego śródkomórkowego wzrostu w organizmach ludzi i zwierząt [47].

W komórkach ameb stwierdzono występowanie różnych chorobotwórczych drobnoustrojów między innymi: *Shigella*, *Chlamydia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* oraz *Legionella pneumophila* [47, 49-51]. Wykazano, że *Legionella pneumophila*, może być patogeniczna dla gatunków z rodzajów *Acanthamoeba* i *Naegleria* w warunkach in vitro, w związku z tym istnieje możliwość szerzenia się choroby legionistów poprzez inhalację pełzaków wypełnionych bakteriami [49]. Ameby mogą uczestniczyć także w transmisji pałeczek *Francisella tularensis*, która, ze względu na swe właściwości, wykorzystywana jest w bioterroryzmie [51].

Inwazje pełzaków wolno żyjących u ludzi i zwierząt stanowią nowy problem w parazytologii lekarskiej, wymagający dalszych i kompleksowych badań. Powszechność występowania pełzaków sprawia, że stanowią one duże zagrożenie dla zdrowia ludzi zwłaszcza u osób o obniżonym poziomie odporności, przy czym brak jest jednoznacznych metod leczenia schorzeń przez nie wywoływanych.

Piśmiennictwo / References

- Martinez AJ, Visvesvara GS. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol* 1997, 7: 583-598.
- Chomicz L, Żebrowska J, Starościak B, Piekarczyk J, Fiedor P, Zawadzki P, Mazurkiewicz M, Konopka M. Badania nad amfizoicznymi amebami pierwotnie wolnożyjącymi – biotyczne i abiotyczne uwarunkowania zagrożeń dla ludzkiego zdrowia. *Med Dydakt Wychow* 2003, 9: 34-39.
- Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007, 50: 1-26.
- Kasprzak W. Pełzaki wolno żyjące o właściwościach patogenicznych dla człowieka i zwierząt. PWN, Warszawa 1985.
- De Jonckheere J, van de Voorde H. Comparative study of six strains of *Naegleria* with special reference to nonpathogenic variants of *Naegleria fowleri*. *J Protozool* 1977, 24: 304-309.
- Rivera F, Lares F, Ramirez E, Bonilla P, Rodriguez S, Labastida A, Ortiz R, Hernandez D. Pathogenic *Acanthamoeba* isolated during an atmospheric survey in Mexico City. *Rev Infect Dis* 1991, 13: 388-389.
- Vernhes MC, Benichou A, Pernin P, Cabanes PA, Teissié J. Elimination of free-living amoebae in fresh water with pulsed electric fields. *Water Res* 2002, 36: 3429-3438.
- Hiti K, Walochnik J, Faschinger C, Haller-Schober EM, Aspöck H. Microwave treatment of contact lens cases contaminated with *Acanthamoeba*. *Cornea* 2001, 20: 467-470.
- Brown TJ, Cursons RT. Pathogenic free-living amebae (PFLA) from frozen swimming areas in Oslo, Norway. *Scand J Infect Dis* 1977, 9: 237-240.
- Mazur T, Hadaś E, Iwanicka I. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Trop Med Parasitol* 1995, 46: 106-108.
- Martinez AJ, Kasprzak W. Pathogenic free-living amoebae – a review. *Wiad Parazytol* 1980, 26: 495-522.
- Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev* 2006, 30: 564-595.
- Lengy J, Jakovljević R, Talis B. Recovery of a hartmannelloid ameba from a purulent ear discharge. *Harefuah* 1971, 80: 23-24.
- Shenoy S, Wilson G, Prashanth HV, Vidyalakshmi K, Dhanashree B, Bharath R. Primary meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*: first reported case from Mangalore, South India. *J Clin Microbiol* 2002, 40: 309-310.
- Fowler M, Carter RF. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *Br Med J* 1965, 2: 740-742.
- Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 2003, 16: 273-307.
- Kaushal V, Chhina DK, Ram S, Singh G, Kaushal RK, Kumar R. Primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *J Assoc Physicians India* 2008, 56: 459-462.
- Mazur T. Aspekty epidemiologiczne i kliniczne pełzaków wolnożyjących. *Biul Met-Org Inst Med Morsk i Trop* 1998, 31: 67-72.
- Tiewcharoen S, Junnu V. Distribution of pathogenic *Naegleria* spp. in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001, 32: 172-178.
- Cerva L, Novak K. Amoebic meningoencephalitis: 16 fatalities. *Science* 1968, 160: 92.
- Lange P, Bauer C, Hügens-Penzel M, Lehmann HW, Zimmer KP, Kuchelmeister K. *Acanthamoeba* meningoencephalitis: A case in an adolescent female patient with systemic lupus erythematosus. *Pathologe* 2008, 5.
- Mazur T. Occurrence of *Naegleria fowleri* in a free environment and biological properties of isolated strains. *Wiad Parazytol* 1984, 30: 3-35.
- Martinez AJ, Nelson EC, Duma RJ. Animal model of human disease: primary amoebic meningoencephalitis, *Naegleria meningoencephalitis*, CNS protozoal infection. *Am J Pathol* 1973, 73: 545-548.
- Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 2004, 34: 1001-1027.
- Teknos TN, Poulin MD, Laurentano AM, Li KK. *Acanthamoeba* rhinosinusitis: characterization, diagnosis and treatment. *Am J Rhinol J* 2000, 14: 387-391.
- Rivera MA, Padhya TA. *Acanthamoeba* a rare primary cause of rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2002, 112: 1201-1203.
- Jeansson S, Kvien TK. *Acanthamoeba polyphaga* in rheumatoid arthritis: possibility for a chronic infection. *Scand J Immunol* 2001, 53: 610-612.
- Im K, Kim DS. *Acanthamoebiasis* in Korea: two new cases with clinical cases review. *Yonsei Med J* 1998, 39: 478-484.
- Łanocha N, Kuźna-Grygiel W, Marzec-Lewenstein E, Ociepa T. *Acanthamoeba* sp. u pacjentów z niedoborami immunologicznymi. *Wiad Parazytol* 2007, 53: 92.
- Kilvington S, Larkin DF, White DG, Beeching JR. Laboratory investigation of *Acanthamoeba* keratitis. *J Clin Microbiol* 1990, 28: 2722-2725.
- Gieryng R, Prost M, Gieryng H, Mazur T, Kasprzak W. Amoebic keratitis – keratitis *acanthamoebica*. *Klin Oczna* 1994, 96: 163-167.
- Scharma S, Garg P, Rao GN. Patient characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis. *Br J Ophthalmol* 2000, 84: 1103-1108.
- Wesołowska M, Cisowska A, Myjak P, Marek J, Jurowska-Liput J, Jakubaszko J. *Acanthamoeba* keratitis in contact lens wearers in Poland. *Adv Clin Exp Med* 2006, 15, 3: 553-555.
- Langwińska-Wośko E, Szaflik JP, Kołodziejczyk W, Zaraś M. Zapalenie rogówki wywołane przez *Acanthamoeba* u pacjenta po zabiegu refrakcyjnym. *Okulistyka* 2003, 2: 51-54.
- Kasprzak W, Mazur T. Free-living amoebae isolated from waters frequented by people in the vicinity of Poznań, Poland. Experimental studies in mice on the pathogenicity of the isolates. *Z Tropenmed Parasitol* 1972, 23: 391-398.
- Befinger M, Myjak P, Pietkiewicz H. Occurrence of amphizoic amoebae in lake Żarnowieckie. *Bull Inst Mar Trop Med Gdynia* 1986, 37: 275-284.
- Toczółowski J, Gieryng H, Gieryng R, Wróblewska E. Amoeba of the *Acanthamoeba* species in swimming pools and lakes of the Lublin area and in people using contact lenses. *Klin Oczna* 2000, 102: 207-208.

38. Górnik K, Kuźna-Grygiel W. Presence of virulent strains of amphizoic amoebae in swimming pools of the city of Szczecin. *Ann Agric Environ Med* 2004, 11: 233-236.
39. Dubey JP, Benson JE, Blakeley KT, Booton GC, Visvesvara GS. Disseminated *Acanthamoeba* sp. infection in a dog. *Vet Parasitol* 2005, 128: 183-187.
40. Kinde H, Read DH, Daft BM, Manzer M, Nordhausen RW, Kelly DJ, Fuerst PA, Booton G, Visvesvara GS. Infections caused by pathogenic free-living amebas (*Balamuthia mandrillaris* and *Acanthamoeba* sp.) in horses. *J Vet Diagn Invest* 2007, 19: 317-322.
41. Chappell CL, Wright JA, Coletta M, Newsome AL. Standardized method of measuring *acanthamoeba* antibodies in sera from healthy human subjects. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001, 8: 724-730.
42. Pasricha G, Sharma S, Garg P, Aggarwal RK. Use of 18S rRNA gene-based PCR assay for diagnosis of *acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers in India. *J Clin Microbiol* 2003, 41: 3206-3211.
43. Bottone EJ, Qureshi MN, Asbell PA. A simplified method for demonstration and isolation of *Acanthamoeba* organisms from corneal scrapings and lens care systems. *Am J Ophthalmol* 1992, 113: 214-215.
44. Mathers WD, Nelson SE, Lane JL, Wilson ME, Allen RC, Folberg R. Confirmation of confocal microscopy diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using polymerase chain reaction analysis. *Arch Ophthalmol* 2000, 118: 178-183.
45. Walia R, Montoya JG, Visvesvara GS, Booton GC, Doyle RL. A case of successful treatment of cutaneous *Acanthamoeba* infection in a lung transplant recipient. *Transpl Infect Dis* 2007, 9: 51-54.
46. Larkin DE, Kilvington S, Dart JK. Treatment of *Acanthamoeba* keratitis with polyhexamethylene biguanide. *Ophthalmol* 1992, 99: 185-191.
47. Derda M, Sułek-Stankiewicz A, Hadaś E. Free-living amoebae as vehicles of pathogenic bacteria. *Wiad Parazytol* 2006, 52: 1-7.
48. Barker J, Brown MR, Collier PJ, Farrell I, Gilbert P. Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl Environ Microbiol Appl Environ Microbiol* 1992, 58: 4089.
49. Neumeister B, Schöniger S, Faigle M, Eichner M, Dietz K. Multiplication of different *Legionella* species in *Mono Mac 6* cells and in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* 1997, 63: 1219-1224.
50. Van Hamme C, Dumont M, Delos M, Lachapelle JM. Cutaneous *acanthamoebiasis* in a lung transplant patient. *Ann Derm Venerol* 2001, 128: 1234-1240.
51. Abd H, Johansson T, Golovliov I, Sandström G, Forsman M. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* 2003, 69: 600-606.