

Występowanie pełzaków pierwotnie wolno żyjących w fontannach

The occurrence of free-living amoebae in fountains

MONIKA DERDA, EDWARD HADAŚ, AGNIESZKA WOJTKOWIAK-GIERA, WALDEMAR J. WOJT,
MARCIN CHOLEWIŃSKI, ŁUKASZ SKRZYPCZAK

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Wstęp. Pełzaki wolno żyjące są zagrożeniem dla zdrowia ludzkiego. Najbardziej znane gatunki z rodzaju *Acanthamoeba* powodują zapalenie rogówki oka (AK), ziarniniakowe zapalenia mózgu (GAE) oraz inne stany zapalne tkanek. Pełzaki z rodzaju *Naegleria* powodują zapalenie opon mózgowych i mózgu (PAM). Natomiast pełzaki z rodzaju *Balamuthia* i *Sappinia* powodują choroby podobne objawowo do zarażenia *Acanthamoeba*.

Cel badań. Stwierdzenie obecności pełzaków wolno żyjących w wodzie z fontann oraz wykazanie, że stanowią one zagrożenie zdrowia ludzkiego.

Materiał i metoda. Pełzaki izolowano na filtrach membranowych z wody i aerozoli wytwarzanych przez fontanny. Test na patogeniczność izolatów przeprowadzono na zwierzętach doświadczalnych. Izolaty identyfikowano mikroskopowo na podstawie morfologii.

Wyniki. Z wszystkich badanych fontann wyizolowano pełzaki wolno żyjące. Pełzaki o właściwościach potencjalnie patogenicznych dla człowieka wyizolowano z 4 fontann oraz z 3 aerozoli wytwarzanych przez fontanny. Wszystkie patogeniczne izolaty pełzaków należały do rodzaju *Acanthamoeba*.

Wniosek. Obecność patogenicznych pełzaków w badanych fontannach i ich aerozolu może stanowić potencjalne źródło zagrożenia dla zdrowia człowieka.

Słowa kluczowe: pełzaki, *Acanthamoeba*, fontanny, potencjalne źródło zarażenia

Introduction. The free-living amoebae are a threat to human health. The best known species are of the genus *Acanthamoeba* causing *Acanthamoeba* keratitis AK, granulomatous amoebic encephalitis GAE, and other tissue inflammations, the genus *Naegleria* involving primary amoebic meningoencephalitis (PAM), and the genus *Balamuthia* and *Sappinia* causing diseases with symptoms similar to the *Acanthamoeba* infection.

Aim. To establish the presence of free-living amoeba in fountain water and demonstrate that they are a threat to human health.

Material & method. The amoebae were isolated from fountains and their sprays by using membrane filters. The pathogenicity tests of the isolates were carried out on experimental animals. The identification of the isolates was performed by morphology.

Results. Results confirmed that the free-living amoebae were identified in all examined fountains. The free-living amoebae of potentially pathogenic threat to humans were isolated from four fountains and three water sprays. All isolated pathogenic strains of amoebae belonged to the genus *Acanthamoeba*.

Conclusion. The presence of pathogenic amoebae in the examined fountains and their sprays can be a potential source of danger for human health.

Key words: amoeba, *Acanthamoeba*, fountains, potential threat to human infection

© Probl Hig Epidemiol 2013, 94(1): 147-150

www.phie.pl

Nadesłano: 20.01.2013

Zakwalifikowano do druku: 16.02.2013

Adres do korespondencji / Address for correspondence

dr Monika Derda

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego

ul. Fredry 10, 61-701 Poznań

tel. 61 8546237, fax 61 8546231, e-mail: mderda@ump.edu.pl

Wykaz skrótów

AK – pełzakowe zapalenie rogówki oka

GAE – ziarniniakowe zapalenie mózgu

PAM – pierwotne zapalenie mózgu i opon mózgowych

AP – pełzakowe zapalenie płuc

Wstęp

Pełzaki wolno żyjące należą do rodzajów *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Echinamoeba*, *Hartmannella*, *Naegleria*, *Mastigina*, *Sappinia*, *Valhalkampfia*, *Vannella*

i *Vexillifera* są organizmami wszechobecnymi, występującymi powszechnie w otaczającym środowisku. Żywią się bakteriami, grzybami i innymi cząsteczkami stałymi i są doskonale dostosowane do środowiska [1]. Organizmy te są znajdowane w próbkach gleby, powietrza, wody oraz tkankach zwierzęcych. Trofozoity i cysty pełzaków są wykrywane w osadach oceanicznych, ściekach wodnych, w wodzie mineralnej butelkowanej, basenach, klimatyzatorach, na warzywach i grzybach, jak również w wymazach z błony śluzowej jamy nosowej, gardła i ropnych wydzielinach z ucha [2].

Pierwotniaki te są klasyfikowane jako organizmy grupy „*Limax*”, której nazwa pochodzi od sposobu i typu ich ruchu [3]. Znane są one również pod nazwą organizmów amfizoicznych, co oznacza, że jako organizmy wolno-żyjące, mogą również wnikać i namnażać się w organizmie żywiciela, w tym również w organizmie człowieka i stać się pasożytami.

Pełzaki wolno żyjące są przedmiotem badań nie tylko biologów, ale także genetyków, mikrobiologów, cytologów i patologów. Pierwsze wzmianki o patogenności pełzaków dla człowieka i zwierząt pojawiły się w 1958 roku. Badania przeprowadzone przez Culbertson'a i wsp. [4] oraz Fowler'a i Carter'a [5] opisały pierwsze śmiertelne przypadki zapalenia opon mózgowych u człowieka wywołane przez *Acanthamoeba*. Do dnia dzisiejszego w literaturze opisano kilka tysięcy przypadków chorobowych wywołanych przez pełzaki wolno żyjące [6].

potencjalnie najbardziej zjadliwe i niebezpieczne dla ludzi są gatunki i szczepy należące do rodzaju *Acanthamoeba* i *Naegleria*, oraz gatunki i szczepy należące do rodzaju *Balamuthia* i *Sappinia* [1, 7-12].

Pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba* mogą stanowić potencjalny, etiologiczny czynnik przewlekłego ziarniniakowego zapalenia mózgu (GAE), zapalenia rogówki (AK), zapalenia płuc (AP) oraz pełzakowego zapalenia skóry, a także innych narządów i tkanek u ludzi oraz zwierząt. Pełzaki z rodzaju *Naegleria* powodują pierwotne zapalenia opon mózgowych i mózgu (PAME) zazwyczaj śmiertelne, natomiast pełzaki z rodzaju *Balamuthia* i *Sappinia* powodują objawy i zmiany chorobowe podobne do zmian występujących podczas zarażenia *Acanthamoeba*.

Cel pracy

Stwierdzenie obecności pełzaków wolno żyjących w ogólnodostępnych fontannach miejskich oraz wykazanie, że czasowe przebywanie lub wdychanie aerozoli, mgły lub kropel wody wytwarzanych przez fontanny stwarza potencjalne zagrożenie zarażenia pełzakami dla człowieka. Podobne zagrożenie pełzakami stwarza również korzystanie z wody ze zbiorników fontann, wodotrysków i kurtyn wodnych, np. do celów rekreacyjnych lub ochłodzenia się w czasie upałów.

Materiał i metody

Pełzaki izolowano z wody znajdującej się w obiegu pięciu fontann na terenie miasta Poznania:

1. Fontanna „Mars” (Stary Rynek),
2. Pomnik – fontanna w Zielonych Ogródkach im. Z. Zakrzewskiego,
3. Fontanna „Neptun” (Stary Rynek),
4. Fontanna na Jeziorze Malta,
5. Fontanna w Parku im. Adama Mickiewicza.

Do badań pobierano wodę w ilości około 100 ml do jałowych pojemników jednorazowych. Dodatkowo z fontann oznaczonych numerami 2-5 pobierano mgłę (aerozol) unoszącą się z wody wyrzuconej w powietrze przez dysze.

We wszystkich obiektach woda była w obiegu zamkniętym. Wyjątkiem była fontanna na jeziorze Maltańskim, gdzie pompy pobierają wodę bezpośrednio z jeziora.

Podłoża hodowlane

Podstawowym podłożem stałym NN (*non-nutrient agar*), służącym do izolacji i hodowli pełzaków był 2% nie odżywczy agar Difco na płytkach Petriego o średnicy 80 mm, pokryty 0,5 ml zawiesiny żywych bakterii *Enterobacter aerogenes*.

Izolacja pełzaków

Pełzaki izolowano na filtrach membranowych o średnicy porów 0,45 μm. Filtr z pozostałym na nim osadem umieszczano na przygotowanym podłożu stałym NN. Płytki inkubowano w temperaturze 28°C. Po około 3-5 dniach obserwowano wzrost pełzaków.

Test na patogenność

Pełzaki uzyskane z hodowli na NN agarze sflukowano jałową wodą destylowaną. Uzyskaną zawiesinę zagęszczano i tak przygotowanym inokulatem zarażano 2 tygodniowe myszy szczepu BALB/c poprzez inokulację donosową [13,14]. Myszy utrzymywano w hodowli przez okres dwóch tygodni, a po tym okresie myszy po uprzednim znieczuleniu uśmiercono, o ile w ciągu pierwszych dni od zarażenia nie nastąpiła śmierć na skutek zarażenia. Od uśmierconych lub padłych zwierząt pobierano jałowo mózg i płuca celem izolacji pełzaków.

Identyfikacja pełzaków

Pełzaki identyfikowano mikroskopowo na podstawie morfologii i pomiaru wielkości cyst oraz testu na obecność postaci wiciowych.

Wyniki

Wyniki badań przedstawiono w tabeli I. Ze wszystkich 6 badanych fontann wyizolowano pełzaki wolno żyjące należące głównie do rodzajów *Acanthamoeba*, *Naegleria* i *Hartmannella*. Pełzaki o właściwościach potencjalnie patogenicznych dla człowieka wyizolowano z 4 fontann oraz z 3 aerozoli i mgieł wytwarzanych przez fontanny. W jednym przypadku, tj. fontanny „Neptun”, nie wyizolowano pełzaków patogenicznych z wody, natomiast wyizolowano je z mgły wytworzonej przez fontannę.

Tabela I. Wyniki badań obecności oraz patogeniczności pełzaków wyizolowanych z fontann i aerozoli wokół fontann
 Table I. The results of the presence and pathogenicity amoeba isolated from fountains and sprays around the fountain

Miejsce izolacji	Izolaty pełzaków w próbkach wody	Ilość pełzaków	Patogeniczność izolatów *	Zainwadowana tkanka	Gatunek izolatu z tkanki
1. Fontanna „Mars” na Starym Rynku	<i>Acanthamoeba</i> sp.	++++	4/5	mózg	<i>Acanthamoeba</i> sp.
	<i>Naegleria gruberi</i>	+			
	<i>Hartmannella</i> sp.	++			
2. Fontanna w Zielonych Ogródkach im. Z. Zakrzewskiego	<i>Acanthamoeba</i> sp.	++++	3/3	mózg	<i>Acanthamoeba</i> sp.
	<i>Naegleria gruberi</i>	+			
	<i>Hartmannella</i> sp.	+			
3. Aerozol (mgła) z fontanny w Zielonych Ogródkach im. Z. Zakrzewskiego	<i>Acanthamoeba</i> sp.	+++	0/3		
	<i>Naegleria gruberi</i>	+			
	<i>Hartmannella</i> sp.	+			
4. Fontanna „Neptun” na Starym Rynku	<i>Acanthamoeba</i> sp.	+++	0/5		
	<i>Naegleria gruberi</i>	+			
	<i>Hartmannella</i> sp.	+			
5. Aerozol (mgła) z fontanny „Neptun”	<i>Acanthamoeba</i> sp.	++++	5/5	mózg	<i>Acanthamoeba</i> sp.
	<i>Naegleria gruberi</i>	+			
	<i>Hartmannella</i> sp.	+			
6. Fontanna na jeziorze Malta	<i>Acanthamoeba</i> sp.	++++	5/5	mózg, płuca	<i>Acanthamoeba</i> sp.
	<i>Naegleria gruberi</i>	++			
	<i>Hartmannella</i> sp.	+			
	<i>Dictyostelium discoideum</i>	++++			
7. Aerozol (mgła) z fontanny na jeziorze Malta	<i>Acanthamoeba</i> sp.	++++	1/5	mózg, płuca	<i>Acanthamoeba</i> sp.
	<i>Naegleria gruberi</i>	+			
	<i>Hartmannella</i> sp.	+			
	<i>Dictyostelium discoideum</i>	++			
8. Fontanna w parku im. A. Mickiewicza	<i>Acanthamoeba</i> sp.	++++	2/5	mózg, płuca	<i>Acanthamoeba</i> sp.
	<i>Naegleria gruberi</i>	+			
	<i>Hartmannella</i> sp.	+			
	<i>Dictyostelium discoideum</i>	+++			
9. Aerozol z fontanny w parku im. A. Mickiewicza	<i>Acanthamoeba</i> sp.	++++	0/3	mózg	<i>Acanthamoeba</i> sp.
	<i>Naegleria gruberi</i>	-			
	<i>Hartmannella</i> sp.	+			

* Patogeniczność oznaczono jako stosunek liczby myszy padłych/liczby myszy zarażanych

Wszystkie patogeniczne izolaty pełzaków należały do rodzaju *Acanthamoeba*. Charakteryzowały się one wysoką zjadliwością i inwadowały głównie mózgowie, a w przypadku trzech fontann również płuca. Patogeniczność oznaczono jako stosunek liczby myszy padłych do liczby myszy zarażanych.

Ponadto z fontanny i mgły na jeziorze Malta oraz z fontanny w parku im. Adama Mickiewicza wyizolowano pełzaki niepatogeniczne należące do śluzowców z gatunku *Dictyostelium discoideum*, odżywiające się głównie bakteriami.

Dyskusja

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że fontanny – podobnie jak inne środowiska wodne – nie są wolne od pełzaków wolno żyjących w tym również od szczepów patogenicznych. Wykazano bowiem obecność pełzaków w każdej z pięciu badanych fontann na terenie miasta Poznania. Wyniki testów oznaczania patogeniczności pełzaków wskazały ich potencjalne właściwości inwazyjne. W doświadczal-

nych zarażeniach na myszach stwierdzono obecność pełzaków w tkankach w ponad połowie przeprowadzonych prób. W przeważającej większości pełzaki izolowano z tkanki mózgowej lub płucnej zwierząt. Można więc założyć, że istnieje duże prawdopodobieństwo wywołania pełzakowego zapalenia mózgu (GAE), rogówki oka (AK) lub płuc (AP) u ludzi, którego źródłem byłaby woda z fontann lub wytworzona przez te obiekty mgła lub aerozol.

Czy musimy się martwić obecnością pełzaków w fontannach? Czy pełzaki wolno żyjące mogą stanowić realne zagrożenie dla mieszkańców Poznania?

Na te pytania nie ma jednoznacznej odpowiedzi. Rutynowe badania wód wodociągowych nie obejmują wykazania obecności patogenicznych pełzaków. Jednakże takie badania przeprowadzone w USA wykazały obecność pełzaków aż w 79% badanych próbkach ujęć wody [15]. Tymczasem wolno żyjące pełzaki można izolować nie tylko z wody wodociągowej, zbiorników wodnych na świeżym powietrzu czy fontann, ale nawet z butelkowanej wody mineralnej.

Brak dokładnych badań zbiorników wodnych na terenie miasta może przyczynić się do wzrostu wodnopochoдных zarażeń pełzakami u ludzi. Cysty *Acanthamoeba* nie tylko są formą odporną na działanie wielu czynników fizycznych i chemicznych (duże wahania temperatury, wysychanie, promieniowanie), ale też mogą pełnić rolę nosicieli patogenicznych bakterii [16]. Szczególną w tym względzie rolę mogą pełnić pełzaki należące do gatunków lub rodzajów niepatogenicznych jak na przykład *Naegleria gruberi*, *Dictiostellium discoideum*, *Hartmannella* lub *Vannella* [17,18]. Perspektywa transmisji chorobotwórczych bakterii, wirusów czy grzybów znajdujących się wewnątrz komórki pełzakowej nie wpływa niestety pozytywnie na rokowanie zakażeń. Fakt nosicielstwa drobnoustrojów przez pełzaki [18] stanowi nowe dodatkowe wyzwanie dotyczące procesów uzdatniania wody. Badania opisane w niniejszej pracy zwracają uwagę na konieczność rutynowego badania obecno-

ści pełzaków patogenicznych również w fontannach i wodotryskach. Osoby używające szkieł kontaktowe oraz dzieci stanowią grupę szczególnie narażoną na wystąpienie u nich pełzakowego zapalenia rogówki [19, 20]. Dla tych osób nie jest prowadzona żadna profilaktyka zakażeń, chociaż liczba zdiagnozowanych przypadków AK rośnie z roku na rok. Jest to również poważna kwestia z racji braku skutecznego leczenia, ponieważ nie ma leków, które by dokładnie penetrowały rogówkę i usunęły pasożyta z organizmu, co dla chorego kończy się zazwyczaj przeszczepem rogówki. Na pewno trzeba zdawać sobie sprawę z zagrożeń, jakie niesie za sobą inwazja pełzaków pierwotnie wolno żyjących dla organizmu człowieka. Należy pamiętać jednak, że przy zachowaniu odpowiedniej higieny osobistej i stanu sanitarnego otaczającego nas środowiska (domu, miejsca pracy) można z dużym prawdopodobieństwem zminimalizować ryzyko zachorowania.

Piśmiennictwo / References

- Khan NA. *Acanthamoeba: Biology and Pathogenesis*. Caister Academic Press, Norfolk 2009.
- Łanocha N, Kosik-Bogacka D, Kuźna-Grygiel W. Rola pełzaków wolno-żyjących w wywoływaniu i transmisji chorób u ludzi i zwierząt. *Probl Hig Epidemiol* 2009, 90(2): 165-170.
- Kasprzak W. Pełzaki wolnożyjące o właściwościach patogenicznych dla człowieka i zwierząt. PWN, Warszawa 1985.
- Culbertson CG, Smith JW, Minner JR. Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Am J Pathol* 1959, 35(1): 185-197.
- Fowler M, Carter RF. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *Br Med J* 1965, 2(5464): 740-742.
- Trabelsi H, Dendana F, et al. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Pathol Biol (Paris)* 2012, 60(6): 399-405.
- Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. As agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 2003, 16(2): 273-307.
- 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): 1-26.
- Jain R, Tilak V. Primary amoebic meningo-encephalitis due to *Naegleria fowleri*. *J Indian Med Assoc* 2011, 109(7): 500-501.
- De Jonckheere JF. The impact of man on the occurrence of the pathogenic free-living amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Future Microbiol* 2012, 7(1): 5-7.
- Bravo FG, Seas C. *Balamuthia mandrillaris* amoebic encephalitis: an emerging parasitic infection. *Curr Intec Dis Rep* 2012, 14(4): 391-396.
- Qvamstrom Y, da Silva AJ, et al. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. *J Infect Dis* 2009, 199(8): 1139-1142.
- 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. *Tropenmed Parasit* 1972, 23(4): 391-398.
- Mazur T. Występowanie *Naegleria fowleri* w środowisku wolnym i właściwości biologiczne izolowanych szczepów. *Wiad Parazytol* 1984, 30(1): 3-35.
- Stockman LJ, Wright CJ, et al. Prevalence of *Acanthamoeba* spp. and other free-living amoebae in household water, Ohio, USA 1990-1992. *Parasitol Res* 2011, 108(3): 621-627.
- Winiecka-Krusnell J, Linder E. Bacterial infections of free-living amoebae. *Res Microbiol* 2001, 152(7): 613-9.
- Lasjerdi Z, Niyyati M, et al. First report of vannellidae amoebae (*Vannella* spp.) isolated from biofilm source. *Iran J Parasitol* 2011, 6(4): 84-9.
- Hadaś E, Derda M, Winiecka-Krusnell J, Sułek A. *Acanthamoeba* spp. as vehicles of pathogenic bacteria. *Acta Parasitol* 2004, 49(4): 276-280.
- Shukla Kent S, Robert MC, et al. Painless *Acanthamoeba* keratitis. *Canadian J Ophthalmol* 2012, 47(4): 383-384.
- Demirci G, Ay GM, et al. *Acanthamoeba* keratitis in a 5-year-old boy without a history of contact lens usage. *Cornea*, 2006, 25(3): 356-358.