

Marcin Padzik^{1*}, Edyta B. Hendiger¹, Jacek P. Szaflik², Lidia Chomicz¹

¹Zakład Biologii Medycznej Wydział Nauki o Zdrowiu, Warszawski Uniwersytet Medyczny

²Katedra i Klinika Okulistyki, II Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny,
Samodzielny Publiczny Kliniczny Szpital Okulistyczny

Wpłynęło w czerwcu, zaakceptowano we wrześniu 2017 r.

1. Wprowadzenie. 2. Rodzaj *Acanthamoeba*. 2.1. Występowanie. 2.2. Chorobotwórczość. 3. Pełzakowe zapalenie rogówki – AK. 3.1. Czynniki ryzyka. 3.2. Przebieg zarażenia. 3.3. Diagnostyka. 3.4. Leczenie i profilaktyka. 4. Ziarniniakowe pełzakowe zapalenie mózgu – GAE. 4.1. Przebieg zarażenia. 4.2. Diagnostyka i leczenie. 5. Akantameboza skórna. 5.1. Przebieg zarażenia. 5.2. Diagnostyka i leczenie. 6. Podsumowanie

Amoebae of the genus *Acanthamoeba* – pathological agents in humans

Abstract: Free living, cosmopolitan amoebae of the genus *Acanthamoeba* present a serious risk to human health. As facultative human parasites, these amoebae may cause health and life-threatening diseases, such as *Acanthamoeba* keratitis (AK), granulomatous amoebic encephalitis (GAE) and cutaneous acanthamebiasis. AK is a severe, vision-threatening cornea infection with non-specific symptoms and course. GAE is a unique central nervous system disease, almost always leading to death. Cutaneous acanthamebiasis is most common in patients with AIDS. The pathogenesis and pathophysiology of the diseases is still incompletely understood, therefore no definitive effective therapy is currently available. Prevention is very difficult due to *Acanthamoeba* ubiquity and resistance. Further studies on effective solutions for the prevention and treatment of *Acanthamoeba* infections are needed.

1. Introduction. 2. Genus *Acanthamoeba*. 2.1. Occurrence. 2.2. Pathogenicity. 3. *Acanthamoeba* keratitis – AK. 3.1. Risk factors. 3.2. Course of the disease. 3.3. Diagnostics. 3.4. Treatment and prevention. 4. Granulomatous amoebic encephalitis – GAE. 4.1. Course of disease. 4.2. Diagnostics and treatment. 5. Cutaneous acanthamebiasis. 5.1. Course of disease. 5.2. Diagnostics and treatment. 6. Summary

Słowa kluczowe: *Acanthamoeba* spp., akantameboza skórna, pełzakowe zapalenie rogówki, ziarniniakowe pełzakowe zapalenie mózgu
Key words: *Acanthamoeba* keratitis, *Acanthamoeba* spp., cutaneous acanthamebiasis, granulomatous amoebic encephalitis

1. Wprowadzenie

Ameby należące między innymi do rodzajów *Acanthamoeba*, *Naegleria* i *Balamuthia* to pierwotnie wolno żyjące pierwotniaki, powszechnie występujące w środowisku wodnym i lądowym na całym świecie. Ze względu na możliwość występowania zarówno w formie fakultatywnych pełzaków wolno żyjących (egzozoitów) jak i fakultatywnych patogenów (endozoidów) nazywane są organizmami amfizoicznymi. Jako fakultatywne pasożyty stanowią istotne zagrożenie dla życia i zdrowia ludzkiego [33, 37]. W ciągu ostatnich 10 lat zaobserwowano znaczny wzrost liczby infekcji centralnego układu nerwowego, skóry, płuc oraz oczu wywoływanych przez ameby z tej grupy [34, 71]. Dodatkowo dowiedziono, że ameby wolno żyjące mogą pełnić rolę wektorów drobnoustrojów chorobotwórczych [28]. Patogeneza infekcji wywoływanych przez ameby wolno żyjące nadal nie jest dokładnie poznana, co skutkuje trudnościami w postawieniu prawidłowej diagnozy oraz zastosowaniu skutecznego leczenia tych infekcji [37, 66, 71].

2. Rodzaj *Acanthamoeba*

Ameby z rodzaju *Acanthamoeba* zaliczane są do tzw. grupy „limax” (amfizoicznych ameb wolno żyjących), systematycznie sklasyfikowane do gromady *Sarcomastigophora*, rzędu *Amoebida* [25, 34, 37]. Podział taksonomiczny ameb ulega ciągłym zmianom i modernizacjom ze względu na badania prowadzone nad sekwencją ich genomu [60, 66]. Najnowsza klasyfikacja, zaproponowana przez Międzynarodowe Stowarzyszenie Protozoologów (ISOP), opiera się na kryteriach morfologicznych, biochemicznych oraz molekularnych. Zakłada podział patogenicznych ameb wolno żyjących na dwie Super Grupy: *Amoebozoa* (rodzaj *Acanthamoeba* i *Balamuthia*) oraz *Excavata* (rodzaj *Naegleria*) [1, 66]. Identyfikacja gatunków ameb opiera się na molekularnej analizie sekwencji 18s rRNA. Zidentyfikowano 17 różnych genotypów (T1-T17) w obrębie rodzaju *Acanthamoeba*. Za główny genotyp chorobotwórczy dla człowieka uznaje się genotyp T4, przeważnie identyfikowany u *Acanthamoeba castellanii*, ameby

* Autor korespondencyjny: Marcin Padzik, Zakład Biologii Medycznej Wydział Nauki o Zdrowiu, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Nowogrodzka 79, 02-018 Warszawa; tel. 22 625 32 23; e-mail: marcin.padzik@wum.edu.pl

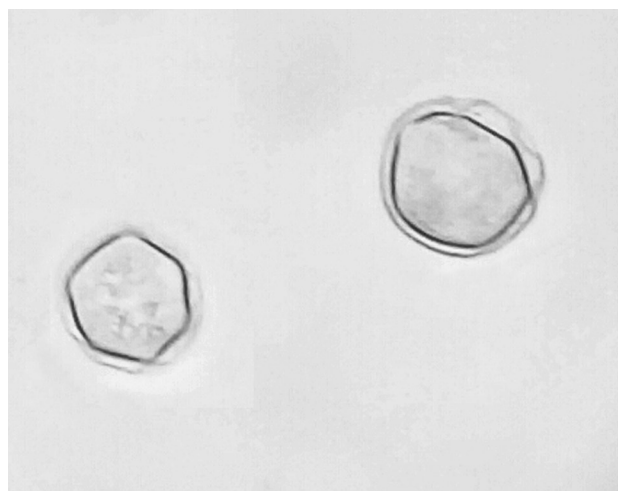
zazwyczaj wywołującej pełzakowe zapalenie rogówki (AK) [6, 25, 60, 66]. Ameby z rodzaju *Acanthamoeba* to najczęściej spotykany rodzaj ameb, szeroko rozpowszechniony w środowisku zarówno naturalnym jak i sztucznym [25, 37, 66]. Na podstawie licznych badań oraz obserwacji wyodrębniono kilkadziesiąt gatunków ameb z rodzaju *Acanthamoeba*, o różnym stopniu patogenności [25, 37]. Gatunki te mogą wykazywać różnice morfologiczne nawet w obrębie klonalnych szczepów, prawdopodobnie wynikające z warunków życia populacji [6, 66]. U cyst zaobserwowano zjawisko wewnątrzgatunkowego polimorfizmu, pełniącego istotną rolę w rozprzestrzenianiu się szczepów w środowisku [11].

2.1. Występowanie

Ameby z rodzaju *Acanthamoeba* to kosmopolityczna grupa organizmów o szerokim spektrum występowania. W cyklu życiowym ameb obecne są dwa stadia rozwoju: trofozoit (Rys. 1) i cysta (Rys. 2). Oba stadia mogą być formą inwazyjną dla człowieka [33, 34, 37]. Swoją powszechność w środowisku zarówno naturalnym jak i sztucznym ameby z rodzaju *Acanthamoeba* zawdzięczają wysokiej tolerancji trofozoitów na niekorzystne warunki środowiska [55, 66]. Cysta to stadium odporne na działanie różnego rodzaju czynników fizycznych, takich jak: zmiany temperatury, ciśnienia osmotycznego, wilgotności, pH oraz odporne na zmiany stężenia związków organicznych i nieorganicznych [6, 10, 34]. Zazwyczaj nie wykazuje wrażliwości na działanie większości środków dezynfekujących, środków antybakteryjnych czy środków antyseptycznych, np: zawartych w płynach do płukania soczewek [10, 33, 72]. Udowodniono, że cysty z rodzaju *Acanthamoeba* mogą przetrwać w wodzie destylowanej, w temperaturze 4°C, przez 25 lat, utrzymując wysoki stopień wirulencji [10, 34, 40].



Rys. 1. Trofozoit *Acanthamoeba castellanii*
Zdjęcie wykonane spod mikroskopu świetlnego, niebarwione,
powiększenie x400, fotografia: Edyta Hendiger.



Rys. 2. Cysty *Acanthamoeba castellanii*
Zdjęcie wykonane spod mikroskopu świetlnego, niebarwione,
powiększenie x400, fotografia: Edyta Hendiger.

Szczepy ameb o różnym stopniu patogenności zostały wyizolowane z wody, gleby oraz powietrza. Występują w naturalnych oraz sztucznych słodkich zbiornikach wodnych takich jak: rzeki, jeziora, stawy, gorące źródła, rolnicze zbiorniki irygacyjne czy baseny publiczne [12, 30, 33, 66]. Obecność ameb zaobserwowano w wodzie półsłodkiej oraz w słonej wodzie morskiej, w wodzie opadowej, a nawet w wodzie butelkowanej [7, 33]. Są powszechne w glebie, piaskach plażowych oraz osadach morskich. W środowisku domowym szczepy izolowane są z systemów grzewczych, wentylacyjnych, kurzu, akwariów, gleby doniczkowej, nawilżaczy powietrza czy pryszniców. Ich obecność stwierdza się również w placówkach służby zdrowia, na sprzęcie w stacjach dializ, narzędziach stomatologicznych czy w płynach do soczewek [27, 33, 66]. Na podstawie badań przeprowadzonych w aglomeracjach miejskich stwierdzono obecność ameb w fontannach oraz piaskownicach, co może stanowić potencjalne zagrożenie dla życia i zdrowia ludzkiego, w szczególności dzieci [7, 15]. Obecność ameb stwierdza się również w ściekach komunalnych, pyłach oraz wodzie wodociągowej. Podstawowe rutynowe testy wód wodociągowych nie zawierają badań na obecność ameb. Tymczasem z badań przeprowadzonych w USA, w stanie Ohio, wynika, że w 79% badanych ujęć wody wykryto obecność tych ameb [15, 59]. Ameby zostały również wyizolowane z owoców, warzyw, grzybów, roślin oraz zwierząt (płazów, gadów, ryb, ptaków, psów czy małąp) [33, 66]. U ludzi, zarówno u osób chorych jak i zdrowych, izoluje się szczepy ameb z wymazów z gardła, nosa, ucha, płwociny czy próbek kału, co może sugerować, że ameby są częścią naturalnej flory człowieka [33, 55, 72]. Podczas badań w Nigerii udowodniono kolonizację przez ameby śluzówki nosa u 24% badanej populacji [12]. Ze względu na powszechność ameb

w środowisku, u 80% badanej populacji wykryto naturalne przeciwciała IgG przeciwko amebom z rodzaju *Acanthamoeba* [33, 72].

2.2. Chorobotwórczość

Patogenność ameb z rodzaju *Acanthamoeba* wykazuje różnice międzygatunkowe oraz różnice między szczepami tego samego gatunku, a jej przyczyny wciąż nie są do końca poznane [29]. Określenie głównych czynników wirulencji jest kluczowym etapem w opracowaniu skutecznej i efektywnej terapii [33, 62]. Czynniki warunkujące chorobotwórczość ameb zostały podzielone na 2 grupy: czynniki bezpośrednio związane z patogennością oraz czynniki pośrednio związane z patogennością. Do czynników bezpośrednich zaliczana jest zdolność do adhezji, fagocytozy, sekrecji specyficznych enzymów oraz acanthaporyny (toksycznego białka formującego pory). Czynnikiem pośrednim jest zdolność transformacji formy troficzej w silnie oporną cystę, różnice morfologiczne, tolerancja zmiennych warunków środowiska, powszechność występowania, tworzenie biofilmu, chemotaksja, stan zdrowia zainfekowanego organizmu oraz oporność na leki [32]. Od momentu opisanego pierwszych przypadków zarażeń amebami z rodzaju *Acanthamoeba* prowadzone są liczne badania mające na celu określenie kryteriów identyfikacji szczepów patogennych i niepatogennych. Na podstawie tych badań określono kilka metod wykorzystywanych do określenia stopnia zjadliwości ameb [29].

Początkowo patogenność ameb określana była na bazie morfologii cysty, przy pomocy obserwacji mikroskopowej. Zauważono jednak, że budowa morfologiczna formy przetrwanej może być zmienna nawet w obrębie jednego szczepu (np: pod wpływem warunków hodowli) [29, 55, 72]. Aktualnie obserwacja mikroskopowa cyst nie jest stosowana jako metoda określania stopnia chorobotwórczości szczepu. Jednakże dzięki tej metodzie można zaobserwować istotny czynnik wirulencji u form troficzych – liczbę acanthopodiów umożliwiających adhezję do powierzchni komórek gospodarza. Szczepy patogene posiadają na powierzchni swoich trofozoitów około 100 acanthopodiów, a niepatogene zaledwie około 20 [32, 33, 44].

Dalsze badania wykazały podwyższoną tolerancję termiczną szczepów patogennych w stosunku do niepatogennych [29, 72]. Zaobserwowano zdolność szczepów patogenicznych do wzrostu i rozwoju w temperaturze 42°C oraz wyższej. Prawdopodobnie spowodowane jest to występowaniem w komórkach ameb wysokiego poziomu białek szoku cieplnego HSP60 oraz HSP70 [29, 32, 72]. Termofilność oraz zdolność przetrwania ameby w warunkach wysokiego ciśnienia osmotycznego oraz zmiennego pH uznaje się za istotne

czynniki wirulencji. Jednak nie są one wystarczające do wywołania zarażenia. Opisano sporadycznie występujące szczepy niechorobotwórcze o wysokiej tolerancji termicznej oraz szczepy chorobotwórcze nietermofilne [29, 32, 44, 62].

Wiele badań nad inwazyjnością ameb opiera się na ich właściwościach biochemicznych [29]. Markerami wirulencji jest zarówno aktywność specyficznych enzymów proteolitycznych jak i zwiększona obecność na powierzchni błony komórkowej białek wiążących mannozę (MBP), umożliwiających adhezję [33, 44, 72]. Badania wykazały wysoką aktywność enzymów proteolitycznych, głównie proteinaz serynowych i cysteinowych u szczepów o wysokim stopniu inwazyjności i chorobotwórczości. Odnotowano również wysoką aktywność elastazy i kolagenazy, peroksydazy i niską aktywnością dysmutazy ponadtlenkowej. Nie zauważono powiązania między aktywnością katalazy, a stopniem chorobotwórczości [19, 29, 33, 44]. Możliwość rozróżnienia szczepów patogennych i niepatogennych daje również sekrecja ekto-ATP-az o różnych masach molekularnych oraz porównywanie aktywności syntazy prostaglandynowej [25, 29, 33].

Chorobotwórczość pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* określana jest również w trakcie prób biologicznych, poprzez inokulację zwierząt laboratoryjnych. Sposób ten ma jednak liczne ograniczenia. Powtarzalność metody zależy od czynników takich jak dawka patogenu czy wiek zwierząt laboratoryjnych. Pełzaki wywołujące AK są inwazyjne tylko wobec niektórych ssaków (oprócz człowieka): świń domowych czy chomików. Dodatkowo próby biologiczne budzą wiele wątpliwości na tle etycznym [19, 29].

Markery morfologiczne, określanie termofilności, reakcja na zmienne pH czy inokulacja zwierząt laboratoryjnych nie spełniają wszystkich wymagań dotyczących czułości, swoistości i niezawodności metody oceny patogenności ameb [62]. Metody biologii molekularnej są doskonałym uzupełnieniem przytoczonych wcześniej technik. W badaniach nad inwazyjnością pełzaków porównano wiele metod analizy DNA takich jak PCR-RAPD, PCR-RFLP czy real-time PCR. Stosowanie powyższych metod obarczone może być jednak dużym błędem ze względu na niską powtarzalność czy utrudnioną standaryzację metody. Często też generują one wysokie koszty, są długotrwałe i skupiają się na najczęściej występujących genotypach. Za najbardziej wiarygodną metodę identyfikacji szczepów ameb z rodzaju *Acanthamoeba* uznaje się sekwencjonowanie fragmentów genomowego DNA, które zostały uznane za użyteczne markery polimorfizmu genetycznego. Najczęściej sekwencjonowany jest gen 18s rRNA. Za pomocą tej metody szczepy przydzielane są do grup genotypowych, co ułatwia określenie stopnia ich patogenności, inwazyjności lub oporności na leki [29].

Szczególną składową patogenności ameb jest zjawisko endosymbiozy. Ameby mogą być rezerwuarem dla wielu patogennych bakterii takich jak *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes* czy *Escherichia coli*. Aktualne dane donoszą, że 25% pełzaków izolowanych ze środowiska jest wektorami dla drobnoustrojów. Ameby zapewniają bakteriom ochronę przed niekorzystnymi warunkami środowiska, ułatwiają im wzrost, rozwój oraz potencjalne wywoływanie infekcji. Zauważono również dodatni wpływ bakterii Gram- na inwazyjność ameb wywołujących AK. Oprócz bakterii ameby mogą przenosić inne mikroorganizmy takie jak grzyby, pierwotniaki czy wirusy. Istotnym czynnikiem patogenyzy zarażeń jest również zdolność do tworzenia biofilmu będącego rezerwuarem dla wielu drobnoustrojów [28, 62, 66].

3. Pełzakowe zapalenie rogówki – AK

AK jest to silne zapalenie rogówki oka wywołane przez pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba*, którego efektem może być całkowita utrata wzroku. Choroba ma charakter nawracający ze względu na obecność silnie opornych cyst. Dotyka osób immunokompetentnych. Główną grupą podwyższonego ryzyka są użytkownicy soczewek kontaktowych [33]. Pierwszy przypadek AK został odnotowany w 1974 roku, w Wielkiej Brytanii. Czynnikiem poprzedzającym infekcję był mechaniczny uraz rogówki [42]. AK uwarunkowane noszeniem soczewek kontaktowych opisano w 1984 roku [52]. Liczba zdiagnozowanych przypadków AK wciąż rośnie ze względu na rozwijającą się diagnostykę oraz wzrastającą liczbę użytkowników soczewek kontaktowych. Aktualnie nie istnieje w pełni skuteczna metoda leczenia, a patogenyza zarażenia wciąż jest obiektem badań [33, 46].

3.1 Czynniki ryzyka

Głównym czynnikiem ryzyka AK jest noszenie i przechowywanie soczewek kontaktowych niezgodnie z zaleceniami lekarzy oraz producentów. Aktualnie 90% pacjentów ze zdiagnozowanym AK to osoby noszące soczewki kontaktowe [25, 55, 72]. W USA wśród miliona użytkowników soczewek odnotowuje się 1–2 przypadki AK, w Wielkiej Brytanii 20 przypadków. W Polsce także odnotowano pewną liczbę zachorowań na AK. W skali kraju jest to około kilkadziesiąt przypadków. W samej Warszawie opisano kilkanaście przypadków z potwierdzoną diagnozą AK, której przyczyną mogło być długotrwałe używanie soczewek kontaktowych, lub pływanie w otwartym akwenu wodnym [8, 34, 46, 61]. Szacuje się, że u jednej osoby na 300–1500 użytkowników soczewek kontaktowych rozwinię się AK w ciągu 30 lat od rozpoczęcia korzystania z tej

metody korekcji wad wzroku [44]. Nieprawidłowości w użytkowaniu soczewek kontaktowych mogą być spowodowane zbyt małym dostępem do informacji na temat poprawnego z nich korzystania [33, 44]. Główne błędy użytkowników soczewek to [25, 33]:

- noszenie soczewek kontaktowych przez okres dłuższy niż przewidziano w ulotce,
- nie zdejmowanie soczewek podczas kąpieli (w zanieczyszczonych zbiornikach wodnych, basenach publicznych, jacuzzi, gorących źródłach, wannach z hydromasażem), korzystania z prysznicy czy sauny,
- brak odpowiedniej higieny (mycia dłoni) podczas zakładania i zdejmowania soczewek,
- nieprawidłowe przechowywanie soczewek kontaktowych (nieodpowiedni pojemnik, używanie zanieczyszczonych lub przeterminowanych płynów do płukania soczewek, przemywanie soczewek wodą, nieregularna higiena soczewek).

Szczególnie narażeni są użytkownicy tzw. miękkich soczewek kontaktowych, używanych często okazjonalnie, np: podczas uprawiania sportu. Soczewki tego typu są wykonane z hydrofilowego plastiku ułatwiającego tworzenie biofilmu na ich powierzchni. Utrudniona jest również ich prawidłowa higiena [32].

Około 15–20% przypadków AK nie jest związana z noszeniem soczewek kontaktowych. Głównym powodem tych infekcji jest wcześniejszy, mechaniczny uraz rogówki (np: po zabiegu LASIK czy keratotomii promienistej), połączony z ekspozycją oka na zanieczyszczoną wodę, glebę, w następstwie uprawiania sportów wodnych lub zimowych [3, 25, 33, 34]. Odnotowano również przypadek AK u 5-letniego chłopca, niezwiązany z wcześniejszym noszeniem soczewek czy urazem mechanicznym rogówki [14, 44].

Uznaje się, że nie ma korelacji między płcią pacjenta, a częstością występowania AK. Badania z 1985 roku wykazują, że główną przyczyną AK u kobiet jest noszenie soczewek kontaktowych, zaś u mężczyzn AK wiąże się z wcześniejszym urazem rogówki [33, 58].

Wiek pacjenta nie odgrywa istotnej roli, jako czynnik ryzyka AK. Jednakże, podczas badań przeprowadzonych w Iranie, zauważono zwiększoną częstość występowania AK u kobiet z grupy wiekowej 15–25 lat. Tendencja ta może być spowodowana popularnością używania soczewek kontaktowych w tej grupie społecznej [25, 43, 56].

3.2. Przebieg zarażenia

AK dotyczy zwykle jednego oka, ale opisano również przypadki infekcji obustronnej [13, 25, 72]. Tempo nasilania się infekcji jest zwykle powolne. Ameby penetrują kolejne warstwy rogówki, od nabłonka, aż do podścieliska, wywołując efekty cytotoksyczne. Na

podstawie obserwacji pod mikroskopem rogówkowym wyróżniono 3 etapy AK [12, 44]:

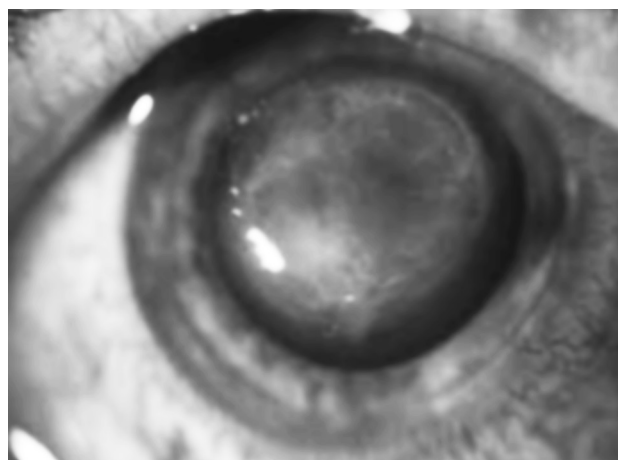
1. adhezja do nabłonka rogówki oraz wywołanie złuszczenia,
2. inwazja podścieliska rogówki,
3. zapalenie nerwu.

Warunkiem rozpoczęcia infekcji jest adhezja ameby do nabłonka rogówki gospodarza. Pełzaki najlepiej przylegają do uszkodzonego nabłonka, jednak zaobserwowano również zdolność ameb do łączenia się również ze zdrowym, nieuszkodzonym nabłonkiem rogówki [12, 33]. Głównymi elementami uczestniczącymi w adhezji są acanthopodia oraz MBP na powierzchni błony ameby [33, 44]. W momencie kontaktu ameby z gałką oczną zachodzi interakcja między MBP, a bogatymi w mannozę glikoproteinami i glikolipidami nabłonka rogówki [12, 33, 56]. Ameby penetrują nabłonek rogówki wywołując proces złuszczenia poprzez 3 mechanizmy: bezpośrednią cytolizę komórek, fagocytozę oraz indukcję apoptozy [12]. W następstwie adhezji u ameby uruchamiają się szlaki sygnałów wewnątrzkomórkowych prowadzących do rozpoczęcia sekrecji enzymów oraz substancji cytotoksycznych [33, 44, 56].

Kombinacja enzymów litycznych pozwala trofozoitom penetrować matrix zewnątrzkomórkowy tkanek zrębu nabłonka rogówki. Na tym etapie infekcji pojawia się charakterystyczny objaw nacieku promieniowego [12]. Ameby wydzielają 3 rodzaje proteaz: serynowe, cysteinowe oraz metaloproteazy. W procesie degradacji szczególną rolę odgrywają proteazy serynowe. Wysoka aktywność tego enzymu jest ściśle skorelowana z indukcją cytotoxyczności w komórkach gospodarza [1, 33, 44, 56]. Istotność proteazy serynowej zauważono podczas inkubacji ameb z inhibitorem proteazy serynowej (PMSF), podczas której zaobserwowano zmniejszenie efektu cytotoxycznego na zainfekowane komórki. Wyniki tych testów zostały potwierdzone metodą wyciszenia genów [25, 33, 56]. W miarę rozwoju zarażenia destrukcji ulega kolagen typu I, odpowiedzialny za utrzymanie integralności zrębu rogówki, oraz immunoglobulina zawarta w łzach (slgA), pierwsza bariera immunologiczna dla drobnoustrojów [25, 33].

Kolejnym etapem w procesie niszczenia zainfekowanych komórek jest fagocytoza. Powierzchnie ameby pokrywają specyficzne struktury, tzw. food cups, umożliwiające fagocytowanie niewielkich części komórek gospodarza [25, 33, 56]. Podczas obserwacji mikroskopowych w komórkach zainfekowanego nabłonka rogówki zauważono specyficzne zmiany wskazujące na apoptozę komórki takie jak: ciała apoptotyczne, zmiany w błonie komórkowej, kondensacja chromatyny i fragmentacja DNA [25, 33].

Finalnym efektem infekcji jest zapalenie nerwów rogówki. Nie zaobserwowano trofozoitów w śródbłonku rogówki oraz w komorze przedniej gałki ocznej [12].



Rys. 3. Naciek promieniowy rogówki w zarażeniu AK
Zdjęcie wykonane za pomocą lampy szczelinowej [61].

Objawy AK są niespecyficzne, trudne do jednoznacznego rozpoznania. Ze względu na podobieństwo obrazów klinicznych AK i innych schorzeń oka często początkowo stawiana jest błędna diagnoza. Symptomy mogą utrzymywać się miesiącami [10, 16, 33]. Jednymi z pierwszych objawów AK są światłowstręt, łzawienie oraz obniżona ostrość widzenia. W miarę rozwoju zapalenia mogą wystąpić takie dolegliwości jak: silny ból oka, zaczerwienienie oka, owrzodzenie rogówki, naciek promieniowy rogówki, obrzęk powieki, opadająca powieka, zapalenie spojówek oraz uczucie obecności ciała obcego. W konsekwencji AK może prowadzić do trwałej utraty wzroku [32, 66].

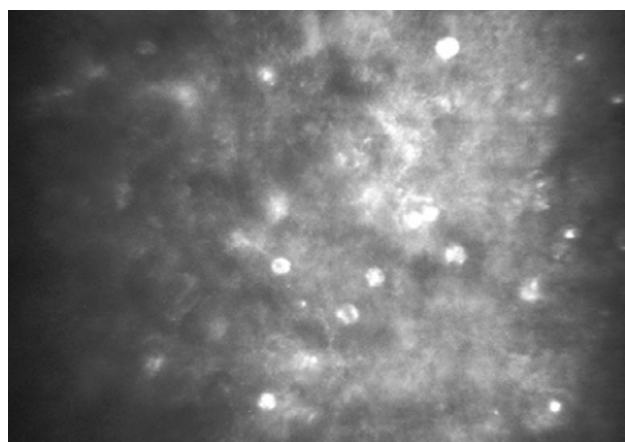
Naciek promieniowy rogówki (Rys. 3) jest charakterystycznym, wczesnym objawem AK, lecz występuje tylko w 50% przypadków [32, 66]. Jest również objawem wrzodziejącego zapalenia spojówek. Dodatkowo może być łatwo pominięty podczas rutynowego badania oka lampą szczelinową [2].

3.3. Diagnostyka

Rozpoznanie AK oparte jest na metodach takich jak mikroskopia świetlna, mikroskopia konfokalna czy hodowla *in vitro*. Coraz częściej diagnostyka poszerzana jest o techniki molekularne oraz immunologiczne [25, 55, 72]. W procesie diagnostycznym AK istotnym etapem jest prawidłowe pobranie próbki do badań. Rekomendowanym materiałem są zeszkrobiny rogówkowe lub tkanka pobrana podczas biopsji. Ameba przez bardzo krótki czas utrzymuje się na powierzchni nabłonka rogówki. Następnie, w miarę rozwoju zarażenia, penetruje kolejne jej warstwy. Dlatego nie zaleca się wykonywania testów z próbek powierzchniowych takich jak wymaz z gałki ocznej czy łzy, zwłaszcza w zaawansowanym stadium choroby lub po uprzedniej antybiotykoterapii. Optymalny materiał do procesu diagnostycznego AK to zeszkrobiny rogówki lub

materiał pobrany podczas biopsji rogówki, zanurzony w podłożu transportowym: PBS lub 0,9% NaCl, aby zapobiec wysychaniu. Po uzyskaniu i zabezpieczeniu próbki materiał jest bezpośrednio przeznaczony do izolacji DNA, zaś podłoże transportowe do hodowli na podłożu stałym (NN agar, opłaszczony bakteriami Gram-) lub płynnym (PBS z dodatkiem bakterii) [32].

Diagnostyka ciężkich przypadków może opierać się na preparatach bezpośrednich ze względu na dużą gęstość ameb [32]. Za użyteczną metodę diagnostyczną uznaje się też badanie lampą szczelinową zapewniającą powiększenie około 10–25 razy [29, 61]. Występujące na wczesnym etapie AK zmiany możliwe do zaobserwowania podczas badania lampą szczelinową to powierzchniowe zmiany zapalne nabłonka rogówki, zmiany pseudodendrytyczne nabłonka rogówki, punktowe uszkodzenia nabłonka, nacieki promieniowy w centralnej części rogówki, zapalne ciała satelitarne oraz rozproszone ciała zapalne. Po około 3–8 tygodniach od zarażenia zauważyć można zmniejszenie się centralnej części rogówki, ropę w przedniej komorze oka, stany zapalne twardówki oraz neowaskularyzację [10]. Zwykle jednak za wstępny etap rozpoznania uznaje się metodę mikroskopii konfokalnej *in vivo*. Jest to szybka, nieinwazyjna metoda o wysokiej czułości diagnostycznej [10, 23, 44, 47]. Mikroskopia konfokalna daje również możliwość wykrycia w preparacie cyst oraz trofozoitów. Istnieje jednak możliwość błędnej interpretacji, ze względu na podobieństwo form morfologicznych ameb do innych komórek gałki ocznej. W preparacie obserwowanym pod mikroskopem konfokalnym, cysty to sferyczne, hiperrefleksyjne struktury o podwójnej ścianie, przypominające leukocyty lub jądra komórek nabłonka rogówki (Rys. 4). Trofozoity zaś morfologicznie podobne są do keratocytów oraz jąder leukocytów [10, 44, 69]. Ze względu na możliwość pomyłki, osoba oceniająca preparat powinna dokładnie znać morfologię rozróżnianych komórek [10]. Metoda



Rys. 4. Hiperrefleksyjne cysty *Acanthamoeba* spp. w miejscu owróżdzenia rogówki w przebiegu AK
Zdjęcie wykonane *in vivo* za pomocą mikroskopu konfokalnego [61].

mikroskopii konfokalnej jest użyteczna w przypadku szczepów o wysokiej żywotności, intensywnym tempie podziałów, mogących przetrwać na podłożu hodowlanym przez około 42 miesiące. W przypadku szczepów o niskiej żywotności i krótkim, około 10-dniowym czasie przeżycia w hodowli, mikroskopia konfokalna nie jest w pełni wiarygodna. Dodatkowym ograniczeniem jest mała gęstość ameb w preparacie (np: we wczesnym stadium AK), występowanie infekcji mieszanych oraz wdrożenie antybiotykoterapii [9, 10, 32].

Ze względu na niespecyficzność objawów oraz podobieństwo obserwowanych zmian w gałce ocznej AK często w swojej początkowej fazie mylone jest z wirusowym zapaleniem rogówki wywołanym przez wirusa HSV. W późniejszych stadiach zarażenia, błędy w diagnozie mogą wynikać z podobieństwa obrazu klinicznego AK do bakteryjnego (np.: wywołanego przez *Pseudomonas aeruginosa*) lub grzybiczego (np: wywołanego przez grzyby z rodzaju *Candida* lub *Fusarium*) zapalenia rogówki. Udowodniono również, że około 50% zakażeń to infekcje mieszane [8–10, 73].

Za „złoty standard” w diagnostyce AK uznaje się hodowle na podłożach wzbogaconych [10, 32, 54]. Próbkę kliniczną posiewa się na podłoże NN agar, opłaszczony wcześniej bakteriami Gram- z 24 h hodowli, np: *Escherichia coli* lub *Enterobacter aerogenes*. Hodowle inkubuje się w 30°C przez 7 dni. Wzrost ameb na szalce ocenia się przy użyciu mikroskopu odwróconego z kontrastem fazowym. W przypadkach ciężkich zarażeń wzrost ameb zauważalny jest już po 24–48 h. Alternatywnie hodowlę można założyć w butelce hodowlanej. Próbkę zawiesza się w PBS z dodatkiem bakterii [32]. Hodowla na podłożu wzbogaconym o antybiotyki (penicylinę, streptomycynę) pozwala na możliwość klasyfikacji cyst do określonych grup morfologicznych [10].

Aktualnie coraz większe znaczenie w procesie diagnostycznym mają metody molekularne oparte na technice PCR i jej odmianach. Dzięki nim można przypisać dany szczep ameb do odpowiedniej grupy morfologicznej. W przypadku odmiennej morfologii metody molekularne są niezbędnym etapem rozpoznania. Amplifikacja DNA wizualizowana jest podczas elektroforezy na żelu agarozowym. Genotypowanie potwierdza wiarygodność identyfikacji [10, 32, 49, 53].

Metody immunologiczne nie mają dużej wartości diagnostycznej ze względu na powszechność ameb w środowisku. Specyficzne przeciwciała, wykorzystywane podczas testów tego typu, są również obecne u osób zdrowych [32].

3.4. Leczenie i profilaktyka

Aktualnie nie istnieje jednoznacznie skuteczna terapia przeciwko AK. Znane metody leczenia są często nieefektywne, toksyczne i długotrwałe. Znaczny wpływ

na powodzenie terapii ma wczesne, prawidłowe rozpoznanie [33, 72, 73]. Trudności w leczeniu AK spowodowane są takimi czynnikami jak: zaawansowane stadium choroby wynikające z błędnej diagnozy, szerokie spektrum wirulencji szczepów, infekcje mieszane, wysoka oporność ameb na leki, transformacja trofozoitów w silnie oporną formę przetrwaną czy brak korelacji między wynikami testów laboratoryjnych *in vitro* i *in vivo* [8, 40, 55, 72].

Obecnie leczeniem pierwszego rzutu podczas AK są diamidy takie jak: propamidyna, heksamidyna oraz biguanidy takie jak: chlorowoderek poliheksametylenbiguanidyny (PHMB) czy chlorheksydyna. Monoterapia jest zalecana tylko w przypadku wczesnie zdiagnozowanych pacjentów. Związki te zwiększają przepuszczalność błony komórkowej ameb poprzez łączenie się wysoko dodatnio naładowanych cząstek z mukopolisacharydowymi częściami ostioli. W efekcie penetrują amebę doprowadzając do jej lizy i śmierci [30, 31]. PHMB i chlorheksydyna są efektywne w niskich stężeniach, PHMB ma toksyczny wpływ na nabłonek rogówki [27, 32, 33].

W przypadku zaawansowanego stadium choroby stosowane jest leczenie mieszane. Chlorheksydyna (0,02–0,2%) używana jest głównie w połączeniu z PHMB (0,02–0,06%) i izetionianempropamidyny (0,1%). Prawidłowe dawkowanie to: 1–2 krople, raz na 1 h, od 3 do 9 dni. Po upływie tego czasu należy zmniejszyć częstotliwość podawania leku do 1–2 kropli, raz na 3 h. Pierwsze efekty powinny być zauważalne 2 tygodnie od rozpoczęcia leczenia. Maksymalny czas terapii to 3–4 tygodnie. Ze względu na możliwość nawrotu choroby, pacjenci powinni pozostawać pod ścisłą kontrolą lekarską. W trakcie ustępowania objawów choroby badania kontrolne należy przeprowadzać 1–2 razy w tygodniu. Po zakończeniu terapii, przez 6 miesięcy, wskazane jest kontrolowanie stanu rogówki raz w miesiącu [10, 22, 32]. Przeprowadzono również testy terapii mieszanych: chlorheksydyny z dibromopropamidyną i neomycyną. Leczenie to przynosi skutki tylko na wczesnym etapie zarażenia [4, 25, 33]. U niektórych pacjentów zastopowanie rozwoju choroby następowało po podaniu 1% mikonazolu z 1% propamidyną oraz itrakonazolu z 0,1% mikonazolem i ketokonazolem. Podobne efekty wywoływał również worykonazol [33, 72]. Stosowano również chlorheksydynę w połączeniu z jodkiem powidonu oraz PHMB razem z flukonazolem [18, 27, 64].

W przypadku późno zdiagnozowanych infekcji, połączonych z ostrym stanem zapalnym, pomocniczo w terapii stosowane są kortykosteroidy. Jednak ze względu na skutki uboczne takie jak: osłabienie układu immunologicznego pacjenta zahamowanie procesu transformacji ameb, zwiększenie tempa podziałów czy wzrost patogenności, wykorzystywanie kortykosteroidów jest uznane za metodę kontrowersyjną [32, 33, 67].

Gdy leczenie farmakologiczne nie przynosi oczekiwanych rezultatów, przeprowadzany jest przeszczep rogówki. Wskazaniami do transplantacji są: znaczne pogorszenie wzroku, ciężkie uszkodzenia nabłonka oraz wyraźne zmniejszenie grubości rogówki. Istnieje jednak ryzyko zakażenia rogówki dawcy podczas operacji [22, 26, 32, 33]. Obiecującą metodą leczenia jest modyfikacja klasycznej transplantacji rogówki – DALK. Charakteryzuje się ona niższym współczynnikiem odrzutów przeszczepu oraz zmniejszeniem liczby nawrotów spowodowanych zakażeniami śródoperacyjnymi [45].

W miarę rozwoju badań nad AK opracowywane są nowe metody leczenia, głównie wykorzystujące techniki biologii molekularnej. Głównym celem tych badań jest opracowanie maksymalnie skutecznej terapii przy minimalnej toksyczności dla pacjenta. W terapii AK zastosowano leczenie przeciwnowotworowe oraz zsyntetyzowano siRNA, który w przypadku AK wykorzystano do identyfikacji nowych celów terapeutycznych w komórce ameby [33, 39].

W ostatnich latach nastąpił silny rozwój nanotechnologii. Syntetyzowane nanocząstki, głównie srebra i złota, znalazły zastosowanie, jako środki przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe oraz przeciwgrzybiczne nowej generacji [51]. Przeprowadzone badania własne potwierdzają działanie przeciwamebowe różnych rodzajów nanocząstek srebra w stężeniach bliskich granicy cytotoxyczności dla komórek ludzkich [20].

Niezwykle istotnym aspektem w procesie terapeutycznym AK jest obecność silnie opornych cyst mogących wywołać nawrót choroby nawet po wielu miesiącach od zakończenia leczenia [33]. Dlatego tak ważnym jest opracowanie metody leczenia zapobiegającej przekształcaniu się formy troficznej w formę przetrwaną. Niektóre testy wykazały inaktywujący wpływ promieniowania mikrofalowego [21], pulsacyjnego pola elektrycznego [68] oraz promieniowania ultrafioletowego [48] na cysty, jednakże metody te wymagają dalszej, wnikliwej analizy.

Ze względu na brak skutecznego leczenia AK istotne jest udostępnianie i rozpowszechnianie wiedzy na temat działań profilaktycznych. Zalecenia te powinny zawierać w szczególności informacje na temat [10, 33]:

- prawidłowej higieny soczewek kontaktowych,
- odpowiedzialnego użytkowania soczewek kontaktowych,
- zachowania szczególnej ostrożności podczas podróży do krajów o klimacie tropikalnym,
- niepokojących objawów i odpowiedniej na nie reakcji.

Użytkownicy soczewek kontaktowych często zbyt późno zgłaszają się do lekarza. Jest to spowodowane zmniejszeniem wrażliwości na dyskomfort, np: ból oka ze względu na ciągle podrażnianie gałki ocznej przez

soczewkę. Należy pamiętać, aby w przypadku jakichkolwiek niepokojących dolegliwości niezwłocznie zgłosić się do lekarza okulisty [32].

4. Ziarniniakowe pełzakowe zapalenie mózgu – GAE

GAE jest to rzadkie schorzenie centralnego układu nerwowego wywoływane przez ameby z rodzaju *Acanthamoeba*. W sumie na świecie odnotowano około 200 przypadków zachorowań na tę jednostkę chorobową. Choroba ma charakter jednostkowy, dlatego część przypadków najprawdopodobniej mogła zostać nieopisana z powodu błędnej diagnozy. Dotychczas w Polsce nie potwierdzono zachorowań na GAE [30, 66].

4.1. Przebieg zarażenia

Infekcja centralnego układu nerwowego ma charakter oportunistyczny. Dotyka osób o obniżonej odporności, np: chorych na AIDS, cierpiących na choroby przewlekłe takie jak cukrzyca, przyjmujących leki immunosupresyjne po przeszczepach narządów oraz osób upośledzonych umysłowo. Czynniki ryzyka infekcji są również alkoholizm, anoreksja, ciąża oraz leczenie przeciwnowotworowe (chemioterapia, radioterapia). Notowano również pojedyncze przypadki zachorowań niezwiązane z zaburzeniami mechanizmów immunologicznych [5, 66, 72]. Wrotami zarażenia są płuca, zmiany skórne lub nabłonek węchowy, skąd ameby przedostają się do układu krwionośnego. Zajęcie centralnego układu nerwowego następuje po przekroczeniu bariery krew-mózg. Oprócz centralnego układu nerwowego, zainfekowany może być również szpik kostny oraz inne narządy, takie jak: wątroba, nerki czy trzustka [25, 66]. Patogeneza zarażenia nie jest dokładnie poznana. Okres inkubacji choroby jest zmienny, trwa od 10 dni do kilku miesięcy. Sama infekcja zaczyna się nagle i objawia się silnymi bólami głowy, wysoką temperaturą, wymiotami, sztywnością karku, napadami padaczkowymi, zaburzeniami wzroku, węchu i smaku oraz zaburzeniami psychicznymi takimi jak halucynacje, zaburzenia świadomości czy dezorientacja. W 90% przypadków GAE prowadzi do śmierci [55, 66, 72].

4.2. Diagnostyka i leczenie

Diagnostyka GAE opiera się na preparatach bezpośrednich obserwowanych pod mikroskopem kontrastowo-fazowym, preparatach trwałych, barwionych metodą Wrighta lub Giemsy oraz badaniu płynu mózgowo-rdzeniowego. Analiza bioptatów stwierdza pleocytozę z przewagą limfocytów, podwyższone stężenie białka oraz obniżone stężenie glukozy [36, 37,

72]. Obiecującą metodą diagnostyczną jest PCR na podstawie DNA uzyskanego z materiału biopsyjnego. Technika ta daje nadzieję na szybszą diagnozę i wcześniejsze rozpoczęcie leczenia [35, 66].

Aktualnie nie istnieje żadna w pełni skuteczna terapia przeciwko GAE. Obecne metody leczenia obejmują podanie dożylnie kombinacji pochodnych azolowych, takich jak: ketokonazol, itrakonazol, flukonazol oraz rifampicyny, sulfodiazyny, erytromycyny i flucytozyny. Postępowanie to jest nieefektywne i nadzwyczaj rzadko prowadzi do sukcesu terapeutycznego. Odnotowane przypadki wyzdrowień mają charakter incydentalny [24, 37, 66].

5. Akantameboza skórna

Akantameboza skórna to rzadko spotykane, schorzenie powłok skórnych, wywołwane przez pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba*. Patogeneza zarażenia nie została do tej pory w pełni wyjaśniona. Nie jest również jasne, czy zmiany skórne są głównym elementem infekcji, czy też wynikiem rozprzestrzeniania się patogenów na powłokach skórnych z innych narządów, np: układu oddechowego, zatok czy centralnego układu nerwowego [17, 36].

5.1. Przebieg zarażenia

Infekcja dotyczy głównie osób z zaburzeniami układu odpornościowego. Główną grupą podwyższonego ryzyka są osoby chorujące na AIDS, osoby zażywające leki obniżające odporność, np: w wyniku przeszczepu narządów oraz osoby cierpiące na choroby na tle immunologicznym [36, 41, 70]. Wrotami zarażenia są skóra, zatoki węchowe oraz górne drogi oddechowe. Okres inkubacji choroby jest różny i może wynosić od kilku tygodni do kilku miesięcy. Wczesne objawy infekcji to obecność trudno gojących się ran ropnych oraz owrzodzeń, z tendencją do rozprzestrzeniania się. Z czasem pojawiają się twarde skórne guzki rumieniowate, ziarniniakowe zmiany skórne oraz ostre stany zapalne ran. Dodatkowym objawem może być zapalenie zatok nosowych [36, 50]. Śmiertelność w wyniku akantamebozy skórnej wynosi ok 70%. W przypadku pacjentów z zainfekowanym centralnym układem nerwowym wynosi 100% [36, 65].

5.2. Diagnostyka i leczenie

Diagnostyka akantamebozy skórnej bazuje na badaniach histologicznych oraz hodowli *in vitro*. W wyniku barwienia preparatu biopsyjnego barwnikami hematoxylina-eozyna, kalkofluorem czy metodą Shiffa, zaobserwować można ogniska martwicy komórek otoczone

przez wrzodzące pola, oznaki zapalenia naczyń oraz obecność cyst i trofozoitów ameb [36, 38].

W przypadku hodowli materiał pobrany bezpośrednio z rany posiewa się na agar nieodżywczy, opłaszczony *E. coli* lub *P. aeruginosa*. Wzrost oceniany jest po tygodniu od rozpoczęcia hodowli, jednakże jego prawidłowa ocena jest utrudniona ze względu na zjawisko encystacji. Badanie zakończone wynikiem negatywnym należy powtórzyć. Do diagnostyki akantamebozy skórnej wprowadza się również metody z zakresu biologii molekularnej, takie jak RFLP-PCR czy RAPD-PCR oraz metody immunocytochemiczne [36, 38].

Ze względu na zbliżony obraz kliniczny, akantameboza skórna bywa mylona z innymi chorobami skóry. Rany wyglądem przypominają zakażenia bakteryjne (mykobakteriozy), grzybicze (blastomykoza), wirusowe (cytomegalia) oraz zmiany zapalne pourazowe. Z tego względu często stawiana jest błędna diagnoza. Objawy infekcji przypominają również symptomy choroby kociego pazura, mięsaka Kapossiego, angiomatozy pachwinowej czy penniciliozy [36].

Do tej pory nie opracowano standardów leczenia akantamebozy skórnej. Obecnie stosowane preparaty to: itrakonazol, pentamidyna, 5-fluocytozyna, diglukonianchlorheksydyny czy ketokonazol. Zwykle jednak metody te nie przynoszą pozytywnych efektów [36, 57]. Opisano również pojedyncze przypadki zastosowania leczenia chirurgicznego połączonego z leczeniem farmakologicznym [63].

6. Podsumowanie

Pełzaki wolno żyjące z rodzaju *Acanthamoeba* to kosmopolityczne ameby, charakteryzujące się dużą rezerwą adaptacyjną. Jako fakultatywne pasożyty stanowią istotne zagrożenie dla zdrowia i życia ludzkiego. Wywoływane przez nie jednostki chorobowe takie jak: AK czy GAE, to silne infekcje o niespecyficznym objawach i przebiegu. Pomimo wieloletnich badań podejmowanych w różnych ośrodkach naukowych i klinicznych na całym świecie, brakuje opracowanych algorytmów postępowania, przez co przeprowadzenie prawidłowego procesu diagnostycznego oraz wdrożenie skutecznego leczenia jest w dalszym ciągu problematyczne. Obecnie prowadzone badania ukierunkowane są głównie na sformułowanie skutecznej terapii. Nowo opracowywane metody eradykacji ameb wykorzystują między innymi techniki z dziedziny biologii molekularnej czy nanotechnologii. Ze względu na szerokie spektrum występowania ameb, popularność używania soczewek kontaktowych oraz brak świadomości społecznej istniejącego zagrożenia, infekcje oka wywołwane przez ameby z rodzaju *Acanthamoeba* są problemem, którego ranga będzie wzrastać. Propagowanie

i poszerzanie wiedzy na temat możliwych działań profilaktycznych oraz prowadzenie dalszych badań mających na celu doskonalenie obecnych metod diagnostyki i leczenia to istotne i pożądane działania mające na celu redukcję ryzyka zarażenia oraz poprawienie skuteczności leczenia akantamebozy.

Piśmiennictwo

1. Adl S.M., Taylor M.F.J.R i wsp.: The new higher-level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* **52**, 399–451 (2005)
2. Alfawaz A.: Radial keratoneuritis as a presenting sign in *Acanthamoeba* keratitis. *Mid. East. Afr. J. Ophthalmol.* **18**, 252 (2011)
3. Arnalich-Montiel F., Almendral A., Arnalich F., Valladares B., Lorenzo-Morales J.: Mixed *Acanthamoeba* and multidrug-resistant *Achromobacter xyloxydans* in late-onset keratitis after laser in situ keratomileusis. *J. Cataract. Refr. Sur.* **38**, 1853–1856 (2012)
4. Astorga B., Lorenzo-Morales J., Martín-Navarro C.M., Alarcón V., Moreno J., González A.C., Navarette E., Piñero J.E., Valladares B.: *Acanthamoeba* Belonging to T3, T4, and T11: Genotypes Isolated from Air-Conditioning Units in Santiago, Chile. *J. Eukaryot. Microbiol.* **58**, 542–544 (2011)
5. Barete S., Combes A., de Jonckheere J.F., Datry A., Varnous S., Martinez V.: Fatal disseminated *Acanthamoeba lenticulata* infection in a heart transplant patient. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 736–738 (2007)
6. Chalmers R.M.: *Acanthamoeba* (w) Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks (second edition), red. S.L. Percival, M.V. Yates, D.W. Williams, R.M. Chalmers, N.F. Grey, Academic Press, UK, 2014, 263–276
7. Cholewiński M., Hadaś E., Derda M., Wojt J.W., Skrzypczak Ł.: Występowanie patogenicznych pełzaków wolno żyjących z rodzaju *Acanthamoeba* w piaskownicach miejskich. *Nowiny Lekarskie*, **82**, 138–141 (2013)
8. Chomicz L., Conn D.B., Padzik M., Szaflik J.P., Walochnik J., Zawadzki P.J., Pawłowski W., Dybicz M.: Emerging threats for human health in Poland: pathogenic isolates from drug resistant *Acanthamoeba* keratitis monitored in terms of their in vitro dynamics and temperature adaptability. *Bio. Med. Res. Int.* DOI:10.1155/2015/231285 (2015)
9. Chomicz L., Padzik M., Szaflik J.P., Nahorski W.L., Kryczka T., Szaflik J.: Monitoring of in vitro dynamics of *Acanthamoeba* strains isolated from infected eyes as a useful tool in keratitis management. *Exp. Parasitol.* **145**, 73–77 (2014)
10. Chomicz L., Szaflik J.P., Padzik M., Izdebska J.: *Acanthamoeba* keratitis: The Emerging Vision-2 Threatening Corneal Disease. *Advances in Common Eye Infections, Intech.* **2016**, 99–120 (2016)
11. 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. Dydak. Wychow.* **9**, 34–39 (2003)
12. Clarke B., Sinha A., Parmar D.N., Sykakis E.: Advances in the diagnosis and treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *J. Ophthalmol.* **2012**, 484–892 (2012)
13. Dart J.K., Saw V.P., Kilvington S.: *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis and treatment update 2009. *American. J. Ophthalmol.* **148**, 487–499 (2009)

14. Demirci G., Ay G.M., Karabas L.V., Altintas Ö., Tamer G.S., Çağlar, Y.: *Acanthamoeba* keratitis in a 5-year-old boy without a history of contact lens usage. *Cornea*, **25**, 356–358 (2006)
15. Derda M., Hadaś E., Wojtkowiak-Giera A., Wojt, J.W., Cholewiński M., Skrzypczak Ł.: Występowanie pełzaków pierwotnie wolno żyjących w fontannach. *Probl. Hig. Epidemiol.* **94**, 147–150 (2013)
16. Edagawa A., Kimura A., Kawabuchi-Kurata T., Kusuhara Y., Karanis P.: Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. *Parasitol. Res.* **105**, 1109–1117 (2009)
17. Friedland L.R., Raphael S.A., Deutsch E.S., Johal J., Martyn L.J., Visvesvara G.S., Lischner H.W.: Disseminated *Acanthamoeba* infection in a child with symptomatic human immunodeficiency virus infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **11**, 404–407 (1992)
18. Gatti S., Cevini C., Bruno A., Penso G., Rama P., Scaglia M.: *In vitro* effectiveness of povidone-iodine on *Acanthamoeba* isolates from human cornea. *J. Antimicrob. Agents. Chemother.* **42**, 2232–2234 (1998)
19. Hadaś E., Mazur T.: Proteolytic enzymes of pathogenic and non-pathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. *Trop. Med. Parasitol.* **44**, 197–200 (1993)
20. Hendiger E.B.: Wpływ nanocząstek srebra i złota oraz jodopowidonu na przeżywalność ameb z rodzaju *Acanthamoeba*. Praca magisterska, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej (2017)
21. Hiti K., Walochnik J., Faschinger C., Haller-Schober E.M., Aspöck H.: Microwave treatment of contact lens cases contaminated with *Acanthamoeba*. *Cornea*, **20**, 467–470 (2001)
22. Izdebska J., Uliasz A., Szaflik J.P., Szaflik J.: *Acanthamoeba* keratitis – Conservative and Surgical Treatment. *Okulistyka*, **1**, 26 (2014)
23. Kanavi M.R., Javadi M., Yazdani S., Mirdehghanm S.: Sensitivity and specificity of confocal scan in the diagnosis of infectious keratitis. *Cornea*, **26**, 782–786 (2007)
24. Khan N.A.: *Acanthamoeba* and the blood-brain barrier: the breakthrough. *J. Med. Microbiol.* **57**, 1051–1057 (2008)
25. Khan N.A.: *Acanthamoeba* biology and increasing importance in human health. *FEMS. Microbiol. Rev.* **30**, 564–595 (2006)
26. Kitzmann A.S., Goins K.M., Sutphin J.E., Wagoner M.D.: Keratoplasty for treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmology*, **116**, 864–869 (2009)
27. Kumar R., Lloyd D.: Recent advances in the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Clin. Infect. Dis.* **35**, 434–441 (2002)
28. Leońska-Duniec A.: Pełzaki wolno żyjące jako wektory mikroorganizmów chorobotwórczych. *Probl. Hig. Epidemiol.* **92**, 173–180 (2011)
29. Leońska-Duniec A.: Problemy w określeniu chorobotwórczości pełzaków wolno żyjących z rodzaju *Acanthamoeba*. *Probl. Hig. Epidemiol.* **94**, 24–30 (2013)
30. Leońska-Duniec A.: Występowanie potencjalnie chorobotwórczych pełzaków wolno żyjących w Polsce. *Probl. Hig. Epidemiol.* **96**, 335–339 (2015)
31. Lim N., Goh D., Bunce C., Xing W., Fraenkel G., Poole T.R., Ficker L.: Comparison of polyhexamethylenebiguanide and chlorhexidine as monotherapy agents in the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *American J. Ophthalmol.* **145**, 130–135 (2008)
32. Lorenzo-Morales J., Khan N.A., Walochnik J.: An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*, **22**, 10 (2015)
33. Lorenzo-Morales J., Martín-Navarro C.M., López-Arencibia A., Arnalich-Montiel F., Piñero J.E., Valladares B.: *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? *Trends. Parasitol.* **29**, 181–187 (2013)
34. Łanocha N., Kosik-Bogacka D., Kuźna-Grygiel W.: Rola pełzaków wolno-żyjących w wywoływaniu i transmisji chorób u ludzi i zwierząt. *Probl. Hig. Epidemiol.* **90**, 165–170 (2009)
35. MacLean R.C., Hafez N., Tripathi S., Childress C.G., Ghatak N.R., Marciano-Cabral F.: Identification of *Acanthamoeba* sp. in paraffin-embedded CNS tissue from an HIV+ individual by PCR. *Diag. Microb. Infect. Dis.* **57**, 289–294 (2007)
36. Marciano-Cabral F., Cabral G.: *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 273–307 (2003)
37. Martinez A.J., Visvesvara G.S.: Free-living, amphizoic and opportunistic amoebas. *Brain. Pathol.* **7**, 583–598 (1997)
38. Martinez A.J., Visvesvara G.S.: Laboratory diagnosis of pathogenic free-living amoebas: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, and *Leptomyxid*. *Clin. Lab. Med.* **11**, 861 (1991)
39. Martín-Navarro C.M., Lorenzo-Morales J., Machin R.P., López-Arencibia A., García-Castellano J.M., de Fuentes I., Loftus B., Sutherland K.M., Valladares B., Piñero J.E.: Inhibition of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme a reductase and application of statins as a novel effective therapeutic approach against *Acanthamoeba* infections. *Antimicrob. Agents. Ch.* **57**, 375–381 (2013)
40. Mazur T., Hadaś E., Iwanicka I.: The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Trop. Med. Parasitol.* **46**, 106–108 (1995)
41. Murakawa G.J., McCalmont T., Altman J., Telang G.H., Hoffman M.D., Kantor G.R., Berger, T.G.: Disseminated acanthamebiasis in patients with AIDS: a report of five cases and a review of the literature. *Arch. Dermatol.* **131**, 1291–1296 (1995)
42. Nagington J., Watson P.G., Playfair T.J., McGill J., Jones B.R., Steele A.D.: Amoebic infections of the eye. *Lancet*, **304**, 1537–1540 (1974)
43. Niyayati M., Lorenzo Morales J., Rezaie S., Rahimi F., Mohebbali M., Maghsood A.M.: Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains from dust sources in Iran. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **103**, 425–427 (2009)
44. Panjwani N.: Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. *Ocul. Surf.* **8**, 70–79 (2010)
45. Parthasarathy A., Tan D.T.H.: Deep lamellar keratoplasty for *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea*, **26**, 1021–1023 (2007)
46. Radford C.F., Minassian D.C., Dart J.K.: *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales : incidence, outcome, and risk factors. *Br. J. Ophthalmol.* **86**, 536–542 (2002)
47. Rezaei K.M., Naghshgar N., Javadi M. A., Sadat H.M.: Various confocal scan features of cysts and trophozoites in cases with *Acanthamoeba* keratitis. *Eur. J. Ophthalmol.* **22**, 46–50 (2011)
48. 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.* **13**, 388–389 (1991)
49. Rivière D., Szczebara F.M., Berjeaud J.M., Frère J., Hécharde Y.: Development of a real-time PCR assay for quantification of *Acanthamoeba* trophozoites and cysts. *J. Microbiol. Meth.* **64**, 78–83 (2006)
50. Rosenthal S., Reed E.J., Weisman R.A.: Effect of lytic enzymes of *Acanthamoeba castellanii* on bacterial cell walls. *J. Bacteriol.* **98**, 182–189 (1969)
51. Rzeszutek J., Matysiak M., Czajka M., Sawicki K., Rachubik P., Kruszewski M., Kapka-Skrzypczak L.: Zastosowanie nanocząstek i nanomateriałów w medycynie. *Hygeia Public. Health.* **49**, 449–457 (2014)
52. Samples J.R., Binder P.S., Luibel F.J., Font R.L., Visvesvara G.S., Peter C.R.: *Acanthamoeba* keratitis possibly acquired from a hot tub. *Arch. Ophthalmol.* **102**, 707–710 (1984)
53. Schroeder J.M., Booton G.C., Hay J., Niszl I.A., Seal D.V., Markus M.B., Fuerst P.A., Byers T.J.: Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identi-

- fication of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1903–1911 (2001)
54. Schuster F.L.: Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* **15** (3), 342–354 (2002)
55. Schuster F.L., Visvesvara G.S.: Free-living amoebae as opportunistic and nonopportunistic pathogens of humans and animals. *Int. J. Parasitol.* **34**, 1–27 (2004)
56. Siddiqui K., Khan N.: Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit. Vectors.* **5**, 6 (2012)
57. Slater C.A., Sichel J.Z., Visvesvara G.S., Pabico R.C., Gaspari A.A.: Successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* infection in an immunocompromised patient. *New Engl. J. Med.* **331**, 85–87 (1994)
58. Stehr-Green J.K., Baily T.M., Visvesvara G.S.: The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. *Am. J. Ophthalmol.* **107**, 331–336 (1989)
59. Stockman L.J., Wright C.J., Visvesvara G.S., Fields B.S., Beach M.J.: Prevalence of *Acanthamoeba* spp. and other free-living amoebae in household water., Ohio, USA – 1990–1992. *Parasitol. Res.* **108**, 621–627 (2011)
60. Stothard D.R., Schroeder-Diedrich J.M., Awwad M.H., Gast R.J., Ledee D.R., Rodriguez-Zaragoza S., Dean C.L., Fuerst P.A., Byers T.J.: The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J. Eukaryot. Microbiol.* **45**, 45–54 (1998)
61. Szaflik J.P., Padzik M., Chomicz L., Oledzka G., Izdebska J.: Usefulness of *in vitro* diagnostics in difficult incidences of *Acanthamoeba* keratitis requiring pharmacotherapy and surgical management. *Okulistyka*, **3**, 28–32 (2012)
62. Szénási Z., Endo T., Yagita K., Nagy E.: Isolation, identification and increasing importance of 'free-living' amoebae causing human disease. *J. Med. Microbiol.* **47**, 5–16 (1998)
63. Teknos T.N., Poulin M.D., Laruentano A.M., Li K.K.: *Acanthamoeba* rhinosinusitis: characterization, diagnosis, and treatment. *Am. J. Rhinol.* **14**, 387–391 (2000)
64. Tien S.H., Sheu M.M.: Treatment of *Acanthamoeba* keratitis combined with fungal infection with polyhexamethylenebiguanide. *Kaohsiung. J. Med. Sci.* **15**, 665–673 (1999)
65. Torno M.S., Babapour R., Gurevitch A., Witt M.D.: Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. *J. Am. Acad. Dermatol.* **42**, 351–354 (2000)
66. Trabelsi H., Dendana F., Sellami A., Sellami H., Cheikhrouhou F., Neji S., Makni F., Ayadi A.: Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Path. Biol.* **60**, 399–405 (2012)
67. Tu E.Y., Joslin C.E., Nijm L.M., Feder R.S., Jain S., Shoff M.E.: Polymicrobial keratitis: *Acanthamoeba* and infectious crystalline keratopathy. *Am. J. Ophthalmol.* **148**, 13–19 (2009)
68. Vernhes M.C., Benichou A., Pernin P., Cabanes P.A., Teissié J.: Elimination of free-living amoebae in fresh water with pulsed electric fields. *Water. Res.* **36**, 3429–3438 (2002)
69. Villani E., Baudouin C., Efron N., Hamrah P., Kojima T., Patel S.V., Pflugfelder S.C., Zhivov A., Dogru M.: *In vivo* confocal microscopy of the ocular surface: from bench to bedside. *Curr. Eye. Res.* **39**, 213–231 (2014)
70. Van Klink F., Alizadeh H., He Y., Mellon J.A., Silvary R.E., McCulley J.P., Niederkorn J.Y.: The role of contact lenses, trauma, and Langerhans cells in a Chinese hamster model of *Acanthamoeba* keratitis. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* **34**, 1937–1944 (1993)
71. Visvesvara G.S.: Free-living amoebae as opportunistic agents of human disease. *J. Neuroparasitol.* **34**, 1001–1027 (2010)
72. Visvesvara G.S., Moura H., Schuster F.L.: Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **50**, 1–26 (2007)
73. Walochnik J., Scheikl U., Haller-Schober E.M.: Twenty years of *Acanthamoeba* diagnostics in Austria. *J. Eukaryot. Microbiol.* **62**, 3–11 (2015)