

Natalia Łanocha-Arendarczyk¹, Danuta Kosik-Bogacka^{1*}, Katarzyna Galant²,
Wojciech Zaorski¹, Karolina Kot¹, Aleksandra Łanocha³

¹Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Medycznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

²Zakład Mikrobiologii i Diagnostyki Immunologicznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

³Klinika Hematologii i Transplantologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Przysłano w sierpniu 2016 r.

Zaakceptowano we wrześniu 2016 r.

1. Wstęp. 2. Budowa morfologiczna i rozwój pasożytów. 3. Występowanie pełzaków wolno żyjących w środowisku. 4. Chorobotwórczość pełzaków z „grupy limax”. 4.1. Przewlekłe ziarniniakowe zapalenie mózgu (GAE). 4.2. Pełzakowe zapalenie rogówki oka (AK). 4.3. Pierwotne zapalenie mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych (PAM). 5. Podstawy diagnostyki zarażeń wywołanych przez pełzaki wolno żyjące. 5.1. Badania bezpośrednie. 5.2. Badanie płynu mózgowo-rdzeniowego. 5.3. Badania wymazu lub bioptatu pobranego ze zmian w narządach. 5.4. Metody hodowlane. 5.5. Diagnostyka molekularna. 6. Leczenie. 7. Pełzaki jako wektory chorobotwórczych drobnoustrojów. 8. Podsumowanie

Pathogenic free-living amoeba

Abstract: Invasions caused by free-living and parasitic limax amoeba can pose a major threat to human health and life. The amoeba from the genera *Acanthamoeba* and *Naegleria* as well as the following species: *Sappina diploidea*, *S. pedata*, *Balamuthia mandrillaris*, and probably *Hartmannella vermiformis*, are the major cause of primary amoebic meningoencephalitis (PAM), granulomatous amoebic encephalitis (GAE) and amoebic keratitis (AK). Furthermore, free-living amoeba can be vectors of bacteria, including *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* and *Mycobacterium tuberculosis*. There is a need for more research on free-living amoeba invasions in humans, particularly on the methods of diagnosis and appropriate forms of pharmacological therapy. Despite the undeniable role of free-living amoeba in the transmission of pathogenic bacteria, there is still insufficient amount of research and optimal diagnostic methods to identify the mechanisms of penetration, proliferation and exocytosis of many pathogenic microorganisms.

1. Introduction. 2. Morphology and growth of parasites. 3. Presence of free-living amoeba in the environment. 4. Pathogenicity of limax amoeba. 4.1. *Granulomatous amoebic encephalitis* (GAE). 4.2. *Acanthamoeba keratitis* (AK). 4.3. *Primary amoebic meningoencephalitis* (PAM). 5. Basic diagnosis of infections caused by free-living amoeba. 5.1. Direct testing. 5.2. Cerebral spinal fluid analysis. 5.3. Smear test or biopsy of abnormal tissue. 5.4. Proliferation methods. 5.5. Molecular diagnostics. 6. Treatment. 7. Amoeba as vectors of pathogenic microorganisms. 8. Summary

Słowa kluczowe: *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, wektory bakterii

Key words: *Acanthamoeba* sp., *Naegleria fowleri*, vectors of bacteria

1. Wstęp

Zagrożeniem dla zdrowia i życia różnych żywicieli są gatunki, które mogą prowadzić zarówno wolno żyjący jak i pasożytniczy tryb życia. Do takich ewolucyjnie młodych pasożytów należą pierwotniaki z gromady Rhizopoda, określane mianem pełzaków z „grupy limax” ze względu na ślimakopodobny charakter pseudopodiów [26]. Do tej grupy zaliczane są: ameby z rodzaju *Acanthamoeba* i *Naegleria* oraz gatunki: *Sappina diploidea*, *S. pedata* oraz *Balamuthia mandrillaris*. Prawdopodobnie także gatunek *Hartmannella vermiformis* oraz inne wolno żyjące ameby o właściwościach termofilnych stanowią zagrożenie dla zdrowia człowieka [23].

2. Budowa morfologiczna i rozwój pasożytów

Pełzaki z „grupy limax” występują powszechnie w środowisku naturalnym prowadząc wolno żyjący tryb życia (egzoicyczny), ale w sprzyjających warun-

kach mogą stać się organizmami endoicycznymi (fakultatywnymi patogenami) [23]. Dla tego rodzaju strategii życiowej, umiejętności przeżycia zarówno wewnątrz organizmu jak i poza żywicielem, Page w 1974 roku wprowadził termin: pełzaki amfizoiczne. Zastąpił on używane wcześniej, pojęcie pasożytów „fakultatywnie endoicycznych” [15].

Pełzaki wolno żyjące występują w dwóch formach: trofozoitu i cysty. Trofozoity pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* i gatunku *Balamuthia mandrillaris* występują w formie pełzakowej o średnicy od 13 do 40 μm [28, 41]. Natomiast u przedstawicieli pierwotniaków z rodzaju *Naegleria* obserwowane są dwie postaci trofozoitów, postać pełzakowa (o średnicy 7–20 μm) i wiciowa (10–16 μm). Postaci wiciowe powstają z trofozoitów pełzakowych w niesprzyjających warunkach środowiska, przyjmując kształt gruszkowaty lub owalny. Występowanie tej wegetatywnej formy trofozoitu jest jednym z kryteriów pozwalających na różnicowanie przedstawicieli rodzaju *Acanthamoeba* i *Naegleria* [18,

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Medycznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Al. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin; tel. 91 466 1672, fax: 91 466 1671; e-mail: kodan@pum.edu.pl

27]. Formy dwuwiciowe trofozoitów pełzaków z rodzaju *Naegleria* posiadają właściwości aktywnego ruchu przy użyciu wici, przy czym są to postaci nie odżywiające się i nie namnażające się. Formy te przyczyniają się do rozprzestrzeniania pełzaków w środowisku. Natomiast trofozoity pełzakowe pierwotniaków wolno żyjących poruszają się za pomocą cienkich pseudopodiów, akantopodiów lub lobopodiów. Wygląd nibynózek podczas poruszania się oraz obraz mitotyczny są kryteriami klasyfikacji trofozoitów pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* i *Naegleria*. Różnią się one stosunkiem długości do szerokości pseudopodiów oraz charakterem wypustek cytoplazmatycznych [36].

Cytoplazma trofozoitów pełzaków jest ziarnista, zawiera pojedyncze jądro z dużym, centralnie ułożonym kariosomem, utworzonym z gęstego RNA. W cytoplazmie występuje również pojedyncza wodniczka tętniąca i kilka wodniczek pokarmowych [18]. W ultrastrukturze trofozoitów widoczna jest również gładka i ziarnista siateczka śródplazmatyczna, a także typowy aparat Golgiego.

Zmiana warunków środowiskowych, w tym: zubożenie podłoża w substancje pokarmowe, obniżenie pH otoczenia, zwiększenie bądź obniżenie temperatury, zmiany wilgotności bezpośrednio po fazie wzrostu prowadzi do przekształcenia (encystacji) trofozoitów wolno żyjących w formy przetrwalnikowe (cysty). Encystację poprzedza fagocytoza substancji odżywczych, a także składników budulcowych ściany cysty. Są to formy odporne na działanie wielu czynników fizycznych i chemicznych, a ich średnica zwykle nie przekracza 25 µm. Formy te mogą przetrwać w niskiej temperaturze, są odporne na zmiany wilgotności, wysychanie, promieniowanie ultrafioletowe i zmienne ciśnienie osmotyczne dzięki celulozowej budowie ścian [15]. Jak wykazały badania Kasprzaka [14] cysty *Acanthamoeba* spp. mogą zachowywać żywotność w wodzie destylowanej w temperaturze 4°C przez 25 lat, a cysty *Naegleria* spp. mogą przeżywać w zbliżonych warunkach kilka miesięcy. Cysty pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* nie tracą zdolności inwazyjnych w temperaturze od -20°C do 56°C [17, 18, 41]. Są to formy jednojądrowe, otoczone podwójną otoczką: zewnętrzną silnie pofałdowaną (ektocystą) i gładką wewnętrzną (endocystą), wyraźnie odstającą w kilku miejscach od otoczki zewnętrznej, tworzą strukturę wielościanu lub gwiazdy [40]. Kształt oraz wielkość ektocysty i endocysty stały się podstawą różnicowania pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba*.

Formami inwazyjnymi dla człowieka mogą być zarówno cysty jak i trofozoity pełzaków. Do zarażenia dochodzi najczęściej poprzez inhalację powietrza lub aspirację wody zanieczyszczonych formami inwazyjnymi pierwotniaków [17, 36, 40]. Wrotami inwazji pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba*, oprócz jamy noso-

wej, może być także błona śluzowa jamy ustnej, uszkodzona skóra, rogówka oka oraz śluzówka jelita [14, 33, 36]. Pełzaki mogą migrować wraz z krwiobiegiem do różnych narządów z ognisk pierwotnych w skórze, tkance podskórnej lub płucach. Zarażenie pełzakiem *Naegleria fowleri* następuje zwykle poprzez jamę nosowo-gardłową, następnie trofozoity i cysty dostają się poprzez kość sitową wzdłuż nerwów wzrokowych do ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Do zarażenia tymi pierwotniakami dochodzi najczęściej podczas kąpieli w naturalnych i sztucznych zbiornikach wodnych [26, 28].

3. Występowanie pełzaków wolno żyjących w środowisku

Pełzaki z grupy „limax” należą do organizmów kosmopolitycznych, rozprzestrzenionych na całym świecie [41]. Występują one zarówno w sztucznych jak i naturalnych zbiornikach wodnych. Ponadto pełzaki wolno żyjące stwierdzono w wodzie butelkowanej i wodociągowej, płynie do płukania soczewek kontaktowych, wodach wykorzystywanych w przemyśle (m.in. do chłodzenia reaktorów), w urządzeniach klimatyzacyjnych, unitach stomatologicznych, basenach jacuzzi, w glebie, w pożywieniu, w kurzu i piasku pustyni [17, 26]. Pełzaki z grupy „limax” izolowano również z różnych materiałów biologicznych, w tym z hodowli bakterii, komórek ssaków, popłuczyn żołądka i jelit, wydzieliny ropnej z ucha oraz nosogardzieli zdrowych osób [4, 8, 21, 32, 42, 43]. Jednak najczęściej pełzaki amfizoiczne izolowano pośmiertnie z tkanki nerwowej. Pasożyty te były również wykrywane z nabłonka węchowego, płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR), płwociny, popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL), fragmentów tkanek zarażonych narządów, takich jak: wątroba, nerki, śledziona, płuca, zeszkrobiny z rogówki oka [8, 26].

W Polsce wirulentne szczepy pełzaków izolowano ze środowiska naturalnego w okolicach Poznania, Lublina, Gdańska i Szczecina [2, 9, 10, 15, 39]. W województwie wielkopolskim szczepy z rodzaju *Acanthamoeba*, wykazujące cechy patogenności dla myszy, wyizolowano z połowy przebadanych wód pobranych z wykorzystywanych rekreacyjnie naturalnych zbiorników wodnych [10]. Derda i Hadaś [9] stwierdzili wolno żyjące pełzaki w wodzie pochodzącej z poznańskich fontann, natomiast Górnik i Kuźna-Grygiel [10] wyizolowały potencjalnie wirulentne szczepy wolno żyjących pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* z naturalnych zbiorników rekreacyjnych Szczecina. Jak dotąd, *B. mandrillaris* i *S. pedata* nie zostały wyizolowane w Polsce, a na terenie Europy i na świecie są bardzo rzadko wykrywane w próbkach pochodzących od pacjentów i ze środowiska [24].

4. Chorobotwórczość pełzaków z „grupy limax”

Pierwsze przypadki inwazji pełzaków wolno żyjących u ludzi opisano w latach 70. ubiegłego wieku w wielu krajach, również europejskich [23]. Biotopem tych pierwotniaków jest najczęściej OUN, a także płuca, wątroba, nerki, skóra oraz rogówka gałki ocznej [18, 20, 23]. Pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba* mogą wywoływać ziarniniakowe zapalenie mózgu (*granulomatous amoebic encephalitis* – GAE), pełzakowe zapalenie rogówki oka (*Acanthamoeba keratitis* – AK) oraz zapalenie płuc (*Acanthamoeba pneumonia*). Natomiast inwazja *Naegleria fowleri* może u człowieka przebiegać w postaci pierwotnego zapalenia mózgu i opon mózgowych (*primary amoebic meningoencephalitis* – PAM) [7, 16, 37].

4.1. Przewlekłe ziarniniakowe zapalenie mózgu (GAE)

Pierwszy przypadek GAE opisano w 1972 roku, u osoby dorosłej pochodzącej z Zambii. Do tej pory na świecie odnotowano około 200 przypadków inwazji do OUN.

Okres inkubacji GAE wynosi zwykle około 14 dni, jednak czasami objawy inwazji pojawiają się już po 2 dniach od wniknięcia pasożytów do organizmu żywiciela. Przebieg inwazji jest przewlekły, objawy niespecyficzne, często mylone z zakażeniami bakteryjnymi i wirusowymi, a śmiertelność wynosi 97–98%. Choroba rozpoczyna się nagłym, silnym bólem głowy i szyi, sztywnością karku, dezorientacją, ospałością [40]. U chorych opisywano także halucynacje, drażliwość, trudność mowy, wymioty, gorączkę, zmiany behawioralne oraz śpiączkę. Przewlekłe ziarniniakowe zapalenie mózgu może współtowarzyszyć cukrzycy, chorobom wątroby, nerek i płuc. McKellar [29] opisał przypadek GAE u 51-letniego mężczyzny, który zmarł 3 tygodnie po przeszczepieniu nerki. Pacjent ten przyjmował lekki immunosupresyjny, a od 24 lat chorował na cukrzycę typu 1. W pośmiertnym badaniu histopatologicznym mózgu mężczyzny stwierdzono liczne cysty i trofozoity pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* [29].

Inwazjom pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* sprzyjają: anoreksja, alkoholizm, choroby nowotworowe, chemioterapia, radioterapia, przeszczep narządów, także leczenie steroidami i cytostatykami [34]. W 103 opisanych przypadkach GAE inwazja *Acanthamoeba* spp. rozwinęła się u osób z zaburzonym mechanizmem immunologicznym, przewlekłe chorych, u osób upośledzonych umysłowo i pacjentów przyjmujących leki immunosupresyjne. Wskaźnik śmiertelności u pacjentów zarażonych wirusem HIV wynosi 1,57 zgonów/10 000 [18]. Dlatego GAE zalicza się do inwazji oportunistycznych [18, 34, 42, 45].

4.2. Pełzakowe zapalenie rogówki oka (AK)

Pełzakowe zapalenie rogówki oka wywoływane przez pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba* jest przewlekłym schorzeniem gałki ocznej. Na świecie pierwszy przypadek AK został opisany w Teksasie w 1973 roku, natomiast na terenie Europy rok później [44]. Obecnie liczba zachorowań na świecie stale wzrasta, a większość opisywanych przypadków AK dotyczyła osób stosujących soczewki kontaktowe [25]. Stwierdzono, że w Stanach Zjednoczonych AK występuje z częstością 1–2 przypadki na milion użytkowników soczewek [23]. Pełzakowe zapalenie rogówki oka opisywano u pacjentów z mechanicznym uszkodzeniem rogówki [45], w tym u pacjenta po zabiegu refrakcyjnym.

Pełzakowe zapalenie rogówki oka nie jest inwazją oportunistyczną, jednak często stwierdzane jest u pacjentów zakażonych wirusem HIV. Okres inkubacji AK trwa kilka dni. Na początku inwazji u pacjentów opisywano: zaburzenia widzenia, fotofobię oraz silny ból oka nieproporcjonalny do uszkodzenia rogówki, a także obrzęk powiek i spojówki [23]. Charakterystycznym objawem jest pierścieniowaty naciek w centralnej części rogówki połączony z zanikiem keratynocytów [25, 35]. Zmiany te występują zwykle w obrębie jednego oka.

Szybka diagnostyka i podjęcie odpowiedniej, długotrwałej terapii pozwala w pełni przywrócić prawidłowe funkcjonowanie oka, jednak leczenie zaawansowanych zmian rogówki może nie przynieść oczekiwanego rezultatu, a także prowadzić do ślepoty [1].

4.3. Pierwotne zapalenie mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych (PAM)

Pierwsze przypadki PAM opisane zostały przez Fowler i Carter w 1965 roku [41]. Następnie 16 przypadków inwazji *N. fowleri* opisali Cerva i Novak [7] u młodych pływaków po kąpielach w basenie z ogrzewaną i chlorowaną wodą w Usti nad Łabą. Kolejnych 300 opisanych przypadków PAM dotyczyło osób mających kontakt z wodą z naturalnych ciepłych źródeł Australii, Nowej Zelandii, Afryki, Indii i południowych stanów USA [36, 42]. Najnowsze doniesienia dotyczące inwazji *N. fowleri* u ludzi pochodzą z Tajlandii, Japonii i Indii [11, 23, 30]. W Europie przypadki PAM opisano na terenie Belgii, Wielkiej Brytanii, Włoch, Niemiec oraz Węgier, a do zarażenia dochodziło poprzez kontakt z wodami zrzutowymi z dużych zakładów przemysłowych oraz naturalnych ciepłych źródeł [11].

Wrotami inwazji *N. fowleri* jest nabłonek wężowy. Do zarażenia dochodzi najczęściej podczas kąpieli w ciepłych zbiornikach wodnych. Stwierdzono, że większość osób zarażonych *N. fowleri* na kilka dni przed wystąpieniem pierwszych objawów PAM pływała w jeziorach lub basenach z ciepłą wodą [23, 26]. Pasożyty te rzadko

spotyka się w słonej wodzie, jednak Żbikowska i wsp. [46] wyizolowali *N. fowleri* z wody o zasoleniu 5% [46].

Pierwotne zapalenie mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych nie jest inwazją oportunistyczną, występuje także u potencjalnie zdrowych osób. Najczęściej PAM opisywano u dzieci i młodych mężczyzn do 20. roku życia. Okres inkubacji inwazji jest krótki, wynosi zwykle od 5 do 7 dni, po czym występują niecharakterystyczne objawy: bóle głowy, gorączka 39–40°C, senność, otępienie, dezorientacja, halucynacje, drgawki oraz śpiączka [28, 41]. Do zgonu dochodzi zazwyczaj w ciągu 1–2 tygodni od wystąpienia pierwszych objawów [35].

5. Podstawy diagnostyki zarażeń wywołanych przez pełzaki wolno żyjące

Gwałtowny przebieg inwazji, niespecyficzne objawy, zwłaszcza w przypadku PAM, utrudniają dobór odpowiednich badań diagnostycznych celem oceny źródła i etiologii zarażenia [35]. Do diagnostyki inwazji wywołanych przez pełzaki wolno żyjące najczęściej wykorzystuje się materiał biologiczny pochodzący od zarażonych pacjentów, w tym PMR, zeszkrobiny z rogówki oka, BAL oraz fragmenty tkanek i narządów pozyskanych pośmiertnie (Rys. 1) [25].

5.1. Badania bezpośrednie

Jedną z metod stosowanych w diagnostyce inwazji pełzaków z „grupy limax” jest badanie mikroskopowe, które umożliwia identyfikację pełzaków, szczególnie z rodzaju *Acanthamoeba*, na podstawie budowy i wielkości cyst. Kryteria morfologiczne cyst i trofozoitów pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* pozwoliły podzielić ameby na trzy grupy:

- 1) z dużymi trofozoitami oraz widoczną odrębnością endocysty od ektocysty, o wielkości cyst od 18 do

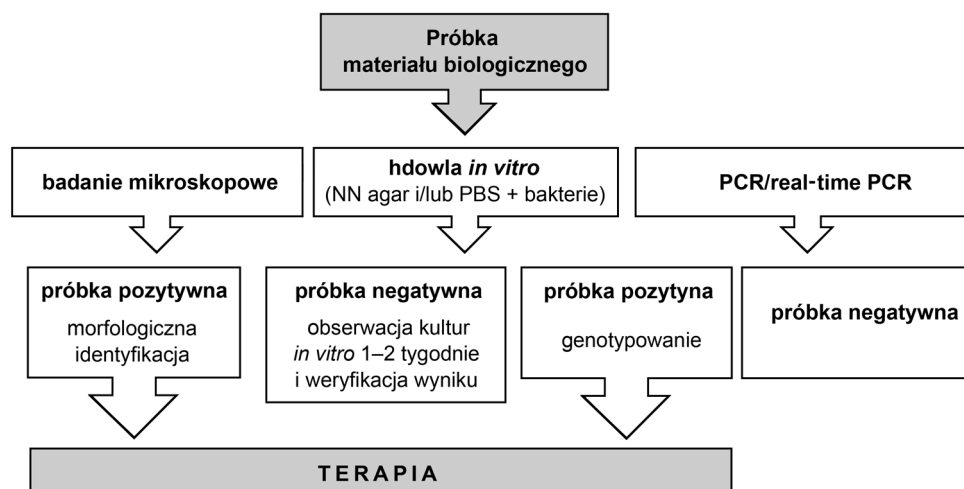
26 µm. Do tej grupy należą 4 gatunki pełzaków: *A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata* oraz *A. tubiashi*;

- 2) z ektocystami, zarówno grubymi jak i cienkimi, zwykle o kształcie endocyst wielobocznych, trójkątnych lub owalnych, wielkości nie przekraczającej 18 µm. Jest to najliczniejsza grupa, do której należy 11 gatunków: *A. mauritanensis*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. aquina*, *A. divionensis*, *A. triangulata*, *A. lugdunensis*, *A. griffini*, *A. rhysodes*, *A. paradivionensis* oraz *A. hatchetti*;

- 3) z cystami z okrągłą lub jajowatą endocystą oraz gładką lub chropowatą ektocystą o rozmiarach nie przekraczających 18 µm. Do grupy tej należą: *A. palestinensis*, *A. culbertsoni*, *A. royreba*, *A. lenticulata* oraz *A. pustulosa* [13, 18, 36].

5.2. Badanie płynu mózgowo-rdzeniowego

U osób zarażonych *N. fowleri* płyn mózgowo-rdzeniowy ma barwę szarą, przechodzącą w żółto-białą. Liczba erytrocytów początkowo jest nieznaczna, w miarę postępowania choroby wzrasta do 25000/mm³. Podobnie liczba leukocytów w początkowym okresie inwazji wynosi około 300/mm³, następnie wzrasta do 26000/mm³. W płynie mózgowo-rdzeniowym obserwowana jest pleocytoza, w przypadku PAM – leukocytów wielojądrzastych, natomiast GAE – limfocytów [11]. Poziom glukozy jest niski, podobnie jak w przypadku bakteryjnego zapalenia opon mózgowych, natomiast poziom białek jest podwyższony, zarówno w PAM jak i GAE; wynosi od 75 do 970 mg/100 mm³. U osób zarażonych pełzakami z rodzaju *Acanthamoeba* w płynie mózgowo-rdzeniowym stwierdza się podwyższony poziom gammaglobulin. Pełzaki z rodzaju *Naegleria* można stwierdzić w odwirowanym płynie mózgowo-rdzeniowym w badaniu bezpośrednim. Odwirowany płyn mózgowo-rdzeniowy ocenia się przy pomocy



Rys. 1. Algorytm postępowania diagnostycznego w inwazjach wywołanych przez pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba* [24]

Tabela I
Porównanie technik analizy DNA używanych w diagnostyce pełzaków z grupy „limax” [23]

Metoda	Znaczenie	Wady metody
PCR-RFLP	Wykrywanie polimorfizmu genetycznego, którego przyczyną jest zmienność mutacyjna miejsc restrykcyjnych, rozpoznawanych przez nukleazę restrykcyjną w obrębie amplifikowanej sekwencji	Ze względu na dużą liczbę genotypów analiza wymaga zastosowania wielu enzymów restrykcyjnych, co powoduje następną zwiększenie kosztów i wydłużenie czasu badania; nie zawsze pozwala odróżnić niektóre szczepy
PCR-RAPD	Losowa amplifikacja fragmentów DNA o zróżnicowanych masach molekularnych	Wymaga jednego startera o krótkiej sekwencji, niskiej temperatury przyłączenia startera; mała powtarzalność metody; na wynik mogą wpływać czynniki środowiska, w tym temperatura otoczenia
PCR – Real Time	Wykorzystuje techniki fluorescencyjne, umożliwia monitorowanie reakcji w każdym cyklu w czasie rzeczywistym, jest metodą szybką i czułą	Mała liczba protokołów, które pozwalają na wykrycie nielicznych genotypów pełzaków z rodzaju <i>Acanthamoeba</i>

mikroskopu świetlnego z wykorzystaniem barwienia hematoksyliną żelazistą, Giemsa lub Wrighta [40]. Ilość pełzaków w płynie mózgowo-rdzeniowym waha się w granicach 10–100/mm³ [11, 18, 36].

5.3. Badania wymazu lub bioptatu pobranego ze zmian w narządach

Badanie wymazu oraz zeskrubin pobranych z rogówki oka jest jedną z metod stosowanych w diagnozowaniu AK. Wykorzystywane są również metody wizualizacji pełzaków w rogowce oka przy zastosowaniu mikroskopu konfokalnego oraz metody immunofluorescencyjne [9, 44].

Podobnie jak w przypadku badania płynu mózgowo-rdzeniowego, stosuje się metody bezpośrednio z wykorzystaniem barwienia hematoksyliną i eozyną [11, 41, 42]. Ocenia się cechy morfologiczne widocznych trofozoitów, w tym: kształt, charakter nibynózek, obecność lub brak wodniczek tętniących oraz charakterystykę morfologiczną cyst: kształt ekto- i endocysty, pofałdowanie ściany.

5.4. Metody hodowlane

Podstawowym podłożem stosowanym do izolacji i hodowli pełzaków wolno żyjących jest 2% NN Agar (non-nutrient agar) pokryty zawiesiną bakterii, np. *Escherichia coli* lub *Enterobacter aerogenes*. Po nanieśnięciu badanego materiału, płytki inkubuje się w temperaturze 37°C i 45°C. Zalecane jest także wirowanie materiału przed wykonaniem posiewu [9, 18, 26, 36]. Oprócz podłoża NN Agar stosuje się również podłoże z bulionem mięsny (zawiera 0,5–2% peptonu) pokryte także bakteriami *E. coli* lub *E. aerogenes*. Do hodowli *in vitro* wykorzystywane są również podłoża agarowe lub płynne cechujące się wybiórczością dla pełzaków z grupy „limax” np. podłoże Singha, Neffa, Culbertsona, Schustera, Nelsona i Červy [9]. Do izolacji gatunku *Balamuthia mandrillaris*, który nie wzrasta na podłożach agarowych, stosuje się hodowle komórkowe [35].

5.5. Diagnostyka molekularna

Analiza molekularna umożliwia szybkie i dokładne oznaczenie gatunku oraz genotypu szczepu pełzaków wolno żyjących oraz określenie lekooporności pasożyta. W diagnostyce wykorzystuje się wiele metod, m.in. łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) i jej modyfikacje: losową amplifikację polimorficznych fragmentów DNA (PCR-RAPD), analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA (PCR-RFLP) jądrowego, mitochondrialnego oraz PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) [1, 17, 19, 31, 40]. Charakterystykę metod molekularnych stosowanych w diagnostyce zarażeń pełzakami wolno żyjącymi przedstawiono w Tabeli I.

Początkowy podział pełzaków z grupy „limax” opierał się tylko na sekwencjonowaniu całego genu. Do tej pory opisano 20 genotypów pełzaków, którym nadano nazwy od T1 do T20 [35]. Stwierdzono, że ponad 95% pełzaków wywołujących AK, klasyfikowane jest jako genotyp T4 [18, 23]. Genotyp ten stwierdzany był w materiale pobranym od 80% pacjentów z inwazjami mózgowymi, płucnymi i skórными [35]. W 2009 roku na terenie Pomorza Zachodniego Łanocha i wsp. opisali genotyp T16, o nieokreślonych jak dotąd właściwościach chorobotwórczych, przy czym niewykluczone, że mógł on być związany z atypowym zapaleniem płuc u pacjentów z obniżoną odpornością [20].

6. Leczenie

Leczenie inwazji wywołanych przez pełzaki wolno żyjące stanowi jeden z kluczowych problemów parazytologii lekarskiej. Gwałtowność przebiegu tych inwazji oraz niedoskonałość metod diagnostycznych utrudniają dobranie odpowiednich form terapii farmakologicznej [11, 18, 40]. Stosowanie antybiotyków, w tym penicyliny, chloromycetyny, tetracyklin oraz streptomycyny w leczeniu inwazji wywołanych przez pełzaki z „grupy limax” okazało się nieskuteczne, podobnie jak chlorochiny, metronidazolu i chloroheksydyny,

stosowanych w leczeniu inwazji wywołanych przez inne pełzaki (np. pełzaka czerwonej *Entamoeba histolytica*) [18]. W oparciu o badania eksperymentalne stwierdzono, że szczepy *Naegleria* są wrażliwe na amfoterycynę B oraz chlorochinę. Ponadto stwierdzono wrażliwość niektórych izolatów *Acanthamoeba* na chlorheksydynę [6]. Nadal jednak, lekiem z wyboru pozostaje amfoterycyna B, w leczeniu GAE stosowane są pochodne azolowe (itakonazol, ketokonazol, flukonazol) z flucytozyną [12].

7. Pełzaki jako wektory chorobotwórczych drobnoustrojów

Wolno żyjące pełzaki posiadają zdolność transmisji drobnoustrojów powodujących zakażenia zarówno u pacjentów ambulatoryjnych jak i hospitalizowanych. Pierwotniaki te, podobnie jak „konie trojańskie”, stanowią rezerwuuar patogenów, szczególnie tych związanych ze środowiskiem wodnym. Pełzaki są wektorem bakterii dodatkowo chroniąc drobnoustroje przed niesprzyjającymi warunkami środowiskowymi i czynnikami chemicznymi, takimi jak np. biocydy [22]. Dotychczas stwierdzono, że w populacjach pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* izolowanych ze środowiska, około 25% jest wektorami bakterii.

Do gatunków uznanych za bakterie endosymbiotyczne, których gospodarzem są wolno żyjące ameby zalicza się m.in. najczęstsze czynniki etiologiczne zakażeń dróg oddechowych, zwłaszcza wśród pacjentów z obniżoną odpornością: *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Mycobacterium tuberculosis*. Innymi gatunkami o dużym potencjale chorobotwórczym są: *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, a także wirusy: Coxsackie, Adenowirusy, Echowirusy i grzyby: *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatidis*, *Sporothrix schenckii*, *Histoplasma capsulatum* [35, 38].

Przykład symbiozy występującej pomiędzy wolno żyjącymi pełzakami a bakteriami najlepiej został opisany dla gatunku *L. pneumophila*. Po wnikięciu do wnętrza komórki pierwotniaka bakterie wydzielają białka oddziałujące na struktury komórkowe pełzaka, np. retikulum endoplazmatyczne. W efekcie tworzą się wakuole (LCV – Legionella-containing vacuoles), będące miejscem namnażania się drobnoustrojów. *L. pneumophila* może wykorzystywać substancje odżywcze ameby i ulegać urzęsieniu, co zwiększa potencjał chorobotwórczy bakterii. Mechanizm uwalniania się drobnoustrojów z pełzaków nie został dokładnie poznany. Uważa się, że

zdolność do egzocytozy uwarunkowana jest obecnością dwóch białek bakteryjnych – LepA i LepB [5].

Inaczej droga wnikania patogenu wygląda w przypadku prątków, takich jak: *M. tuberculosis* i *Mycobacterium marinum*. Endocytozę umożliwia system sekrecyjny typu VII-ESX-1, występujący u wszystkich prątków. Endosymbiotyczne szczepy *M. marinum* mogą tworzyć dodatkowo ogony aktywne umożliwiające ucieczkę z fagosomu [5].

Bakterie jako endosymbionty wolno żyjących pełzaków nie są wykrywane w rutynowej diagnostyce. Metody ich detekcji pozostają słabo poznane i ograniczone. Stosuje się barwienie metodą Giemsy bądź metodę Ziehl-Neelsena w przypadku bakterii kwasoopornych. Bardzo dobre narzędzie stanowią obecnie metody molekularne, umożliwiające wykrycie zarówno DNA bakteryjnego jak i pełzaka. Zastosowanie specyficznych starterów pozwala na identyfikację gatunkową wyizolowanych patogenów [22].

8. Podsumowanie

Pełzaki, występujące powszechnie w różnych środowiskach mogą prowadzić zarówno wolno żyjący jak i pasożytniczy tryb życia. Na zarażenie narażone są szczególnie osoby z obniżoną odpornością, których sukcesywnie przybywa.

Dalsze badania dotyczące inwazji pełzaków wolno żyjących u ludzi wymagają opracowania/rozwinienia metod diagnostycznych oraz form terapii farmakologicznej, a także dokładniejszego określenia mechanizmów wnikania, namnażania i egzocytozy wielu gatunków chorobotwórczych drobnoustrojów, transmitowanych przez ameby.

Piśmiennictwo

- Alves J.M., Gusmão C.X., Teixeira M.M., Freitas D., Foronda A.S., Affonso H.T.: Random amplified polymorphic DNA profiles as a tool for the characterization of Brazilian keratitis isolates of the genus *Acanthamoeba*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **33**, 19–26 (2000)
- Befinger M., Myjak P., Pietkiewicz H.: Occurrence of amphizoic amoebae in lake Żarnowieckie. *Bull. Inst. Mar. Trop. Med.* **37**, 3–4 (1986)
- Behera H.S., Satpathy G., Tripathi M.: Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* spp. from *Acanthamoeba* meningitis/meningoencephalitis (AME) patients in India. *Parasit. Vectors*, **9**, 442 (2016)
- Berger P., Papazian L., Drancourt M., La Scola B., Auffray J.-P., Raoult D.: Ameba-associated microorganism and diagnosis of nosocomial pneumonia. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 248–255 (2006)
- Cateau E., Delafont V., Hechard Y., Rodier M.H.: Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections? *J. Hosp. Infect.* **87**, 131–140 (2014)
- 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.* **35**, 34–39 (2003)
7. Červa L.: Laboratory diagnosis of primary amoebic meningo-encephalitis and methods for the detection of „limax” amoebae in the environment. *Folia Parasitol.* **27**, 1–9 (1980)
 8. De Jonckheere J. F., Michel R.: Species identification and virulence of *Acanthamoeba* strains from human nasal mucosa. *Parasitol. Res.* **74**, 314–316 (1988)
 9. Derda M., Hadaś E., Wojtkowiak-Giera A., Wojt W.J., Cholewiński M., Skrzypczak Ł.: Występowanie pełzaków pierwotnie wolnożyjących w fontannach. *Probl. Hig. Epidemiol.* **94**, 147–150 (2013)
 10. Górnik K., Kuźna-Grygiel W.: Presence of virulent strains of amphizoic amoebae in swimming pools of the city of Szczecin. *Ann. Agric. Environ. Med.* **11**, 233–236 (2004)
 11. Grace E., Asbill S., Virga K.: *Naegleria fowleri*: pathogenesis, diagnosis, and treatment options. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 6677–6681 (2015)
 12. Gupta R., Parashar M.K., Kale A.: Primary Amoebic Meningo-encephalitis. *J. Assoc. Physicians India.* **63**, 69–71 (2015)
 13. Ithoi I., Ahmad A.-F., Mak J.W., Nissapatorn V., Lau Y.-L., Mahmud R.: Morphological characteristics of developmental stages of *Acanthamoeba* and *Naegleria* species before and after staining by various techniques. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* **6**, 1327–1338 (2011)
 14. 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 Parasit.* **123**, 391–398 (1972)
 15. Kasprzak W., Mazur T., Rucka A.: Studies on some pathogenic strains of free-living amoebae isolated from lakes in Poland. *Ann. Soc. Belge. Méd. Trop.* **54**, 351–357 (1974)
 16. Kaushal V., Chhina D.K., Kumar R., Pannu H.S., Dhooira H.P.S., Chhina R.S.: *Acanthamoeba* Encephalitis. *Indian J. of Medical Microbiol.* **26**, 182–184 (2008)
 17. Khan N.A., Paget T.A.: Molecular tools for speciation and epidemiological studies of *Acanthamoeba*. *Curr. Microbiol.* **44**, 444–449 (2002)
 18. Khan N.A.: *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 564–595 (2006)
 19. Kong H.H.: Molecular phylogeny of *Acanthamoeba*. *Korean J. Parasitol.* **47**, Suppl: S21–S28 (2009)
 20. Lanocha N., Kosik-Bogacka D., Maciejewska A., Sawczuk M., Wilk A., Kuźna-Grygiel W.: The occurrence *Acanthamoeba* (free living amoeba) in environmental and respiratory samples in Poland. *Acta Protozool.* **48**, 271–279 (2009)
 21. Lengy J., Jakovljević R., Talis B.: Recovery of a Hartmannelloid amoeba from a purulent ear discharge. *Harefuah*, **80**, 23–24 (1971)
 22. Leońska-Duniec A.: Free-living amoebae as vectors of pathogenic microorganisms. *Probl. Hig. Epidemiol.* **92**, 173–180 (2011)
 23. Leońska-Duniec A.: Problemy w określeniu chorobotwórczości pełzaków wolno żyjących z rodzaju *Acanthamoeba*. *Probl. Hig. Epidemiol.* **94**, 24–30 (2013)
 24. Leonska-Duniec A.: Occurrence of potentially pathogenic free-living amoebae in Poland. *Probl. Hig. Epidemiol.* **96**, 335–339 (2015)
 25. Lorenzo-Morales J., Khan N.A., Walochnik J.: An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*, **22**, 10 (2015)
 26. 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)
 27. Martinez A.J., Kasprzak W.: Patogenne pełzaki wolnożyjące – przegląd. *Wiad. Parazytol.* **26**, 495–521 (1980)
 28. Martinez A.J., Visvesvara G.S.: Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol.* **7**, 583–598 (1997)
 29. McKellar M.S., Mehta L.R., Greenlee J.E., Hale D.C., Booton G.C., Kelly D.J., Fuerst P.A., Sriram R., Visvesvara G.S.: Fatal granulomatous *Acanthamoeba* encephalitis mimicking a stroke, diagnosed by correlation of results of sequential magnetic resonance imaging, biopsy, in vitro culture, immunofluorescence analysis, and molecular analysis. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 4265–4269 (2006)
 30. Morgan M.J., Halstrom S., Wylie J.T., Walsh T., Kaksonen A.H., Sutton D., Braun K., Puzon G.J.: Characterization of a Drinking Water Distribution Pipeline Terminally Colonized by *Naegleria fowleri*. *Environ. Sci. Technol.* **50**, 2890–2898 (2016)
 31. Qvarnstrom Y., Visvesvara G.S., Sriram R., da Silva A.J.: Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 3589–3595 (2006)
 32. Rivera M.A., Padhya T.A.: *Acanthamoeba*: a rare primary cause of rhinosinusitis. *Laryngoscope*, **112**, 1201–1203 (2002)
 33. Riviera F., Rosas I., Castillo M., Cházec M., Gómez R., Chío R.E., Islas J.: Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients: II. *Environ. Res.* **39**, 364–371 (1986)
 34. Salameh A., Bello N., Becker J., Zangeneh T.: Fatal Granulomatous Amoebic Encephalitis Caused by *Acanthamoeba* in a Patient With Kidney Transplant: A Case Report. *Open Forum Infect. Dis.* **2**, ofv104 (2015)
 35. Siddiqui R., Khan N.A.: Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*: an old enemy presenting new challenges. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e3017 (2014)
 36. Schuster F.L., Visvesvara G.S.: Free-Living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Intern. J. Parasitol.* **34**, 1001–1027 (2004)
 37. Thamtam V.K., Uppin M.S., Pyl A., Kaul S., Rani J.Y., Sundaram C.: Fatal granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* in a newly diagnosed patient with systemic lupus erythematosus. *Neurol. India.* **64**, 101–104 (2016)
 38. Thomas V., McDonell G., Denyer S.P., Maillard J.Y.: Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 231–259 (2010)
 39. Toczolowski J., Gieryng H., Gieryng R., Wróblewska E.: Zakażenie pełzakami z rodzaju *Acanthamoeba* w pływalniach i jeziorach Lubelszczyzny u osób stosujących soczewki kontaktowe. *Klin. Ocz.* **102**, 207–208 (2000)
 40. Trabelsi H., Dendana F., Sellami A., Cheikhrouhou F., Neji S., Makni F., Ayadi A.: Pathogenic free-living amoeba: Epidemiology and clinical review. *Pathol. Biol.* **60**, 399–405 (2012)
 41. Visvesvara G.S.: Infections with free-living amoebae. *Handb. Clin. Neurol.* **114**, 153–168 (2013)
 42. 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.* **56**, 1–26 (2007)
 43. Walochnik J., Obwaller A., Haller-Schober E.-M., Aspöck H.: Anti-*Acanthamoeba* IgG, IgM, and IgA immunoreactivities in correlation to strain pathogenicity. *Parasitol. Res.* **87**, 651–656 (2001)
 44. Walochnik J., Scheikl U., Haller-Schober E.M.: Twenty years of *Acanthamoeba* diagnostics in Austria. *J. Eukaryot. Microbiol.* **62**, 3–11 (2015)
 45. 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.* **15**, 553–555 (2006)
 46. Żbikowska E., Walczak M., Krawiec A.: Distribution of *Legionella pneumophila* bacteria and *Naegleria* and *Hartmannella* amoebae in thermal saline baths used in balneotherapy. *Parasitol. Res.* **112**, 77–83 (2013)