

## Diagnostyka laboratoryjna zarażeń *Acanthamoeba* spp.

### Laboratory diagnostics of *Acanthamoeba* spp. infections

Aleksandra Bojanowska<sup>1</sup>, Anna Bożym<sup>1</sup>, Olga M. Koper-Lenkiewicz<sup>2</sup>, Joanna Kamińska<sup>2</sup>,  
Halina Kemonia<sup>2</sup>, Joanna Matowicka-Karna<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Koło Naukowe przy Zakładzie Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

<sup>2</sup>Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

#### Streszczenie

Pierwotniaki *Acanthamoeba castellanii* to jednokomórkowe, wolno żyjące, kosmopolityczne pełzaki, które do organizmu dostają się głównie poprzez błonę śluzową jamy ustnej, nosowej, rogówkę, układ oddechowy, uszkodzoną skórę oraz śluzówkę jelita. Ponadto mogą być wektorami dla mikroorganizmów, takich jak bakterie, wirusy, grzyby i pierwotniaki. *A. castellanii* może przyjmować postać trofozoitów oraz cyst odpornych na warunki środowiskowe. Pełzak ten jest czynnikiem etiologicznym chorób człowieka: pełzakowego zapalenia rogówki (AK; *Acanthamoeba keratitis*), ziarniniakowego zapalenia mózgu (GAE; *granulomatous amoebic encephalitis*), zapalenia płuc lub może wywołać zmiany w innych narządach, takich jak wątroba, nerki czy skóra. Celem pracy jest przedstawienie aktualnej wiedzy na temat laboratoryjnej diagnostyki zarażenia *Acanthamoeba* spp., która opiera się na poszukiwaniu trofozoitów oraz cyst w materiale pobranym od chorego. W przypadku podejrzenia GAE wskazane jest również badanie osadu płynu mózgowo-rdzeniowego oraz wykonanie badań obrazowych takich jak tomografia komputerowa oraz rezonans magnetyczny. W przypadku pełzakowego zapalenia rogówki pobrany od pacjenta materiał (bioptat lub zeszkrobiny rogówki) posiewa się na podłożach, a następnie dokonuje się identyfikacji w mikroskopie świetlnym. Przydatne w wykrywaniu, identyfikacji oraz określaniu potencjalnej chorobotwórczości pełzaków okazują się również metody biologii molekularnej. Po wykryciu *Acanthamoeba* spp. istotną rolę odgrywa zróżnicowanie patogennych izolatów od niepatogennych. Z klinicznego punktu widzenia do postawienia diagnozy zarażenia *Acanthamoeba* spp. niezbędna jest jedynie identyfikacja rodzaju organizmu oraz określenie patogenności izolatu.

#### Abstract

Protozoa *Acanthamoeba castellanii* are single-celled, free-living, cosmopolitan amoebae that enter the body mainly through the mucous membrane of the mouth, nasal cavity, cornea, respiratory system, damaged skin and intestinal mucosa. In addition, they can be vectors for microorganisms such as bacteria, viruses, fungi and protozoa. In the life cycle *A. castellanii* may take the form of trophozoites and cyst tenacity to environmental conditions. This amoeba is an etiologic agent of dangerous human diseases: *Acanthamoeba keratitis* (AK), *granulomatous amoebic encephalitis* (GAE), pneumonia or changes in other organs, such as the liver, kidneys and skin. The aim of the article is to present current knowledge about laboratory diagnosis of *Acanthamoeba* spp. infection, which is based on the search for trophozoites and cysts in the material collected from the patient. In the case of suspected GAE, it is also advisable to study cerebrospinal fluid sediment and perform imaging tests such as computed tomography or magnetic resonance imaging. In the case of *Acanthamoeba keratitis*, an amoeba culture (obtained from a biopsy or corneal scrapings) is established *in vitro*, and then identified by light microscopy. The methods of molecular biology are also useful in detecting, identifying, and determining the potential pathogenic abilities of the amoebas. After the detection of *Acanthamoeba* spp., it is important to differentiate pathogenic isolates from non-pathogenic ones. From a clinical point of view, to diagnose *Acanthamoeba* spp. infection it is necessary only to identify the type of organism and to determine the pathogenicity of the isolate.

**Słowa kluczowe:** *Acanthamoeba* spp., płyn mózgowo-rdzeniowy, zapalenie rogówki

**Key words:** *Acanthamoeba* spp., cerebrospinal fluid, keratitis

#### Wstęp

Pierwotniaki *Acanthamoeba castellanii* to jednokomórkowe, wolno żyjące, kosmopolityczne pełzaki, które występują w glebie, powie-

trzu, zbiornikach słodko- oraz słonowodnych, wodzie wodociągowej, mineralnej, żywności, kurzu oraz na różnych urządzeniach, z którymi styka się człowiek (klimatyzacja, zestawy stomatolo-

giczne czy aparaty do dializy). Do organizmu dostają się głównie poprzez błonę śluzową jamy ustnej, nosowej, rogówkę (najwięcej przypadków obserwuje się u pacjentów noszących soczewki kontaktowe), układ oddechowy, uszkodzoną skórę czy śluzówkę jelita. Ponadto mogą być wektorami dla mikroorganizmów takich jak bakterie, wirusy i grzyby [1, 2, 3, 4].

*Acanthamoeba castellanii* może przyjmować postać trofozoitów oraz cyst odpornych na warunki środowiskowe. Zараżenie człowieka odbywa się najczęściej poprzez kontakt z wodą, glebą lub powietrzem zawierającym formy inwazyjne ameb [3]. *Acanthamoeba castellanii* jest organizmem amfizoicznym, ponieważ może być pasożytem fakultatywnym (endozoicznym), jak i organizmem wolnożyjącym (egzozoicznym) [5].

Pełzak ten jest czynnikiem etiologicznym wielu chorób występujących u człowieka:

- pełzakowego zapalenia rogówki (AK; *Acanthamoeba keratitis*) – narażone są szczególnie osoby noszące soczewki kontaktowe (85-88% osób ulega zarażeniu);
- ziarniniakowego zapalenia mózgu (GAE; *granulomatous amoebic encephalitis*) – inwazji oportunistycznej, wykrywanej u osób z zaburzeniami odporności;
- pełzakowego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych (AME; *Acanthamoeba meningitidis/ meningoencephalitis*);
- zapalenia płuc

lub pełzaki mogą wywoływać zmiany w innych narządach, takich jak wątroba, nerki czy skóra [3, 4, 5, 6, 7].

Obecnie wzrost częstości infekcji oportunistycznych, wywołanych zarażeniem *Acanthamoeba* spp., związany jest z leczeniem chemioterapeutycznym i steroidowym, transplantacją narządów oraz spadkiem odporności u osób zakażonych HIV (ang. *human immunodeficiency virus*), a ich przebieg zależy od wielkości inokulum i wirulencji danego szczepu ameby [7].

Celem pracy jest przedstawienie aktualnej wiedzy na temat laboratoryjnej diagnostyki zarażeń *Acanthamoeba* spp., których wczesne wykrycie zwiększa prawdopodobieństwo skuteczności leczenia [8]. Przyniesione opisy przypadków medycznych ukazują wady i zalety metod diagnostycznych stosowanych w podejrzeniu GAE i AK.

### **Laboratoryjna diagnostyka pełzakowego zapalenia rogówki (AK)**

Brak standaryzacji postępowania diagnostycznego oraz podobieństwo do infekcji wirusowych (zwłaszcza *Herpes simplex*), bakteryjnych (*Pseudomonas aeruginosa*) i grzybiczych stanowi trudność w rozpoznaniu *Acanthamoeba keratitis*. Również ograniczona ilość dostępnych technik analitycznych może prowadzić do wystawienia opóźnionej lub błędnej diagnozy.

Najczęściej wykonywany jest posiew wymazu oka lub zeszkrobiny rogówki na podłożu NN (*non nutrient agar*) pokryte m.in. *Escherichia coli* lub *Enterobacter aerogenes*, co może potrwać do dwóch tygodni i jest stosunkowo inwazyjnym badaniem utrudniającym późniejszy proces gojenia się rogówki. Analiza jądrowego i mitochondrialnego DNA (ang. *deoxyribonucleic acid*), badania polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych oraz metody immunofluorescencyjne są rzadziej stosowane do wykrywania

*Acanthamoeba keratitis*. Nieinwazyjną techniką mogącą pomóc w diagnozie AK oraz w monitorowaniu leczenia jest badanie z użyciem mikroskopu konfokalnego, który umożliwia w warunkach *in vivo* zeskanowanie powierzchni rogówki, przeniesienie wysokiej rozdzielczości obrazu na ekran komputera, i ocenę bytujących tam cyst lub trofozoitów. Możliwość wielokrotnego przeprowadzenia badania, jego względnie szybki czas trwania, a także wysoka czułość i swoistość przekraczające 90%, stanowią niewątpliwe zalety tej metody [3, 10, 14, 15, 16, 17]. Na podstawie 10-letnich badań przeprowadzonych przez Parmar i wsp. u 54 na 63 pacjentów zdiagnozowano AK metodą mikroskopii konfokalnej, pomimo że tylko u 11 z nich podejrzewano zarażenie. Okazało się, że tylko jeden wynik był fałszywie dodatni i jeden fałszywie ujemny [18]. Stosowanie techniki łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR; *polymerase chain reaction*) w rutynowej diagnostyce AK jest mało wiarygodne, ze względu na brak specyficznych, wielogatunkowych epitopów diagnostycznych, co obliuguje do korzystania z pojedynczych sond o niskiej wydajności, generując tym samym wyższe koszty badania [18].

Rola przeciwciał przeciwko *Acanthamoeba* spp. w przebiegu AK w surowicy osób zarażonych nie jest do końca poznana. Badania przeprowadzone na 20 osobach, w tym dwóch pacjentach z AK przez Walochnik i wsp. [19] dowiodły, że wrodzona, jak również nabyta odpowiedź immunologiczna pełni istotną funkcję w przebiegu AK. Immunoglobulina typu A (IgA) może zapobiegać przyłączaniu ameb do powierzchni rogówki. Za pomocą techniki Western blot oceniano różnice w odpowiedzi immunologicznej patogennych izolatów AK w stosunku do niepatogennych. We wszystkich badanych surowicach wykazano obecność przeciwciał przeciwko *Acanthamoeba* spp. i zaobserwowano znaczące różnice w reaktywności IgA, pomiędzy pacjentami zarażonymi i niezarażonymi. Immunoreaktywność IgA w stosunku do niepatogennego szczepu *Acanthamoeba* spp. była znacznie wyższa, niż odpowiedź w stosunku do patogennych izolatów, co dowodzi istnienia odmiennych profili przeciwciał IgA w przebiegu AK. Alizadeh i wsp. [20] za pomocą immunoabsorpcji enzymatycznej nie wykazali istotnych różnic w poziomach wszystkich immunoglobulin obecnych w surowicy pomiędzy pacjentami zdrowymi a pacjentami z *Acanthamoeba keratitis*. Natomiast miano przeciwciał IgA swoistych dla *Acanthamoeba* spp. występujących we łzach było znacząco niższe u osób zarażonych [14, 19, 20].

### **Laboratoryjna diagnostyka ziarniniakowego zapalenia mózgu (GAE)**

Przypuszcza się, że ze względu na niespecyficzne objawy i trudności w diagnostyce wiele przypadków zarażenia ośrodkowego układu nerwowego (OUN) pełzakami z rodzaju *Acanthamoeba* zostało nierozpoznanych lub były mylone z innymi zakażeniami bakteryjnymi czy wirusowymi [2]. W związku z powyższym nie można określić realnej częstości inwazji a liczba opisanych dotąd przypadków jest niewielka [8]. Jak podaje Leońska-Duniec [2] do 2013 r. w Polsce nie zdiagnozowano pełzakowego zarażenia OUN. W przypadku podejrzenia GAE wskazane jest badanie osadu płynu mózgowo-rdzeniowego i popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL; *bronchoalveolar lavage*) metodą mikroskopową, oraz

założenie hodowli na podłożu agarowym NN. Wykonuje się również badania obrazowe takie jak tomografia komputerowa oraz rezonans magnetyczny [6, 8]. U pacjentów z GAE obserwuje się w płynie mózgowo-rdzeniowym podwyższoną liczbę komórek w  $\mu\text{l}$  (cytoza u dorosłego: 0-5 komórek/ $\mu\text{l}$ ), wynikającą ze zwiększenia odsetka limfocytów, nieznaczny wzrost stężenia białka (norma: 15-45 mg/dl) oraz nieznaczny spadek stężenia glukozy (norma: 50-80 mg/dl) [9].

Dokładniejsze odchylenia w badaniu PMR obrazuje opis przypadku 63-letniego farmera pochodzącego z Tajwanu. Badanie PMR wykazało następujące odchylenia od normy: cytoza 438 komórek/ $\mu\text{l}$ , w której dominowały eozynofile (66%), stężenie białka 91 mg/dl oraz stężenie glukozy 32 mg/dl. Pobrany w 17 dniu hospitalizacji PMR był mętny i lepki; zawierał 87 komórek/ $\mu\text{l}$  (w tym 32 eozynofile/ $\mu\text{l}$ ), stężenie białka wyniosło 171 mg/dl, glukozy 28 mg/dl. Barwienie PMR metodą Grama oraz tuszem indyjskim okazało się nieprzydatne diagnostycznie. Podczas całego okresu hospitalizacji łącznie od pacjenta pobrano 5 próbek PMR, w których za pomocą metody PCR potwierdzono zarażenie *Acanthamoeba* spp. Jednakże amplikon *Acanthamoeba* spp. o wielkości 180 pz. wykryto tylko w pierwszej próbce PMR. Przypuszcza się, że może to wynikać ze zmniejszonej czułości metody PCR spowodowanej leczeniem lub występowaniem trofozoitów tylko w ostrej fazie choroby. Amplikony DNA z PMR oraz błotnistej wody, którą zachłusnął się farmer, były identyczne i wykazywały wysoką homologię z *A. castellanii* [21]. Przydatność metod mikroskopowych i hodowli mikrobiologicznych ukazuje przypadek 2-letniego chłopca, u którego zastosowano różne techniki barwienia płynu mózgowo-rdzeniowego. Wykonano preparat bezpośredni PMR, w którym zidentyfikowano trofozoity podobne do *Acanthamoeba* spp. Na podstawie barwienia metodą Grama sklasyfikowano strukturę jako Gram-ujemną, a metoda LPCB (ang. *Lacto Phenol Cotton Blue*) pozwoliła uwidocznić jądra i jąderka. Wykonano również barwienie PMR metodą Giemsy oraz założono hodowlę na podłożu NN pokrytym *Escherichia coli*. Powyższe badania potwierdziły zarażenie *Acanthamoeba* spp. [22].

Raport zdarzeń medycznych 52-letniego mężczyzny pokazuje, że nie istnieje jeden tor postępowania diagnostycznego w zarażeniu *Acanthamoeba* spp. W przeciwieństwie do powyższych opisów przypadków hodowle na podłożu agarowym NN płynu mózgowo-rdzeniowego, płwociny i krwi były negatywne, zaś wynik badania osadu PMR nie odbiegał od normy. Trofozoity i cysty *Acanthamoeba* spp. znaleziono dopiero w bioptacie tkanki mózgowej pobranej *post mortem* [23].

#### Metody pomocnicze w diagnostyce zarażeń *Acanthamoeba* spp.

Laboratoryjna diagnostyka zarażenia *Acanthamoeba* spp. opiera się na poszukiwaniu trofozoitów oraz cyst w materiale pobranym od chorego [6]. Pomocne w ich wykrywaniu, identyfikacji oraz określaniu potencjalnej chorobotwórczości okazują się metody molekularne np.: łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) i jej modyfikacje tj.: losowa amplifikacja polimorficznych fragmentów DNA (RAPD; *random amplification of polymorphic DNA*), analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA (RFLP;

*restriction fragment length polymorphism*) jądrowego, mitochondrialnego i genomowego oraz PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*) [2].

Najczęściej stosowaną metodą biologii molekularnej jest sekwencjonowanie fragmentu genu kodującego 18S rRNA (ang. *ribosomal ribonucleic acid*). W podanym genie istnieją obszary o dużej zmienności, dzięki czemu można zróżnicować *Acanthamoeba* spp. na poszczególne genotypy, które coraz częściej zastępują nazwy gatunkowe. Szczepy są zaliczane do danego genotypu na podstawie ponad 5% zróżnicowania sekwencji w obrębie omawianego genu [2]. W 1999 r. udowodniono, że rozróżnienie genotypów jest możliwe dzięki zastosowaniu starterów JDP1 i JDP2 amplifikujących bardzo zmienny fragment genu ASA.S1 (ang. *Acanthamoeba-specific amplimer S1*) [2, 8]. Dwa lata później okazało się, że bardziej funkcjonalnym jest polimorficzny region GTS.A1 (ang. *genotype-specific amplimer B1*) zawierający 8 bardzo zmiennych obszarów, w tym sekwencję ASA.A1 [2]. Do wykrywania *Acanthamoeba* spp. w mózgu oraz PMR wykorzystuje się analizę fragmentów DNA mitochondrialnego [8]. Szczepy o genotypie T4, oraz w mniejszym stopniu T1, T10 i T12, są odpowiedzialne za inwazje ośrodkowego układu nerwowego, zatok, skóry a także płuc i jamy nosowej [2, 9]. Szczep T4 został również wykryty u trzech pacjentek z AK, u których przeprowadzone genotypowanie z wykorzystaniem sekwencji genu 18s rDNA wykazało 95-97% podobieństwo do *A. castellanii* ATCC 30234 (nr w banku genów: AF 239162) [4]. Jak podaje Visvesvara i wsp. [9] do wykrywania genotypów T1 i T4 *Acanthamoeba* spp. u pacjentów z AK stosuje się również PCR w czasie rzeczywistym. Jednakże na podstawie tego testu identyfikacja szczepów o genotypie T7 oraz T10, będących przyczyną GAE, jest niemożliwa [9].

Techniki molekularne okazały się przydatne również w przypadku pełzakowego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych (AME; *Acanthamoeba meningitidis/meningoencephalitis*). Pierwszy przypadek AME został zdiagnozowany dopiero w 1971 roku w Indiach. Na podstawie badań przeprowadzonych metodą PCR przez Behera i wsp. [7], w próbkach płynu mózgowo-rdzeniowego pacjentów z AME wykazano, że najczęściej występującym genotypem jest T4 [7].

Po wykryciu *Acanthamoeba* spp. istotną rolę odgrywa zróżnicowanie patogennych izolatów od niepatogennych, chociaż rozpoznanie w oparciu jedynie o morfologię i analizę izoenzymów może być niewiarygodne. Z klinicznego punktu widzenia do postawienia diagnozy niezbędna jest jedynie identyfikacja rodzaju organizmu oraz określenie patogenności izolatu [5, 10].

Jako badania dodatkowe w diagnostyce zarażenia *Acanthamoeba* spp. wykorzystuje się metody immunologiczne, takie jak immunofluorescencja pośrednia (IFA, ang. *immunofluorescence assay*). Badanie to polega na zastosowaniu seryjnych rozcieńczeń surowicy pacjenta oraz późniejszej inkubacji na szkiełkach powlekanych amebami lub wyciągami amebicznymi (najlepiej izolatami T1, T4, T12). Następnie dodawane są przeciwciała przeciwko *Acanthamoeba* spp. immunoglobuliny klasy G (IgG) znakowane izotiocyanianem fluoresceiny, co umożliwia detekcję za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. W surowicy osób zarażonych występują wysokie miana przeciwciał (1:256-1:1024), zaś w przy-

padku zdiagnozowania GAE zazwyczaj wynik dodatni oscyluje w granicach 1:128 i wyżej. Zważywszy na fakt, iż *Acanthamoeba* spp. są szeroko rozpowszechnione w środowisku, kontakt ludzi z ich trofozoitami, cystami lub antygenami może być przyczyną niskiego miana przeciwciał u osób zdrowych, które mieszczą się w granicach 1:20-1:60 i nie przekraczają 1:80. Dotyczy to 50-100% osób, u których nie pojawiły się objawy kliniczne spowodowane zarażeniem. Do identyfikacji przeciwciał przeciwko *Acanthamoeba* spp. zastosować można również technikę Western blot oraz metodę ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*), która wykorzystuje jako źródło antygenów całe trofozoity, zamiast ich ekstraktów. Należy jednak pamiętać, że określenie miana przeciwciał przeciwko *Acanthamoeba* spp. ma charakter jedynie orientacyjny i potwierdzeniem zarażenia jest wykrycie cyst lub trofozoitów w materiale biologicznym [8, 9, 11, 12, 13].

Wysokie wartości miana przeciwciał przeciwko *Acanthamoeba* spp. możemy obserwować u osób z ciężkimi niedoborami odporności [12]. Jak podaje Visvesvara [9] w surowicy pacjenta z toczniem rumieniowatym układowym, u którego rozwinęło się zapalenie mózgu wywołane przez *Acanthamoeba* spp. miano przeciwciał przeciwko *A. castellanii* wyniosło 1:512. Wysokie miano przeciwciał (1:256) wykryto również w przypadku pacjenta będącego w trakcie terapii immunosupresyjnej po przeszczepie nerki [9].

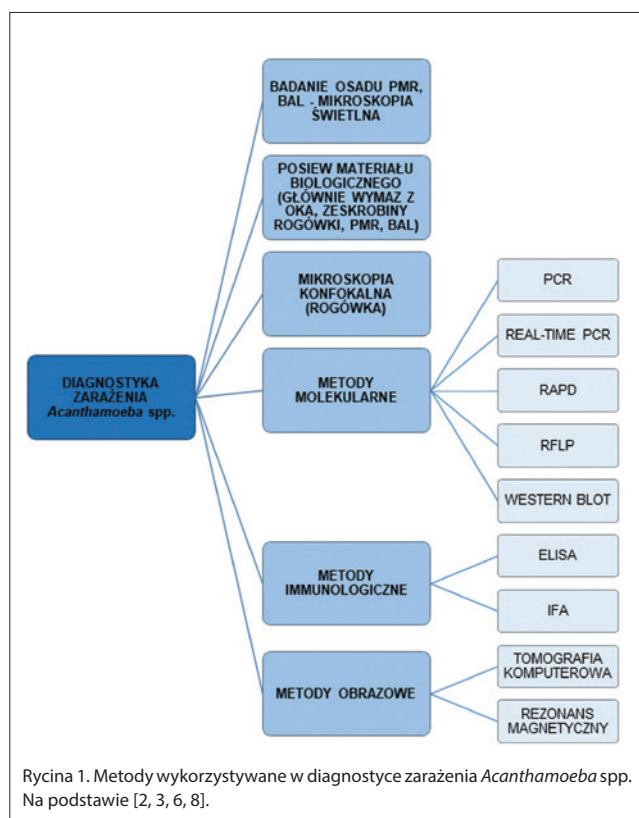
## Podsumowanie

W ostatnich latach odnotowano wzrost liczby zarażeń *Acanthamoeba* spp. Wynika to ze zwiększonego stosowania soczewek kontaktowych, których używanie jest jedną z najczęstszych dróg wnikania tego pierwotniaka do organizmu człowieka i prowadzi do pełzakowego zapalenia rogówki. Pomimo, że zarażenia

*Acanthamoeba* spp. nadal są uważane za stosunkowo rzadkie, to stanowią poważne zagrożenie dla ludzi, ponieważ pełzakowate zapalenie rogówki może prowadzić do pogorszenia lub utraty wzroku zaś ziarniniakowate zapalenia mózgu nawet do zgonu [8, 24]. Większość zarażeń *Acanthamoeba* spp. została wykryta dopiero *post mortem*, dlatego zastosowanie odpowiednich metod diagnostycznych celem potwierdzenia diagnozy jest bardzo istotne i zwiększa prawdopodobieństwo wyleczenia [3, 23]. Rycina 1 przedstawia dostępne metody wykorzystywane w diagnostyce zarażenia *Acanthamoeba* spp. [2, 3, 6, 8]. Warto podkreślić, że aktualnie brak jest standardów dotyczących diagnostyki laboratoryjnej zarażeń *Acanthamoeba* spp., dlatego też należy opracować spójny algorytm postępowania diagnostycznego.

## Piśmiennictwo

1. Jascaniene N, Leońska-Duniec A. Pełzaki wolno żyjące jako zagrożenie dla zdrowia ludzkiego. *Prace Instytutu Kultury Fizycznej*. 2012; 28: 169-174.
2. Leońska-Duniec A. Problemy w określeniu chorobotwórczości pełzaków wolno żyjących z rodzaju *Acanthamoeba*. *Probl Hig Epidemiol*. 2013; 94(1): 24-30.
3. Hadaś E, Derda M. Pełzakowe zapalenie rogówki – nowe zagrożenie epidemiologiczne. *Probl Hig Epidemiol*. 2013; 94(4): 730-733.
4. Szaflik JP, Padzik M, Chomicz L i wsp. Przydatność diagnostyki *in vitro* w trudnych przypadkach *Acanthamoeba* keratitis, wymagających postępowania farmakoterapeutycznego i chirurgicznego. *Okulistyka*. 2012; 3: 28-32.
5. 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.
6. Zalecenia PTN AIDS dotyczące zasad opieki nad osobami zakażonymi HIV. *Polskie Towarzystwo Naukowe AIDS*. Warszawa, 2010: 120-122.
7. Behera HS, Satpathy G, Tripathi M. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* spp. from *Acanthamoeba* meningitis/meningoencephalitis (AME) patients in India. *Parasit Vectors*. 2016; 9(1): 442.
8. da Rocha-Azevedo B, Tanowitz HB, Marciano-Cabral F. Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*. 2009; 2009: 1-14.
9. 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.
10. Khan NA, Jarroll EL, Paget TA. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. *Curr Microbiol*. 2001; 43(3): 204-208.
11. Bloch KC, Schuster FL. Inability to make a premortem diagnosis of *Acanthamoeba* species infection in a patient with fatal granulomatous amebic encephalitis. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(6): 3003-3006.
12. Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors*. 2012; 5: 6.
13. Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev*. 2006; 30(4): 564-595.
14. Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16(2): 273-307.
15. Matsumoto Y, Dogru M, Sato EA, et al. The application of *in vivo* confocal scanning laser microscopy in the management of *Acanthamoeba* keratitis. *Mol Vis*. 2007; 13: 1319-1326.
16. Zhong J, Li X, Deng Y, et al. Associated factors, diagnosis and management of *Acanthamoeba* keratitis in a referral Center in Southern China. *BMC Ophthalmol*. 2017; 17: 175.



17. 17. Maghsood AH, Sissons J, Rezaian M, et al. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *J Med Microbiol.* 2005; 54: 755-759.
18. 18. Parmar DN, Awwad ST, Petroll WM, et al. Tandem scanning confocal corneal microscopy in the diagnosis of suspected *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmology.* 2006; 113(4): 538-547.
19. 19. Walochnik J, Obwaller A, Haller-Schober EM, et al. Anti-*Acanthamoeba* IgG, IgM and IgA immunoreactivities in correlation to strain pathogenicity. *Parasitol Res.* 2001; 87(8): 651-656.
20. 20. Alizadeh H, Apte S, El-Agha MS, et al. Tear IgA and serum IgG antibodies against *Acanthamoeba* in patients with *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea.* 2001; 20(6): 622-627.
21. 21. Sheng WH, Hung CC, Huang HH, et al. First case of granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba castellanii* in Taiwan. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 81(2): 277-279.
22. 22. Ghadage DP, Choure AC, Wankhade AB, et al. Opportunistic free: Living amoeba now becoming a usual pathogen? *Indian J Pathol Microbiol.* 2017; 60(4): 601-603.
23. 23. Matsui T, Maeda T, Kusakabe S, et al. A case report of granulomatous amoebic encephalitis by Group 1 *Acanthamoeba* genotype T18 diagnosed by the combination of morphological examination and genetic analysis. *Diagn Pathol.* 2018; 13(1): 27.
24. 24. Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite.* 2015; 22: 10.

**Autorzy do korespondencji:**

prof. dr hab. n. med. Joanna Matowicka-Karna  
Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
15-269 Białystok, ul. Waszyngtona 15A  
tel. + 48 85 7468584  
e-mail: matowic@umb.edu.pl

dr n. med. Olga M. Koper-Lenkiewicz  
Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
15-269 Białystok, ul. Waszyngtona 15A  
tel. + 48 85 7468584  
e-mail: o.koper@wp.pl

Otrzymano: 13.04.2018

Akceptacja do druku: 3.09.2018

Nie zgłoszono sprzeczności interesów

