

## INFEKCIJE UZROKOVANE SLOBODNOŽIVUĆIM AMEBAMA – ETIOLOGIJA, KLINIČKE OSOBITOSTI, DIJAGNOSTIKA, TERAPIJA I PREVENCIJA

### INFECTIONS CAUSED BY FREE LIVING AMOEBAS – ETIOLOGY, CLINICAL SYMPTOMS, DIAGNOSTIC, THERAPY AND PREVENTION

Mario Sviben<sup>1</sup>, Dubravka Horvat-Krejči<sup>1</sup>, Emilija Mlinarić Missoni<sup>1</sup>

#### SAŽETAK

Slobodnoživuće amebe iz rodova *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* i *Sappinia*, široj su medicinskoj struci nepoznate, ili slabo poznate. Te amebe mogu biti uzročnici životno ugrožavajućih bolesti koje nepravodobno prepoznate i neodgovarajuće liječene, gotovo redovito završavaju ili s teškim posljedicama, ili smrću. U radu je u kratkim crtama prikazana morfologija i epidemiologija slobodnoživućih ameba, kliničke osobitosti, te mogućnosti dijagnostike, liječenja i prevencije infekcija uzrokovanih tim amebama.

*Ključne riječi:* slobodnoživuće amebe, *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Sappinia*

#### UVOD

Slobodnoživuće amebe iz rodova *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* i *Sappinia*, široj su medicinskoj struci nepoznate, ili slabo poznate. Te amebe mogu biti uzročnici životno ugrožavajućih bolesti koje nepravodobno prepoznate i neodgovarajuće liječene, gotovo redovito završavaju ili s teškim posljedicama ili smrću. Slobodnoživuće amebe široko su rasprostranjene u prirodi. U velikome su broju prisutne u tlu, vodi i u zraku. Izolirane su iz različitih uzoraka u zdravih ljudi<sup>1-3</sup>.

#### SUMMARY

Free-living amoebas, members of the genera *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* and *Sappinia* are generally unknown or little known in the medical profession. They can cause life-threatening diseases. If not recognized early enough or inappropriately treated they can cause death or serious consequences. In this paper we presented morphology, epidemiology, clinical characteristics, diagnosis, therapy and prevention of these infections.

*Key words:* free-living amoebas, *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Sappinia*

Nasreću, bolesti koje uzrokuju, rijetke su. Slobodnoživuće amebe mogu biti prirodni nositelji određenih bakterija (primjerice vrste *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium leprae*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*)<sup>4-9</sup>. Važnost, te moguće posljedice prijenosa bakterija slobodnoživućim amebama na zdravlje ljudi, još uvijek nisu u potpunosti istraženi. Bolesti koje uzrokuju mogu se podijeliti na četiri odvojena klinička sindroma<sup>1-3</sup>:

1. primarni amebni meningoencefalitis (PAM)
2. granulomatozni amebni meningoencefalitis (GAM)
3. diseminirana granulomatozna bolest (DGB)
4. amebni keratitis (AK)

Nedavno opisana infekcija uzrokovana amebom *Sappinia diploidea*, otvara mogućnost da i pojedine

<sup>1</sup> Služba za mikrobiologiju, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb  
Primljeno: 20. 3. 2007.  
Prihvaćeno: 22. 4. 2007.

Adresa za dopisivanje: Mario Sviben dr. med., Odjel za parazitologiju, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Rockefellerova 2, 10000 Zagreb, tel.: 01 48 63 269, e-mail: mario.sviben@hzjz.hr

druge, do sada neopisane vrste slobodnoživućih ameba, u budućnosti budu identificirane kao ljudski patogeni<sup>10,11</sup>.

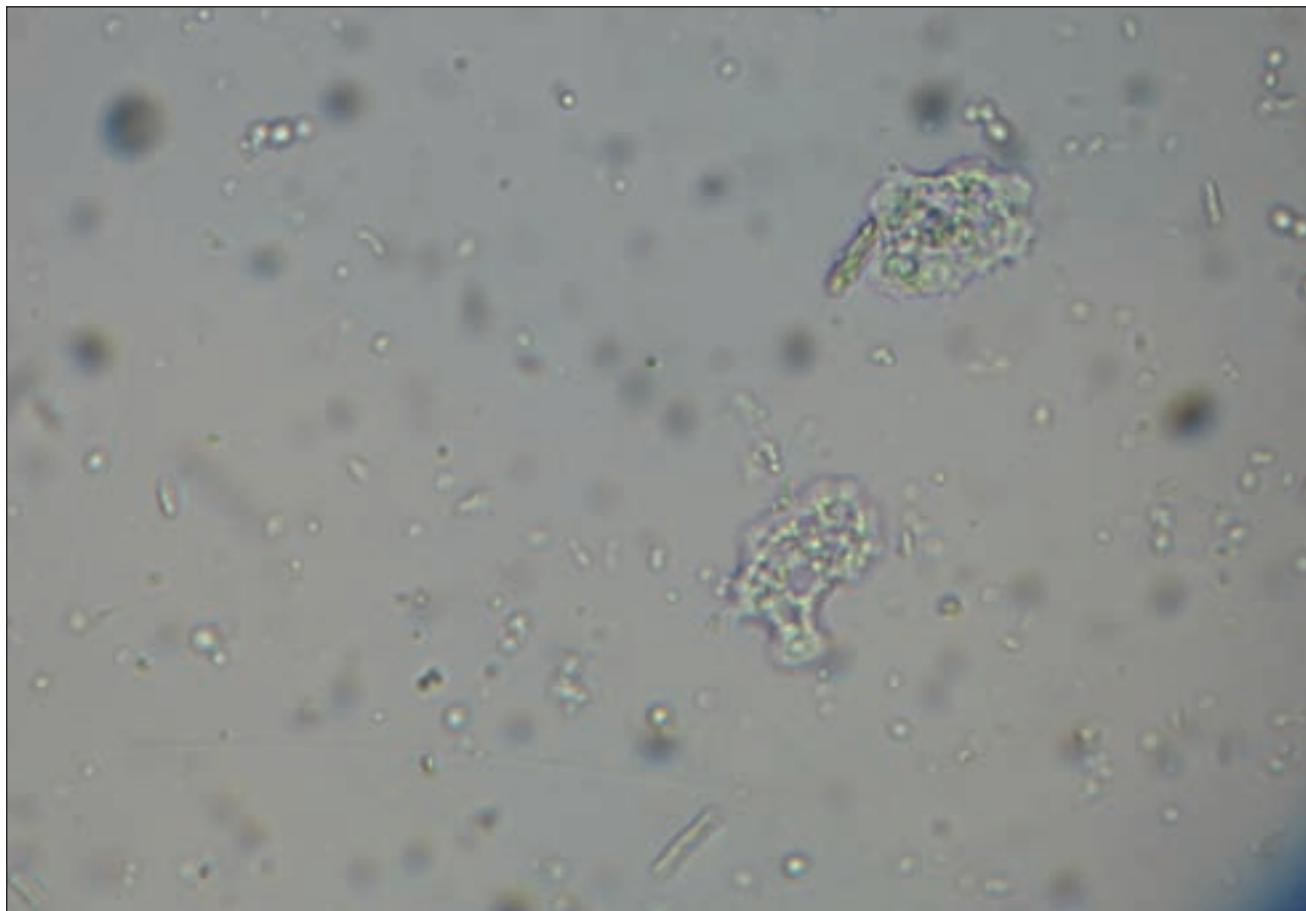
## MORFOLOGIJA SLOBODNOŽIVUĆIH AMEBA

Godine 1965. Malcom Fowler prvi je opisao PAM uzrokovan slobodnoživućom amebom *Naegleria fowleri*<sup>12</sup> (*N. fowleri*). Uz vrstu *N. fowleri*, i druge su vrste toga roda opisane kao humani patogeni (primjerice *N. australis*, *N. italica*). Jedinstveno je obilježje predstavnika toga roda to da uz trofozoitni i cistični oblik imaju i treći, flagelarni oblik. Trofozoiti te amebe duljine su 10 – 30 µm, imaju jezgru s izraženim kompaktnim kariosomom, te oblikuju po jedan širok pseudopodij. *In vivo*, granulirana citoplazma često sadrži fagocitirane eritrocite i leukocite. U prirodi, ta se ameba hrani bakterijama, te ima aerobni metabolizam. Ciste su sferična oblika, promjera približno 9 µm, sa središnje smještenom jezgrom. Stijenka ciste sadrži dvije pore (otvora) začepljene mukoznom tvari.

Kroz te pore tijekom podraživanja izlazi trofozoit. Flagelarni oblik nastaje iz trofozoita u vanjskom okruženju i na hranjivim podlogama. Kruškolika je oblika, s dvama bičevima koji polaze s prednjega kraja tijela. Rod *Naegleria* obuhvaća termofilne amebe koje mogu rasti i razmnožavati se do temperature od 45°C, što je epidemiološki važno<sup>1-3</sup>.

U rodu *Acanthamoeba*, patogene su sljedeće vrste: *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. culbertsoni*, *A. palestinensis*, *A. astronyxis*, *A. hatchetti*, *A. divionensis* i *A. griffini*<sup>13</sup>. Trofozoiti tih ameba duljine su 14 – 40 µm, sadrže jednu jezgru s izraženim središnjim kariosomom, te tvore karakteristične trnaste pseudopodije (akantapodije), po čemu je čitav rod i dobio ime. Ciste koje imaju promjer 12 – 16 µm, obavijene su dvostrukom nepravilnom stijenkom koja također može sadržavati pore. Akantamebe imaju aerobni metabolizam, te najbolje rastu na temperaturi 25 – 37 °C<sup>1-3</sup>.

Amebe iz roda *Balamuthia* nedavno su identificirane kao uzročnici meningoencefalitisa u životinja i u ljudi. Do naših je dana opisano stotinjak bolesnika inficiranih tim amebama<sup>14-21</sup>.



Slika 1. *Acanthamoeba* spp. – trofozoiti iz kulture, laboratorijski soj, nebojeni preparat, povećanje 400 puta  
Picture 1 *Acanthamoeba* spp. – trophozoites from culture, laboratory strain, native smear, magnification 400 X

Najvažniji predstavnik roda jest vrsta *Balamuthia mandrillaris*. Trofozoiti te amebe prosječne su duljine 30  $\mu\text{m}$ . Imaju jednu jezgru. Ciste imaju troslojnu stijenku, nepravilna su oblika i promjera približno 15  $\mu\text{m}$ <sup>1,2,3</sup>.

Vrsta *Sappinia diploidea* nedavno je dokazana kao uzročnik infekcije središnjega živčanoga sustava u ljudi<sup>10,11</sup>. Iako prvi podaci o toj amebi datiraju iz godine 1908., sve donedavna ta je ameba smatrana apatogenom. Rasprostranjena je širom svijeta u tlu i životinjskome fecesu. Trofozoiti su duljine 40 – 70  $\mu\text{m}$ . Imaju dvije jezgre i veliku citoplazmatsku vakuolu. Ciste nisu opisane<sup>1-3</sup>.

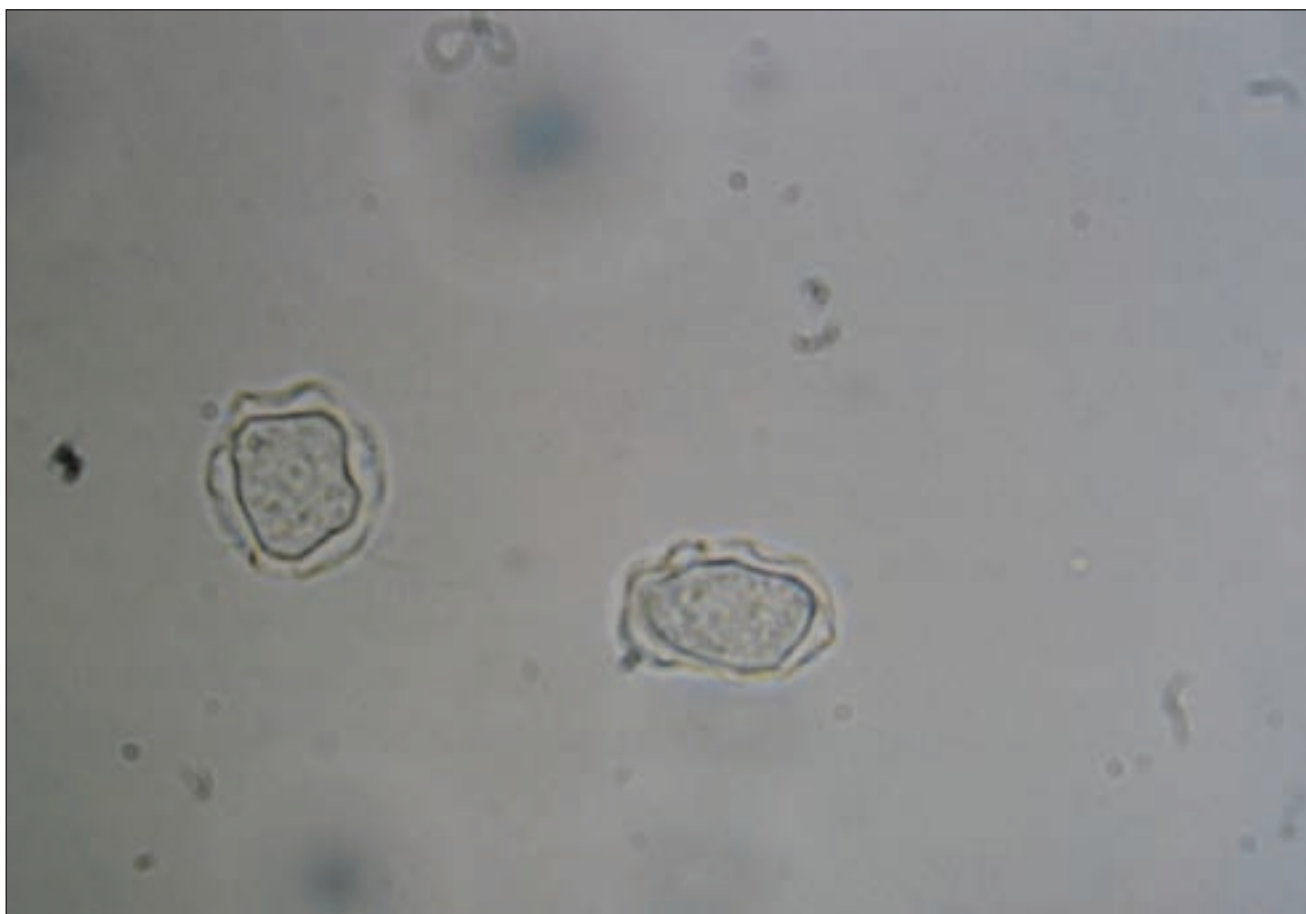
## EPIDEMIOLOGIJA

Vrsta *N. fowleri* izolirana je širom svijeta iz tla, rijeka, jezera i zagrijanih industrijskih voda. Cista je otporna na mnogobrojne fizikalno-kemijske utjecaje. Primjerice, infektivnost cista očuvana je osam mjeseci u vodi temperature +4°C<sup>22</sup>. Unatoč otpornosti cista, ubikvitarnoj rasprostranjenosti i gotovo svakodnevnoj izloženosti toj amebi, PAM je

dokazan u svega 200 bolesnika<sup>16,23</sup>. Čimbenici koji štite ljude od invazivne bolesti uzrokovane tom amebom, za sada nisu poznati. Prisutnost serumskih aglutinina dokazana je u većine odraslih osoba i u djece, što potvrđuje čestu izloženost, te asimptomatske infekcije tom amebom.

Amebe iz roda *Acanthamoeba* također su izolirane širom svijeta iz tla, vode i zraka<sup>13,24</sup>. U istraživanju ždrijelne flore u zdravih ljudi, te su amebe izolirane iz uzoraka 38 ispitanika (1,7%) od njih 2289. Serološkim istraživanjem specifična su protutijela dokazana u 50 – 100% zdravih osoba<sup>25,26</sup>. GAM uzrokovan akantamebom, također je rijetka bolest. Pojavljuje se u imunokompromitiranih osoba (primjerice u AIDS bolesnika, bolesnika s imunološkom slabosti zbog bolesti jetre, šećerne bolesti, transplantacije solidnih organa i koštane srži, kemoterapije, te terapije kortikosteroidima)<sup>1-3</sup>. U literaturi je opisano 150 bolesnika s tom kliničkom slikom infekcije akantamebama<sup>1-3</sup>.

Za razliku od GAM-a, AK se pojavljuje u inače zdravih ljudi. Najvažniji rizični čimbenici za razvoj te infekcije jesu nošenje kontaktnih leća, korištenje



Slika 2. *Acanthamoeba* spp. – ciste iz kulture, laboratorijski soj, nebojeni preparat, povećanje 400 puta  
Picture 2 *Acanthamoeba* spp. – cysts from culture, laboratory strain, native smear, magnification 400 X

vodovodne vode za njihovo ispiranje, te kupanje s lećama u otvorenim vodama (u 85% bolesnika)<sup>27</sup>. U SAD-u, opisano je više od 3000 bolesnika s kliničkom slikom AK-a. Desetak slučajeva bolesti zabilježeno je i u Hrvatskoj<sup>27,28,30,32</sup>.

## KLINIČKI POKAZATELJI

Klinički pokazatelji infekcija slobodnoživućim amebama, obuhvaćaju: PAM, GAM, DGB i AK<sup>1-3</sup>.

PAM jest akutna, gnojna upala mozga i moždanih ovojnica, uzrokovana amebama iz roda *Naegleria*. Pojavljuje se u do tada zdravih osoba. Osim rijetkih slučajeva, redovito završava smrću. Razdoblje između kontakta s amebom i pojave kliničkih simptoma kratko je, najčešće traje 2 do 3 dana, rjeđe do 2 tjedna. Amebe ulaze u organizam aspiracijom vode, inhalacijom prašine, ili aerosola vode koji sadrži trofozoite i/ili ciste. Nakon toga amebe prodiru kroza sluznicu nosa, vjerojatno posredovano fagocitozom epitelnih njušnih stanica, te njušnim živcima ulaze u mozak<sup>1-3,31</sup>. Do oštećenja mozga najvjerojatnije dolazi ingestijom moždanoga tkiva mnogobrojnim fosfolipazama i hemolitičkim proteinima ameba. Patoanatomski, u području zadebljanja njušnoga mozga, živaca i baze mozga, prisutna je hemoragijska nekroza, a u području nosno-ždrijelne sluznice prisutne su ulceracije. Dok se mikroskopijom zahvaćenoga tkiva uočavaju mnogobrojni trofozoiti, ciste tih ameba nisu prisutne<sup>33-35</sup>. Simptomi PAM-a jesu jaka glavobolja, grlobolja, iscjedak iz nosa, povišena tjelesna temperatura (do 39,5°C), povraćanje, ukočenost vrata i letargija. Nakon 3 – 5 dana od pojave prvih simptoma, dolazi do mentalne konfuzije, kome i smrti. Najčešći je uzrok smrti kardiorespiracijski arrest i edem pluća. PAM klinički nije moguće razlikovati od akutnoga bakterijskoga meningoencefalitisa. Važno je postaviti etiološku dijagnozu, budući da antibiotici koji se koriste u terapiji bakterijskih meningoencefalitisa, nemaju nikakva učinka na amebe. Vjerovalo se donedavna da vrsta *N. fowleri* uzrokuje bolest jedino u ljudi, no godine 1997. opisan je prvi slučaj bolesti u južnoameričkoga tapira, a potom i u drugih vrsta životinja<sup>36</sup>.

GAM uzrokovan akantamebama, klinički se može predstaviti kao akutna bolest, ali najčešće poprima kroničan tijek. Patoanatomski, obilježen je stvaranjem granuloma. Pojavljuje se u imunokompromitiranih osoba (s jatrogenom imunosupresijom, ili u osoba inficiranih HIV-om), te kronično bolesnih osoba bez anamnestičke izlože-

nosti kupanju u slobodnim vodama<sup>37-39</sup>. Razdoblje inkubacije GAM-a nije poznato. Pretpostavlja se da mogu proći tjedni ili mjeseci prije pojave simptoma. Klinički pokazatelji uključuju konfuziju, vrtoglavicu, pospanost, glavobolju, epileptičke napadaje, te ponekad hemiparezu<sup>1-3</sup>. Patoanatomski, najzahvaćenije su polutke mozga. Bivaju edematozno i nekrotski promijenjene, poglavito u područjima sljepoočnoga, tjemennoga i zatiljnoga režnja. Mikroskopski, u tkivu mozga uočavaju se mnogobrojni trofozoiti, ciste i stanice s više jezgara koje oblikuju mnogobrojne granulome<sup>40,41</sup>. Smatra se da do infekcije središnjega živčanoga sustava akantamebama dolazi preko krvi, vjerojatno iz prvotnoga mjesta infekcije u dišnomu sustavu, ili iz kože. Infekcija središnjega živčanoga sustava akantamebama opisana je i u mnogih životinjskih vrsta<sup>42,43</sup>.

Donedavna, smatralo se da kliničku sliku GAM-a mogu uzrokovati jedino akantamebe. Međutim, u nekoliko bolesnika s navedenom kliničkom slikom, te amebe nije bilo moguće dokazati. Temeljitim mikrobiološkim pretragama ustanovljeno je da je u navedenih bolesnika uzročnik GAM-a bila druga vrsta slobodnoživućih ameba – *Balamuthia mandrillaris* ili *Sappinia diploidea*<sup>1-3,37</sup>. Do naših je dana u literaturi opisano više od 90 bolesnika s kliničkom slikom kronične infekcije središnjega živčanoga sustava, uzrokovane vrstom *B. mandrillaris*, i samo je jedan bolesnik inficiran vrstom *S. diploidea*. Patologija, patogeneza i klinička slika GAM-a uzrokovanoga tim amebama, istovjetni su GAM-u uzrokovanom akantamebama. Ciste i trofozoiti ameba tih triju rodova morfološki su slični, i teško ih je mikroskopski međusobno razlikovati. Antigenu su različiti i serološki ne reagiraju unakrsno.

Uzročnici DGB-a i AK-a jesu akantamebe. DGB se klinički može očitovati kožnim oštećenjima, pneumonitisom, upalom nadbubrežnih žlijezda, krvnih žila, kostiju, sinusa, te peptičkim ulkusom<sup>44-46</sup>. AK jest teška i rijetka upala rožnice koja nepravodobno prepoznata i neodgovarajuće liječena dovodi do gubitka vida, odnosno oka. Često se krivo dijagnosticira kao herpetički, bakterijski ili gljivični keratitis. Početni simptom infekcije najčešće je osjet stranoga tijela u oku, a potom dolazi do jake boli u oku, fotofobije, suzenja, blefarospazma, konjunktivitisa, te zamućenja vida. Moguća su razdoblja poboljšanja, što često pridonosi zakašnjenju postavljanju etiološke dijagnoze<sup>27,28,38,47</sup>. Mnogobrojna epidemiološka istraživanja kvalificirala su nošenje kontaktnih

leća najvažnijim čimbenikom za razvoj te infekcije. Meke su leće osjetljivije na kontaminaciju amebama. Smatra se da su uzroci tomu obilježja tvoriva i fizikalno-kemijske osobitosti tih leća. Ionski sastav i velika količina vode u hidrogelu mekih leća, povoljna su sredina za adherenciju parazita<sup>1-3</sup>.

## LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Postavljanje dijagnoze infekcija uzrokovanih slobodnoživućim amebama, često je nepravodobno. Uzrok je tomu to što se na te amebe kao moguće uzročnike bolesti ne misli, ili se kasno pomisli. Na osnovi kliničke slike, nemoguće je postaviti etiološku dijagnozu. Epidemiološki podaci o mogućoj izloženosti slobodnoživućim amebama, važni su za ispravno usmjeravanje dijagnostike. Etiološka dijagnoza infekcija tim amebama postavlja se postupcima izravne (mikroskopija i kultivacija uzročnika) i neizravne (serološke) mikrobiološke dijagnostike.

Osnova točne i pouzdane mikrobiološke dijagnostike jest pravodobno, pravilno i s pravoga mjesta uzet uzorak kliničkoga materijala. Vrsta uzorka ovisi o kliničkoj slici infekcije. To može biti likvor, bioptat mozga, kože, pluća, strugotina rožnice, ili krv za serološku dijagnostiku. Uzorke za izravnu dijagnostiku valja pohraniti na sobnoj temperaturi, te obraditi tijekom 24 sata nakon uzimanja. Uzorci krvi mogu biti pohranjeni na temperaturi od -20°C kroz dulje vrijeme. Poželjno je da se dijagnostika infekcija slobodnoživućim amebama provodi u biološki sigurnosnu kabinetu drugoga, ili višega stupnja biozaštite. Tijekom rada s infektivnim materijalom, nužno je da laboratorijsko osoblje koristiti sve uobičajene propisane mjere zaštite.

Mikroskopijom nativnoga (nebojena) i obojena preparata uzoraka kliničkoga materijala, traže se karakteristični trofozoiti i ciste ameba. Korištenjem fazno-kontrastne mikroskopije moguće je finije zamjećivanje detalja u građi organizma, a korištenjem mikroskopa s grijanim stolićem, moguće je zamjećivanje načina kretanja ameba. Bojenjem preparata (najčešće se rabi trikrom postupak, ili bojenje željeznom hematoksilinom), također je moguće zamjećivanje strukturnih detalja, ali i trajno čuvanje pripremljena preparata<sup>1-3</sup>.

Kultivacija slobodnoživućih ameba moguća je i relativno nezahtjevna. Amebe iz roda *Acanthamoeba* i *Naegleria* moguće je kultivirati na običnu agaru zasijanom bakterijama (primjerice vrstom *Escherichia*

*coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, ili *Stenotrophomonas maltophilia*). Nakon 4 – 5 dana inkubacije, u slučaju pozitivna uzorka, uočavaju se karakteristični trofozoiti i ciste ameba<sup>1-3</sup>. Kultivacija vrste *Balamuthia mandrillaris* zahtjevnija je, jer joj je amebi za rast potrebna kultura stanica<sup>1-3</sup>.

U dijagnostičke svrhe moguće je izvesti i biološki pokus. Kao pokusna životinja najčešće se koristi miš. U nosnice miša ukapa se suspenzija dobivena uzorka. Miševi zaraženi amebom *N. fowleri* ugibaju za 5 – 7 dana, a miševi zaraženi amebama iz roda *Acanthamoeba* i *Balamuthia* ugibaju za nekoliko tjedana. Tada se mozak životinje pregleda mikroskopski, a ostatak uzorka koristi se za kultivaciju ameba. Traže se trofozoiti i ciste ameba.

Antigene i molekularne različitosti pojedinih rodova slobodnoživućih ameba, bile su osnove razvitka seroloških i molekularno-genetskih dijagnostičkih postupaka: gel difuzije, imunoelektroforeza, imunofluorescentne tehnike, izoenzimske analize i analize DNK<sup>1-3</sup>. Dijagnostika infekcija slobodnoživućim amebama tim metodama provodi se u referentnim parazitološkim laboratorijima i u istraživačkim centrima. Serološka dijagnostika primjenjuje se u dijagnostici infekcija uzrokovanih amebama iz rodova *Acanthamoeba* i *Balamuthia*. U dijagnostici infekcija uzrokovanih amebom *N. fowleri*, serologija nema veću važnost, jer je klinički tijek infekcije brz i prekratak za razvitak važnoga titra protutijela.

Dijagnostika infekcije uzrokovane amebom *S. diploidea*, ograničena je na izravnu (mikroskopsku) metodu mikrobiološke dijagnostike. Može se očekivati skori razvitak i pojava na tržištu seroloških i molekularnih testova za dijagnostiku te infekcije<sup>1-3</sup>.

## LIJEČENJE

Vrsta *N. fowleri* osjetljiva je na amfotericin B *in vitro* i *in vivo*<sup>38,48,49</sup>. U literaturi opisan je oporavak bolesnika nakon unutarcelne i unutarvenske primjene amfotericina B, samog ili u kombinaciji s mikonazolom<sup>42,49</sup>. Liječenje invazivnih infekcija akantamebama složenije je i manje učinkovito. U literaturi opisano je izlječenje GAM-a sulfadijazinom i flukonazolom u AIDS bolesnika<sup>3</sup>. Jones i suradnici dokazali su pokusima na životinjama djelotvornost paromomicina, klotrimazola i hidrokortilbamid izoetionata u liječenju infekcije akantamebama. No, potrebno je još vremena da bi se mogli izvesti konačni zaključci primjene takvoga liječenja u ljudi, te odredile optimalne smjernice za liječenje GAM-a. Za sada se liječenje AK-a pokazalo

uspješnijim negoli liječenje GAM-a. Taj rezultat jamačno je povezan s mogućnošću kirurškoga debridmana rožnice, te korištenja visokih koncentracija lijekova lokalnom primjenom. U jednom je istraživanju liječenje provedeno 0,1%-tnim propamidin izotiomat kapima (Brolen), 0,15%-tnom dibromopropamidnom mašću i neomicinom, bilo uspješno<sup>29</sup>. U drugom je istraživanju liječenje 1%-tnim klotrimazolom u kombinaciji s Brolen kapima i neosporinom, također dalo izvrsne rezultate<sup>27</sup>.

Iako je većina bolesnika oboljela od GAM-a uzrokovanoga vrstom *B. mandrillaris* umrla, u dvoje bolesnika liječenje pentamidinom, sulfadiazinom, klaritromicinom, flukonazolom i 5-fluoro-citozinom bilo je uspješno<sup>3</sup>. Jedini opisani bolesnik s kliničkom slikom GAM-a uzrokovanog vrstom *S. diploidea*, uspješno je izliječen kombinacijom azitromicina, pentamidina, itrakonazola i 5-fluorocitozina<sup>10,11</sup>.

## PREVENCIJA

Prevenција i kontrola infekcija uzrokovanih slobodnoživućim amebama, teška je. Te su amebe ubikvitarni mikroorganizmi, a izolirani su iz tla, slobodnih voda (potoci, rijeke, jezera, morska voda), prašine i vodovodne vode. Uobičajena koncentracija klora u vodovodnoj vodi nije cisticidna. Poradi sprečavanja AK-a, nositeljima kontaktnih leća preporučuju se sljedeći preventivni postupci:

- redovito čišćenje leća laganim struganjem poradi uklanjanja biofilma
- povremeno uranjanje leća u vruću vodu (najmanje 70°C)
- izbjegavanje korištenja sredstava za dezinfekciju leća kućne izrade
- koriste li se sredstva za dezinfekciju leća na osnovi vodikova peroksida, potrebno je primjenjivati dvostupanjski sustav dezinfekcije
- redovito mijenjanje kontaktnih leća
- tijekom kupanja u otvorenim vodama, ne nositi kontaktne leće<sup>1-3</sup>

Iako rijetke, infekcije slobodnoživućim amebama našle su svoje mjesto među zaraznim bolestima u ljudi. Valja očekivati da će zbog veće svijesti o slobodnoživućim amebama kao mogućim uzročnicima bolesti, broj bolesnika svake godine rasti. Pravodobnom suradnjom kliničara i dijagnostičara (mikrobiologa – parazitologa), moguće je dovoljno rano postaviti ili isključiti dijagnozu tim zanimljivim mikroorganizmima.

## LITERATURA

1. Garcia LS. Protozoa from other body sites. U: Diagnostic medical parasitology. Washington DC: ASM Press, 2001:106-20.
2. Visvesvara GS. Pathogenic and opportunistic free-living amebe. U: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Manual of clinical microbiology. Washington DC: ASM Press, 2003:1981–1990.
3. Singh U. Free-living amebas. U: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principle and practice of infectious diseases. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2005:3111-21.
4. Baker J, Brown MRW. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. Microbiology 1994;140:1253-9.
5. California state department of health services. Diseases caused by free-living opportunistic amebae. Calif Morbid 1995;7/8:1-2.
6. Marolda CL, Hauröder M, John A, Michel R, Volvano MA. Intracellular survival and saprophytic growth of isolates from the *Burkholderia cepacia* complex in free-living amebae. Microbiology 1999;145:1507-17.
7. Michel R, Burghardt H, Bergmann H. Acanthamoeba isolated from a highly contaminated drinking water system of a hospital exhibited natural infections with *Pseudomonas aeruginosa*. Zentralbl Hyg Umweltmed 1995;196:532-44.
8. Michalek R, Hauröder B. Isolation of *Acanthamoeba* strain with intracellular *Burkholderia pickettii* infection. Zentbl Bakteriol 1997;285:541-57.
9. Neumeister B, Schoniger S, Faigle M, Eichner M, Dietz K. Multiplication of different *Legionella* species in mono Mac 6 cells and *Acanthamoeba castellanii*. Appl Environ Microbiol 1997;63:1219-24.
10. Gelman BB, Popov V, Chaljub G. Neuropathological and ultrastructural features of amebic encephalitis caused by *Sappinia diploidea*. J Neuropathol Exp Neurol 2003;62:990-8.
11. Gelman BB, Rauf SJ, Neder R. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. JAMA 2001; 285:2450-1.
12. Fowler M, Carter RF. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp: A preliminary report. Br Med J 1965;5464:740-2.
13. Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* sp as agents of diseases in humans. Clin Microb Rev 2003;16:273-307.
14. Bakardjiev A, Azimi PH, Ashouri N. Amebic encephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris*: Report of four cases. Pediatr Infect Dis J 2003; 22:447-53.
15. Deol I, Robledo L, Meza A. Encephalitis due to a free-living amoeba (*Balamuthia mandrillaris*): Case report with literature review. Surg Neurol 2000;53:611-6.
16. Martinez AJ, Visvesvara GS. *Balamuthia mandrillaris* infection. J Med Microbiol 2001;50:205-7.
17. Deetz TR, Sawyer MH, Billman G. Successful treatment of *Balamuthia* amoebic encephalitis: Presentation of 2 cases. Clin Infect Dis. 2003;37:1304-12.

18. Visvesvara GS, Stehy-Green JK. Epidemiology of free-living ameba infections. *J Protozool.* 1990;37:25-33.
19. Visvesvara GS, Martinez AJ, Schuster FL. Leptomyxid ameba, a new agent of amebic meningoencephalitis in humans and animals. *J Clin Microbiol* 1990;28:2750-6.
20. Anvil AP, Rao C, Wrzolek MA. Amebic meningoencephalitis in a patient with AIDS caused by a newly recognised opportunistic pathogen, *Leptomyxid* ameba. *Arch Pathol Lab Med* 1991;115:21-5.
21. Visvesvara GS, Schuster FL, Martinez AJ. *Balamuthia mandrillaris* agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J Eukaryot Microbiol* 1993;40:504-14.
22. Warhurst DC, Carman JA, Mann PG. Survival of *Naegleria fowleri* cysts at 4 degrees C for eight months with retention of virulence. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1980;74:832.
23. Martinez AJ, Visvesvara GS. Free living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol* 1997;7:583-98.
24. Martinez AJ. Free living amebas: Natural history, prevention, diagnosis, pathology and treatment of disease. Boca Raton; FL: CRC Press 1985.
25. Cerva L. *Acanthamoeba culbertsoni* and *Naegleria fowleri*: Occurrence of antibodies in man. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1989;33:99-103.
26. Cursons RT, Brown TJ, Keys EA. Immunity to pathogenic free-living amoebae. *Lancet* 1977;2:875-6.
27. Stehr-Green JK, Bailey TM, Brandt FH. *Acanthamoeba* keratitis in soft contact lens wearers. A case-control study. *JAMA* 1987;258:57-60.
28. Larkin DFP, Kilvington S, Dart JKG. Treatment of *Acanthamoeba* keratitis with polyhexamethylene biguanide. *Ophthalmology* 1992;99:185-91.
29. Wright P, Warhurst D, Jones BR. *Acanthamoeba* keratitis successfully treated medically. *BR J Ophthalmol* 1985;69:778-82.
30. Sviben M, Horvat Krejči D, Novak Lauš K. Rijedak uzročnik keratitisa – *Acanthamoeba* spp. *Lijec Vjesn* 2005;127(9-10):223-5.
31. Health Services. Primary amebic meningoencephalitis associated with a natural hot springs in San Bernardino county. *Calif Morbid* 1992;13/14:1.
32. Juratovac Z, Pokupec R, Petriček I. *Acanthamoeba* keratitis-prikaz slučaja. *Ophthalmol Croat* 2000; (Supp 1):23.
33. Aitken L, Brasseur P, Favennec L, Perrihe D, Watt L, Seal DV. Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmanella* infection. *Ophthalmology* 1996;103:485-94.
34. Cerva L, Kassprazyk W, Mazur T. *Naegleria fowleri* in cooling waters of power plants. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1982;26:152-61.
35. Feingold JM, Abraham J, Bilgrami S, Ngo N, Visvesvara GS, Eduards RL, Tutschka PJ. *Acanthamoeba* meningoencephalitis following autologous peripheral stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:297-300.
36. Lozano-Alarcon F, Bradley GA; Houser BS, Visvesvara GS. Primary amebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri* in a South American tapir. *Vet Pathol* 1997;34:239-43.
37. Gordon SM, Steinberg JP, DuPuis M, Kozarsky P, Nickerson JF, Visvesvara GS. Culture isolation of *Acanthamoeba* species and leptomyxid amebas from patients with amebic meningoencephalitis including two patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1992;15:1024-30.
38. Ma P, Visvesvara GS, Martinez AJ, Theodore FH, Daggett PM, Sawyer TK. *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections:review. *Rev Infect Dis* 1990;12:490-513.
39. Martinez AJ. *Acanthamoebiasis* and immunosuppression. Case report. *J Neuropath Exp Neurol* 1982;41:548-57.
40. Friedland LR, Raphael SA, Deutsch ES, Johal J, Martyn Lj, Visvesvara GS, i sur. Disseminated acanthamoeba infection in a child with symptomatic human immunodeficiency virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 1992;11:404-7.
41. Gonzales M, Gould E, Dickinson G, Martinez AJ, Visvesvara GS, Cleary TJ, i sur. AIDS associated with *Acanthamoeba* infection and other opportunistic organisms. *Arch Pathol Lab Med* 1986;110:749-51.
42. Martinez AJ, Visvesvara GS. Free living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Path* 1997;7:583-9.
43. Visvesvara GS, Stehr-Green JK. Epidemiology of free-living ameba infections. *J Protozool* 1990;37:25-33.
44. Anderlini P, Przepiorka D, Luna M. *Acanthamoeba* meningoencephalitis after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transpl* 1994;14:459-61.
45. Steinberg JP, Galinda RL, Kraus ES. Disseminated acanthamoebiasis in a renal transplant recipient with osteomyelitis and cutaneous lesions: Case report and literature review. *Clin Infect Dis* 2002;35:43-9.
46. Thamprasert K, Khunamornpong S, Morakote N. *Acanthamoeba* infection of peptic ulcer. *Ann Trop Med Parasitol* 1993;87:403-5.
47. Brasseur G, Favennec L, Perrine D, Chenu JP, Brasseur P. Successful treatment of *Acanthamoeba* keratitis by hexamidine. *Cornea* 1994;13:459-62.
48. Carter RF. Primary amoebic meningoencephalitis. An appraisal of present knowledge. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1972;66:193-208.
49. John DT. Opportunistically pathogenic free-living ameba. U: Kreier JP, Baker JR. *Parasitic Protozoa*. New York: Academic Press, 1993:143-246.