

EPIDEMIOLOGIA DELLE INFEZIONI DA AMEBE A VITA LIBERA

Maria De Giusti, Domenico Barbato, Domenico Cacchio, Lucia Marinelli
Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma, Roma

Le amebe a vita libera causano un numero relativamente basso di infezioni se si considera la loro distribuzione ubiquitaria nell'ambiente. Nonostante il basso numero, le infezioni hanno esiti molto gravi (1). Esistono centinaia di specie di amebe, ma solo un numero limitato riveste interesse in campo sanitario: *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp, *Balamuthia mandrillaris*, e, in un solo caso, è stata segnalata la specie *Sappinia*. In particolare, *Naegleria fowleri* è responsabile della Meningoencefalite Amebica Primaria (MAP) mentre alcune specie di *Acanthamoeba* e *Balamuthia mandrillaris* possono provocare Encefalite Amebica Granulomatosa (EAG), soprattutto in pazienti immunocompromessi. Inoltre *Acanthamoeba* può determinare gravi infezioni corneali note come Cheratiti Amebiche (CA). Infine, le amebe a vita libera possono fungere da *carrier* per alcune specie patogene per l'uomo quali legionelle, micobatteri, clamidie. Pertanto, la loro presenza come contaminanti delle acque può rappresentare un serio problema di sanità pubblica (2-4).

La Tabella 1 riporta i dati epidemiologici relativi alle malattie di origine idrica provocate da amebe a vita libera (4).

Tabella 1. Epidemiologia delle patologie a trasmissione idrica causate da amebe a vita libera

Ameba/ Patologia	Casi stimati nell'uomo (periodo)	Diffusione e habitat	Popolazione a rischio	Malattie in ospiti diversi dall'uomo	Possibilità di infezioni attraverso l'acqua
<i>Acanthamoeba</i> Encefalite	200 (1960-2000)	Globale; suolo e acqua	Soggetti immuno- compromessi (AIDS, trapiantati, persone con pato- logie ricorrenti)	Animali selvatici e domestici (cane, cavalli, scimmie, ovini, tori, canguro e bufalo indiano)	Ridotta
<i>Acanthamoeba</i> Cheratite	>3000 (1980-2000)	Globale; suolo e acqua	Portatori di lenti a contatto	Non sono descritte cheratiti	Acqua potabile utilizzata a livello domestico per la preparazioni di soluzioni saline per le lenti a contatto; Immersione in vasche per idromassaggio
<i>Balamuthia</i> Encefalite	100 (1990-2000)	Globale; suolo e acqua (probabile)	Soggetti immuno- compromessi e immunocompetenti	Scimmie, cavalli, pecore e cani	Ridotta
<i>Naegleria</i> Meningo- encefalite	200 (1990-2000)	Globale; acque calde o termali contaminate	Bambini, giovani apparentemente sani, frequenti nuotatori, viaggiatori in aree geografiche endemiche	Bovini e tapiri	Acque ad uso ricreativo e termali

Infezioni da *Acanthamoeba* spp.

Acanthamoeba spp. è un'ameba a vita libera ubiquitaria e alcune specie (*A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*) occasionalmente infettano l'uomo e possono causare infezioni cutanee, ossee e due diverse patologie: l'encefalite amebica granulomatosa e la cheratite amebica. Un caso raro d'infezione da *Acanthamoeba* è stato riportato in un paziente con una grave immunodepressione causata da infezione da *Mycobacterium tuberculosis* con coinvolgimento polmonare e del Sistema Nervoso Centrale (SNC) (2, 5). In uno studio del 2017 è riportato un caso, il primo segnalato, di disseminazione cutanea di infezione da *Acanthamoeba*, post trapianto renale (6).

La maggior parte delle infezioni umane da *Acanthamoeba* è associata al genotipo T4 (7-9) che è responsabile del 90% delle cheratiti amebiche e di buona parte delle EAG e delle infezioni cutanee (2, 10-12).

Encefalite Amebica Granulomatosa

La EAG si può presentare in forma acuta o subacuta, in tutti i casi, pur se con uno sviluppo lento, ha un esito fatale. Ad oggi in letteratura sono stati riportati poche centinaia di casi (11, 13). Il periodo di incubazione non è conosciuto; tuttavia sembrano necessarie settimane, se non mesi, perché il quadro clinico si presenti. Non ci sono segni specifici legati all'agente e l'inizio è lento e insidioso con un quadro cronico associato a segni di irritazione meningea e segni vari di danno encefalico come febbre, mal di testa, atassia cerebellare, turbe visive, emi-parestesie, convulsioni, difficoltà motorie e coma (5, 11, 13). La EAG è una patologia che si sviluppa soprattutto nei pazienti immunocompromessi ma si può ritrovare anche tra soggetti immunocompetenti. I casi di EAG si verificano in qualsiasi momento dell'anno, senza relazione alla stagionalità (1). La letalità è elevata. Secondo le più recenti stime, la letalità è al di sotto del 70% nel caso in cui l'infezione non arrivi al cervello, mentre nei casi di EAG conclamata la letalità è del 100% (14, 15). Il fattore di rischio per la EAG è l'esposizione ad acqua contaminata. La via di infezione non è ancora certa, tuttavia, l'invasione del cervello sembrerebbe secondaria alla diffusione ematogena dell'infezione primaria in altri distretti, molto probabilmente a livello cutaneo, polmonare o nasale (2, 13). Sebbene la EAG possa essere contratta per contatto con acque contaminate da *Acanthamoeba*, la sorgente di infezione non è ancora certa, a causa della presenza ubiquitaria di *Acanthamoeba* nell'ambiente. Considerata l'ubiquitarietà dell'agente, la frequenza delle infezioni è tuttavia rara (5, 11, 13, 16).

Acanthamoeba è stata isolata in molte strutture termali caratterizzate da acque calde, con un aumento quindi del rischio per la salute degli utilizzatori, in particolare quelli immunocompromessi (16).

Cheratite amebica

Acanthamoeba T15, che corrisponde ad *A. jacobsi*, è stata identificata come responsabile della CA che si sviluppa in soggetti immunocompetenti, in particolare nei portatori di lenti a contatto. La CA colpisce, dunque, prevalentemente soggetti sani e può essere causa di gravi infezioni della cornea che possono portare alla cecità. Generalmente è colpito un solo occhio, anche se sono stati riportati casi di infezione bilaterale. La CA è caratterizzata da forti dolori e infiltrati anulari nello stroma corneale. Le vittime dell'infezione possono andare incontro a uno o più trapianti corneali per riparare il danno provocato dal parassita e nel passato in alcuni casi è stato necessario ricorrere

all'enucleazione, anche se oggi la disponibilità di più efficaci terapie ha reso questa eventualità non più praticata (13, 15-20).

La popolazione a rischio è rappresentata dai portatori di lenti a contatto tra i quali si è manifestato il 90 % delle infezioni. Più raramente, l'infezione può essere acquisita anche dai non portatori di lenti a contatto specie in seguito a trauma oculare ed esposizione a matrici contaminate. Secondo alcuni studi, la presenza di *Acanthamoeba* nelle lenti di soggetti asintomatici non è rara, attestandosi intorno al 8% (5, 21). Dai primi anni '80 il numero di casi di CA è in costante aumento parallelamente al crescente uso di lenti a contatto. Dai primi casi riportati negli USA nel 1973 e in Gran Bretagna nel 1974, la frequenza della diagnosi è aumentata con regolarità. Negli USA si stimano 1,36 casi per milione di portatori di lenti a contatto contro i 17-21 casi per milione in Gran Bretagna. Nel 2004 e nel 2006 negli USA si sono avute due epidemie correlate all'uso di soluzioni per lenti a contatto contaminate in fase di produzione, con 170 casi riportati nel 2007. In Francia è segnalata una prevalenza di 1 caso su 30.000 portatori di lenti a contatto. La scarsa igiene nella manutenzione delle lenti, in particolare la mancanza di attenzione alle pratiche di disinfezione e il risciacquo delle lenti con acqua corrente, così come l'uso delle lenti durante il nuoto o altri sport acquatici, sono ritenuti i principali fattori di rischio (5, 11, 13, 20). Nelle cheratiti da *Acanthamoeba* l'acqua di rubinetto, utilizzata per la preparazione della soluzione salina risulta essere la fonte più probabile di contaminazione (4). In numerosi studi la presenza di amebe è stata rilevata nel 20-30% di campioni di acqua condottata, prelevata ai punti d'uso domestici (22). Una maggiore prevalenza è segnalata nella rete idrica degli ospedali 68,9% (7, 23). In uno studio sulla colonizzazione da amebe della rete idrica domestica delle abitazioni di pazienti affetti da cheratiti è stata evidenziata una colonizzazione dell'89% (24).

Profilassi delle infezioni da *Acanthamoeba*

Il controllo della concentrazione di *Acanthamoeba* nell'acqua non può essere condotto con le pratiche correnti di disinfezione perché il microrganismo è resistente ai più comuni disinfettanti alogenati, così come all'applicazione di raggi UV. L'efficacia della filtrazione è stata studiata, prevalentemente, in impianti di potabilizzazione e si è rivelata anch'essa non particolarmente efficace lasciando ipotizzare un'ampia capacità di colonizzazione dei filtri tanto che la concentrazione in uscita si è rivelata maggiore che in entrata. L'ultrafiltrazione al momento sembra essere l'unico mezzo in grado di produrre un'efficace riduzione delle cisti di *Acanthamoeba* (16).

Accanto all'utilizzo di tecnologie efficaci è altrettanto importante effettuare corrette operazioni di pulizia e manutenzione degli impianti e dei filtri per agire sui fattori che contribuiscono alla crescita di *Acanthamoeba*: materia organica, biofilm e sedimenti. Gli utenti immunocompromessi, tuttavia, dovrebbero essere informati del rischio di acquisire infezioni da *Acanthamoeba* in piscine, bagni termali e vasche di idromassaggio (4, 16).

Per quanto riguarda, nello specifico, la profilassi delle CA, gli utilizzatori di lenti a contatto dovrebbero essere a conoscenza dei rischi legati a questo tipo di infezioni e adottare particolare attenzione in tutte le pratiche di disinfezione e risciacquo. La corretta procedura di disinfezione e risciacquo delle lenti con soluzioni sterili dovrebbe essere rispettata anche per prevenire la formazione di biofilm che rappresenta il potenziale supporto di crescita per *Acanthamoeba* (4, 5, 7, 16).

Il contatto mani-occhi espone al rischio di contaminazione e infezione: un appropriato lavaggio delle mani con acqua e sapone o con soluzioni disinfettanti a base di alcol è stato dimostrato essere efficace nell'eliminare fino al 99% dei trofozoiti (etanolo o isopropanolo al 63% per 30 secondi) e delle forme cistiche (etanolo 80% per 30 secondi o etanolo 63% per 2 minuti) di *Acanthamoeba* (25). Per quanto riguarda il rischio legato specificamente al nuoto si

consiglia, in generale, di rimuovere le lenti a contatto prima di accedere agli impianti oppure risciacquarle con soluzioni sterili dopo il nuoto o ancora di utilizzare lenti usa e getta (3, 4, 11, 26).

Infezioni da *Naegleria fowleri*

Naegleria fowleri è responsabile della Meningoencefalite Amebica Primaria (MAP). Oltre a *N. fowleri* anche *N. philippinensis* e *N. italica* sono state identificate come possibili responsabili di infezioni nell'uomo. Inizialmente *N. italica* veniva isolata solo in Italia ma attualmente è diffusa in tutto il mondo. A causa delle caratteristiche della patologia, le naeglerie, e in particolare *N. fowleri*, sono oggi conosciute come “amebe mangia-cervello”. *Naegleria fowleri* è una specie termofila che può essere ritrovata in laghi, sorgenti, piscine, canali di irrigazione e sorgenti di acque calde (5, 16, 21, 27, 28).

Naegleria fowleri sia in forma di trofozoide sia in forma cistica utilizza come porta di ingresso le narici e, attraverso l'epitelio nasale, risale lungo i nervi olfattivi fino al cervello. È una infezione fulminante con un periodo di incubazione di 1-22 giorni (4, 29). Molte vittime di MAP sono bambini o giovani adulti in buono stato di salute con una storia di balneazione in acque calde o acque termali ove lo sviluppo delle amebe è favorito dalla temperatura elevata e dalla presenza di biofilm. La giovane età delle vittime sostiene quale fattore di rischio la prolungata esposizione all'acqua e la frequente e ripetuta aspirazione attraverso le narici di acqua contaminata da amebe. *Naegleria fowleri*, infatti, invade il sistema nervoso attraverso la via nasale, quando l'acqua è inalata profondamente ad esempio durante i tuffi (17). I sintomi sono: forte mal di testa, febbre alta, rigidità del collo, nausea, vomito, stato confusionale, convulsioni, allucinazioni e infine coma e morte (5, 11, 16). L'infezione non è contagiosa. La letalità è molto elevata, superiore al 97%, nonostante gli sviluppi terapeutici (30). Sono stati riportati solo 7 casi di sopravvissuti fino al 2002. La morte interviene in 3-10 giorni dalla manifestazione dei sintomi (5, 14). Il primo caso umano confermato risale al 1965 e fino al 2010 risultano 235 casi di MAP con la maggior parte dei casi riportati in USA, Australia e Europa (16). Negli USA un'indagine retrospettiva dal 1937 al 2013 ha riportato 142 casi di MAP (14). In Europa sono stati riportati sin ora 24 casi confermati di MAP in Gran Bretagna, Italia e Belgio (21, 28).

I casi di MAP si manifestano più frequentemente nella stagione calda, probabilmente in associazione all'aumento delle attività acquatiche ricreative, tuttavia, il rischio di infezione da *N. fowleri* attraverso acque di sorgente deve essere ulteriormente valutata in quanto *N. fowleri* è nota per resistere a condizioni ambientali estreme e può essere trovata durante tutto l'anno nelle acque di balneazione. Come *Acanthamoeba*, *Naegleria* si può ritrovare in piscine clorate e nei laghetti artificiali e nel biofilm nelle linee idriche degli impianti di acqua calda dove si instaurano condizioni ideali per lo sviluppo (4, 5, 11, 17, 31).

La presenza di *Naegleria* spp nelle acque di sorgenti calde e termali è stata riportata in molti Paesi: in acque termali in Thailandia (24,6-35,3%), Giappone (36%) e Taiwan (22,2-43,3%). Un caso confermato di MAP è stato segnalato a Bath (Regno Unito) nel 1978 e la vittima è stata una giovane che aveva nuotato in una piscina alimentata con le acque termali che sgorgano naturalmente in città (32). Tung *et al.* (2013) hanno analizzato il primo caso confermato di MAP a Taiwan, riportato nel novembre 2011, in cui il paziente ha visitato una sorgente termale una settimana prima del ricovero in ospedale (33). Il campionamento dell'acqua del resort è stato eseguito per verificare la presenza di *Naegleria* presso l'impianto. I genotipi di *Naegleria* individuati sono stati *N. fowleri*, *N. australiensis* e *N. lovaniensis*. Utilizzando la *Reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (meglio conosciuta come RT_PCR), venne confermato

che il ceppo di *N. fowleri* isolato dal campione di acqua prelevata, possedeva lo stesso genotipo del protozoo isolato clinicamente, pertanto, è stato ipotizzato che la sorgente termale fosse la fonte probabile di infezione. A seguito di questo studio iniziale, i serbatoi d'acqua, le piscine e le vasche della struttura termale vennero drenate e disinfettate. Lo studio di follow-up condotto un mese più tardi confermò assenza di riscontro di *N. fowleri* (33). Alcuni studi recenti riportano una presenza significativamente più alta di *N. fowleri* in acque termali rispetto ad altri ambienti acquatici. In Repubblica Ceca 16 casi di MAP sono stati associati all'uso di una piscina pubblica. In questo caso la sorgente della contaminazione è stata individuata in una cavità nella struttura della piscina, alimentata con l'acqua di un fiume (14, 16, 32).

Infine, particolare attenzione dovrebbe essere rivolta all'acqua destinata alle pratiche di irrigazione nasale, alle pratiche religiose, come le abluzioni rituali e/o purificazioni e alle pratiche ayurvediche che possono essere tutte considerate a rischio (29, 32, 34-36). Alcuni studi hanno menzionato l'abluzione rituale musulmana, effettuata con acqua non sicura, come la principale causa del crescente numero di casi mortali di MAP in Pakistan. Infatti, come parte dell'abluzione rituale, viene eseguita la pulizia nasale per assunzione di acqua nelle narici e ciò potrebbe rappresentare la via più probabile per l'acquisizione di infezione (34-36).

Profilassi delle infezioni da *Naegleria fowleri*

Le infezioni da *N. fowleri* sono associate al nuoto e altre attività che permettono l'ingresso del protozoo nel passaggio nasale mediante acqua contaminata (37).

Naegleria fowleri è abbastanza sensibile alla clorazione in un range di 20-60 mg min/L con una riduzione di 4 log del numero delle cisti; pertanto, mantenere livelli di clorazione efficace nelle piscine e nei bagni termali potrebbe essere sufficiente a tenere basso il rischio di infezione (4). Tuttavia, la clorazione potrebbe non essere sufficiente poiché la sua efficacia è legata anche ad altri fattori come la presenza di biofilm o il livello di contaminazione (38, 39). Per quanto sopra riportato, non solo è molto importante verificare che la sorgente di acqua abbia livelli di contaminazione contenuti ma anche applicare opportune metodologie di pulizia e manutenzione degli impianti e dei filtri per contrastare colonizzazione e moltiplicazione. Nelle tubature e nei filtri, infatti, si possono verificare condizioni di continua reimmissione di contaminanti (11).

In Francia, sulla base di diversi studi condotti sulla diffusione di *N. fowleri*, è stato stabilito che nei corsi d'acqua dove è possibile l'esposizione umana, la concentrazione di amebe non debba superare le 100 unità/L (32).

Infezioni da *Balamuthia mandrillaris*

Balamuthia mandrillaris è responsabile di infezioni granulomatose croniche dell'SNC note come *Balamuthia Amoebic Encephalitis* (BAE): comuni all'uomo e ad alcuni animali. *Balamuthia* può provocare anche infezioni disseminate della pelle, dell'utero, della prostata e dei polmoni. Le infezioni sono acquisite sia da soggetti immunocompetenti che da quelli immunocompromessi. Al momento si ritiene che l'infezione si acquisisca per contatto con il suolo o con acque di balneazione contaminate (4, 13, 15). La via d'ingresso è rappresentata dalla via cutanea attraverso tagli e lesioni della cute oppure per inalazione di materiale contaminato. Si suppone anche che *B. mandrillaris* possa raggiungere l'SNC attraverso i nervi olfattivi (4,13, 15, 40).

La sintomatologia è caratterizzata da cefalee, nausea, vomito, fotofobia, dolore o rigidità nucale accompagnate da febbre e stato di affaticamento generale che evolve verso segni

neurologici vari (emiparesi, paralisi, atassia, stato confusionale, difficoltà di movimento e parola (5, 13, 40). La morte sopravviene dopo una lunga evoluzione (da 2 mesi fino a 3 anni) e i casi di guarigione sono rari anche dopo l'individuazione di trattamenti terapeutici. La diagnosi è difficile e tardiva. In soggetti immuno-competenti sani è stata rilevata la presenza di anticorpi specifici contro *Balamuthia*, cosa che suggerisce la concreta possibilità del contatto con questo potenziale patogeno. La prevalenza aumenta con l'età (4, 13, 33, 40). Attualmente, sono stati riportati più di 160 casi di BAE nel mondo tra il 1990 e il 2009, la maggior parte nel continente americano, soprattutto nelle zone calde. Qualche caso è stato descritto anche in Europa ma, considerando le difficoltà diagnostiche, questa patologia rimane piuttosto sottostimata (13).

Infezioni da *Sappinia* spp.

Il primo e unico caso di infezione da *Sappinia pedata* (originariamente identificata come infezione da *S. diploidea*) si è manifestato come encefalite amebica. Il caso è stato descritto nel 2001 da Gelman *et al.* (41). Il paziente era un adulto immunocompetente di 38 anni, contadino del Texas, in contatto con diversi animali e con suolo contaminato da feci. L'uomo presentava una sintomatologia caratterizzata da nausea, vomito, mal di testa bifrontale, fotofobia, visione sfocata e perdita di coscienza. La risonanza magnetica rilevava una massa di 2 cm nel lobo temporale sinistro. La lesione fu asportata e la valutazione di sezioni di tessuto cerebrale mostrò la presenza di trofozoiti aventi due nuclei ben distinti: questa caratteristica rese possibile differenziare l'ameba *Sappinia*. Il paziente infetto venne trattato con azitromicina, pentamidina, itraconazolo e flucitosina.

Sappinia spp. può essere identificata tramite test molecolari come la *Polymerase Chain Reaction* (meglio conosciuta come PCR) (es. Internal Transcribed Spacer, ITS PCR, real-time PCR).

È stata isolata in infezioni umane occorse in Europa, Nord America, Egitto, Giappone, Medio India orientale e occidentale (42).

Bibliografia

1. Hall WA. Free-living amoebas: is it safe to go in the water? *World Neurosurg* 2012;78(6):610-1.
2. Kan NA. Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microb Rev* 2006;30:564-95.
3. Montalbano Di Filippo M, Novelletto A, Di Cave D, Berrilli F. Identification and phylogenetic position of *Naegleria* spp from geothermal springs in Italy. *Exp Parasitol* 2017;183:143-9.
4. Schuster FL, Visvesvara GS. Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic diseases. *Vet Parasitol* 2004; 126:91-120.
5. Barratt JLN, Harkness J, Marriott D, Ellis JT, Stark D. Importance of non enteric protozoan infections in immunocompromised people. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23:795-836.
6. Kutner A, Aldrich M, Patel S, Kang J, Amin B, Mann R, Puius YA. *Acanthamoeba* endophthalmitis during treatment for cutaneous disease in a renal transplant patient. *Transpl Infect Dis* 2018;e12843.
7. Behnia M, Hatam-Nahavandi K, Hajjalilo E, Niyati M, Tarighi F, Akram AB, *et al.* Occurrence of *Acanthamoeba* genotypes in wastewater samples in Tehran, Iran. *Iran J Parasitol* 2017;12(4): 516-21.
8. Casero R D, Mongi F, Laconte L, Rivero F, Sastre D, Teherán A, Ramírez JD. Molecular and morphological characterization of *Acanthamoeba* isolated from corneal scrapes and contact lens wearers in Argentina. *Infect Genet Evol* 2017;54:170-5.

9. Lass A, Guerrero M, Li X, Karanis G, Ma L, Karanis P. Detection of *Acanthamoeba* spp. in water samples collected from natural water reservoirs, sewages, and pharmaceutical factory drains using LAMP and PCR in China. *Sci Total Environ* 2017;584:489-94.
10. Cateau E, Mergey T, Kauffmann-Lacroix C, Rodier MH. Relationships between free living amoebae and *Exophiala dermatitidis*: a preliminary study. *Med Mycol* 2009; 47(1):115-8.
11. World Health Organization. *Guidelines for safe recreational water environments*. Volume 2: Swimming pools and similar environments. Geneva: WHO; 2006.
12. Xuan Y, Shen Y, Ge Y, Yan G, Zheng S. Isolation and identification of *Acanthamoeba* strains from soil and tap water in Yanji, China. *Environm Health Prev Med* 2017;22(1):58-62.
13. Cateau E, Hécharde Y, Rodier MH. Les amibes libres: un danger méconnu. *RFL* 2014; 460:41-51.
14. Capewell LG, Harris AM, Yoder JS, Cope J R, Eddy BA, Roy SL, Visvesvara GS, Fox LM, Beac MJ. Diagnosis, clinical course, and treatment of primary amoebic meningoencephalitis in the United States, 1937-2013. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2015;4(4):e68-75.
15. Visvesvara GS. Amebic meningoencephalitis and keratitis: challenges in diagnosis and treatment. *Curr Opin Infect Dis* 2010;23:590-4.
16. Loret JF, Greub G. Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment. *Int J Hyg Environ Health* 2010;213:167-5.
17. Bright KR, Gerba CP. Review: Occurrence of the pathogenic amoeba *Naegleria fowleri* in groundwater. *Hydrogeol J* 2017;25:953-8.
18. Garcia HH, Tanowitz HB, Del Brutto OH. Infections with free-living amebae. In: Aminoff MJ, Boller F, Swaab DF. *Neuroparasitology and Tropical Neurology*. The Netherlands: Elsevier Amsterdam, 2013. P.114-53.
19. Pacella E, La Torre G, De Giusti M, Brillante C, Lombardi AM, Smaldone G, Lenzi T, Pacella F. Results of case-control studies support the association between contact lens use and *Acanthamoeba* keratitis. *Clin Ophthalmol* 2013;7:991-4.
20. Stapleton F, Ozkan J, Jalbert I, Holden BA, Petsoglou C, McClellan K. Contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis. *Optom Vis Sci* 2009;86(10):e1196-e1201.
21. Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, Makni F, Ayadi A. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Pathol Biol* 2012; 60(6):399-5.
22. Shoff ME, Rogerson A, Kessler K, Schatz S, Seal DV. Prevalence of *Acanthamoeba* and other naked amoebae in South Florida domestic water. *J Water Health* 2008;6(1):99-104.
23. Lasheras A, Boulestreau H, Rogues AM, Ohayon-Courtes C, Labadie JC, Gachie JP. Influence of amoebae and physical and chemical characteristics of water on presence and proliferation of *Legionella* species in hospital water systems. *Am J Infect Control* 2006;34(8):520-5.
24. Kilvington S, Gray T, Dart J, Morlet N, Beeching JR, Frazer DG, Matheson M. *Acanthamoeba* keratitis: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(1):165-9.
25. Aqeel Y, Rodriguez R, Chatterjee A, Ingalls RR, Samuelson J. Killing of diverse eye pathogens (*Acanthamoeba* spp., *Fusarium solani*, and *Chlamydia trachomatis*) with alcohols. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11(2):e0005382.
26. Yoder JS, Verani J, Heidman N, Hoppe-Bauer J, Alfonso EC, Miller D, Jones DB, Bruckner D, Langston R, Jeng BH, Joslin CE, Tu E, Colby K, Vetter E, Ritterband D, Mathers W, Kowalski RP, Acharya NR, Limaye AP, Leiter C, Roy S, Lorick S, Roberts J, Beach MJ. *Acanthamoeba* keratitis: the persistence of cases following a multistate outbreak. *Ophthalmic Epidemiol* 2012;19(4):221-5.
27. Briancesco R, Bonadonna L. Free living amoebae in water environment: health implications. *Microbiol Med* 2013;28(3):40-7.

28. Montalbano Di Filippo M, Santoro M, Lovreglio P, Monno R, Capolongo C, Calia C, Fumarola RL, D'Alfonso R, Berrilli F, Di Cave D. Isolation and molecular characterization of free-living amoebae from different water sources in Italy. *Int J Environ Res Public Health* 2015;12:3417-27.
29. Martínez-Castillo M, Cárdenas-Zúñiga R, Coronado-Velázquez, Debnath A, Serrano-Luna J, Shibayama M. *Naegleria fowleri* after 50 years: is it a neglected pathogen? *J Med Microbiol* 2016; 65:885-6.
30. Debnath A, Calvet CM, Jennings G, Zhou W, Aksenov A, Luth MR, Abagyan R, Nes WD, McKerrow JH, Podust LM. CYP51 is an essential drug target for the treatment of primary amoebic meningoencephalitis (PAM). *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11(12):e0006104.
31. Sifuentes LY, Choate BL, Gerba CP, Bright KR. The occurrence of *Naegleria fowleri* in recreational waters in Arizona. *J Environ Sci Health Tox Hazard Subst Environ Eng* 2014;49(11):1322-30.
32. Moussa M, De Jonckheere JF, Guerlotté J, Richard V, Bastaraud A, Romana M, Talarmin A. Survey of *Naegleria fowleri* in geothermal recreational waters of Guadeloupe (French West Indies). Talamas-Rohana P. Ed. *PLoS ONE* 2013;8(1):e54414.
33. Tung MC, Hsu BM, Tao CW, Lin WC, Tsai HF, Ji DD, Shen SM, Chen JS, Shih FC, Huang YL. Identification and significance of *Naegleria fowleri* isolated from the hot spring which related to the first primary amebic meningoencephalitis (PAM) patient in Taiwan. *Inter J Parasitol* 2013;43(9):691-6.
34. Naqvi AA, Yazdani N, Ahmad R, Zehra F, Ahmad N. Epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis-related deaths due to *Naegleria fowleri* infections from freshwater in Pakistan: An analysis of 8-year dataset. *Arch Pharma Pract* 2016;7:119-29.
35. Shakoor S, Beg MA, Mahmood SF, Bandea R, Sriram R, Noman F, et al. Primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*, Karachi, Pakistan. *Emerg Infect Dis* 2011;17:258-61.
36. Siddiqui R, Khan NA. Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*: an old enemy presenting new challenges. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; (8): e3017.
37. Cabanes PA, Wallet F, Pringuez E, Pernin P. Assessing the risk of primary amoebic meningoencephalitis from swimming in the presence of environmental *Naegleria fowleri*. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:2927-31.
38. Heggie TW. Swimming with death: *Naegleria fowleri* infections in recreational waters. *Travel Med Infect Dis* 2010;8(4):201-6.
39. Heggie TW, Küpper T. Surviving *Naegleria fowleri* infections: A successful case report and novel therapeutic approach. *Travel Med Infect Dis* 2017;16:49-51.
40. De Jonckheere JF. Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infect Genet Evol* 2011;11(7):1520-28.
41. Gelman BB, Rauf SJ, Nader R, et al. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *J Am Med Assoc* 2001;285:2450-1.
42. Winiecka-Krusnell J, Linder E. Bacterial infections of free-living amoebae. *Res Microbiol* 2001;152:613-9.