

# Pierwotne zapalenie mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych (PAM) wywołane przez *Naegleria fowleri*

JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI, ALEKSANDRA ŻURAW, MARTA RYBSKA

Instytut Weterynarii, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,  
ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań

Otrzymano 25.09.2013

Zaakceptowano 13.02.2014

Jaśkowski J. M., Żuraw A., Rybska M.

## Primary Amebic Meningoencephalitis (PAM) caused by *Naegleria fowleri*

### Summary

*Naegleria fowleri* is a pathogenic amoeba that propagates in fresh water. It causes severe meningoencephalitis in infected humans (PAM, primary amebic meningoencephalitis). The mortality rate of this disease reaches over 99%. Most of the cases have been reported in the United States and have occurred mostly in summer. The prevalence of the disease in animals has been significantly lower than in man so far. Cases have been reported in cows, sheep, gibbons, gorillas, and tapirs, and experimental infections have been induced in mice. Meningoencephalitis is accompanied by progressive neurological signs. In the necropsy, the thickening of the meninges and multifocal areas of cerebral and cerebellar malacia are diagnosed. Histologically, a multifocal, necrosuppurative meningoencephalitis with areas of mallacia containing amoeba trophozoites are visible. The diagnosis of the disease is difficult. Amoeba may be detected in the cerebro-spinal fluid, but often only after a culture of necropsy samples has been performed. The following techniques are used to diagnose the disease: immunofluorescent staining, light and confocal microscopy, ELISA, PCR, and RQ-PCR.

**Keywords:** amoeba, *Naegleria fowleri*, PAM – primary amebic meningoencephalitis

Zmiany klimatyczne są faktem. Wysokie temperatury notowane w Polsce latem 2013 r. – przekraczające w wielu miejscach 36°C – częściowo potwierdzają teorię o ocieplaniu klimatu. Upały to nie tylko ryzyko odwodnienia, znacznego obciążenia układu krążenia, wpływają na spadek produkcji mlecznej oraz jałowość. Ich efektem są także nienotowane wcześniej lub stwierdzone wyjątkowo choroby tropikalne. Stosunkowo niedawno w wielu krajach Europy pojawiła się choroba niebieskiego języka (BTV) czy przenoszona przez stawonogi choroba Schmallerberg (49). Ostatnio blisko granic Polski stwierdzono inną egzotyczną chorobę – afrykański pomór świń, a w Brandenburgii przypadki posocznicy krwotocznej bydła wywoływanej przez groźne i rzadko w Europie występujące drobnoustroje z rodzaju *Pasteurella multocida* szczep B2 (26, 40). Pod koniec lata ubiegłego roku opinię publiczną poinformowano o nowym niebezpieczeństwie związanym z zarażeniem przez bytujące w wodzie ameby (*Naegleria fowleri*) powodujące u ludzi i zwierząt ciężkie zapalenie mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych (PAM, *meningoencephalitis amoebica primaria*). Jego śmiertelność oceniana jest u ludzi na ponad 99% ([www.cdc.gov/parasites/naegleria/general.html](http://www.cdc.gov/parasites/naegleria/general.html). CDC – *Naegleria fowleri* – general information).

### Epidemiologia

Jak wynika z nielicznych danych, chorobę wywołaną przez *Naegleria fowleri* (często nazywaną „amebą wyjadająca mózg”) notowano u ludzi na całym świecie. Najwięcej przypadków odnotowano w Stanach Zjednoczonych, gdzie w latach 1962-2012 zweryfikowano 128 inwazji. W oparciu o opisywane objawy retrospektywnie ustalono także inne przypadki PAM do 1937 r. (8). Przypadki PAM powodowane przez *N. fowleri* występowały we wszystkich grupach wiekowych, jednak najczęściej, w 107 przypadkach, dotyczyły dzieci i młodzieży poniżej 18. roku życia (średni wiek 11 lat; zakres od 8 miesięcy do 66 lat). Ponad ¾ zarażeń dotyczyło osobników męskich. Zarażeni ludzie korzystali z różnych form aktywności fizycznej związanej z wodą, takich jak: pływanie pod wodą, nurkowanie, sprzyjające dostawaniu się ameby do nosa (50). Bezwzględna większość dotychczasowych przypadków miała miejsce latem. Nie wydaje się także, by liczba przypadków PAM w USA wzrosła w wyraźny sposób od 1978 r. W 1993 r. notowano ją u pięciu osób w Meksyku (14). Ostatnio kilka przypadków choroby zanotowano latem 2007 r. w Arizonie, Teksasie i na Florydzie – w tradycyjnie gorących obszarach USA (według danych:

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2008). Wykrycie ameby w 2010 r. u pacjenta z PAM na terenie Minnesoty znacznie przesunęło na północ obszar występowania *N. fowleri* (12). Poza obszarem Stanów Zjednoczonych pojedyncze przypadki PAM wywoływanego przez *N. fowleri* notowano w południowych Indiach (38) i Pakistanie, ostatnio natomiast na Tajwanie oraz w Iranie (24, 35, 44). W Europie wykryto ją w 2004 r. we Włoszech (6).

### Pierwotniaki i ich występowanie

*N. fowleri* jest termofilną, wolno żyjącą amebą stwierdzaną na całym świecie (należy do podkrólestwa *Percolozoa*, klasy *Heterolobosea*, rzędu *Schizopyrenida*, rodziny *Vahlkampfiidae*, rodzaju *Naegleria*) (21). Najlepiej rozwija się w ciepłej wodzie. Z 23 badanych szczepów *N. fowleri* pięć może przeżywać w wodzie o temperaturze 32-46°C (1), natomiast niektóre z nich przez krótszy okres mogą wytrzymać temperaturę wyższą (14). Wraz z obniżaniem się temperatury jej szanse na przeżycie maleją. Nie zmienia to faktu, że wykrywano ją w próbkach wody o temperaturze 22,1-24,5°C (12). Amebę stwierdzano w naturalnych zbiornikach wodnych – jeziorach i rzekach oraz ich sedymencie, w ciepłych ciekach wody używanej do celów przemysłowych lub wydostających się z elektrowni (11, 15, 19, 43, 45). Występuje także w naturalnych źródłach termalnych, gejzerach w parku Yellowstone i Grand Teton oraz w niedostatecznie chlorowanych basenach rekreacyjnych czy wodach używanych do kąpieli w balneoterapii (21, 37, 50). Co interesujące, nigdy nie stwierdzano jej w słonych wodach oceanu. W Meksyku największy stopień kontaminacji *N. fowleri* w wodzie stwierdzano w miesiącach najcieplejszych, tj. w okresie sierpień-październik (15). W Pakistanie na 52 próbki wody pitnej w 30% stwierdzano *Acanthamoeba* spp., w 8% – *N. fowleri*, natomiast nie stwierdzano *Balamuthia mandrillaris* (51). W próbkach wody powierzchniowej *N. fowleri* była wykrywana w 67% (27). W latach 1999-2000 w USA jej obecność wykazano także w 6,8% próbek pobranych z 59 ujęć wody używanej do celów rekreacyjnych, na obszarach, gdzie stwierdzano wcześniej występowanie przypadków PAM (17). Podobnie amebę stwierdzano w 26,6% próbek wody gruntowej z miejsc, w których notowano przypadki PAM u dzieci na terenie stanów Arizona i Illinois (miasto Peoria) (16).

*N. fowleri*, a także inne pierwotniaki, takie jak: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* są posiadającymi mitochondria, wolno żyjącymi eukariotycznymi amebami określonymi jako przyczyna zarażenia centralnego układu nerwowego (CNS) u ludzi i zwierząt (47). Liczne gatunki *Acanthamoeba* należące do wielu różnych genotypów wywołują podstępą i przewlekłą chorobę – ziarniniakowe amebowe zapalenie mózgu (granulomatous amebic encephalitis, GAE), głównie u żywicieli o osłabionym statusie immunologicznym, nie wyłączając osób zakażonych HIV/AIDS. *Acanthamoeba* spp., należące głównie do grupy 2, powodują

także zapalenie rogówki u ludzi (zapalenie rogówki akantamebowe). *Acanthamoeba*, podobnie jak inne wolno żyjące ameby, takie jak *Balamuthia* i *Sappinia* mogą być przyczyną zapalenia mózgu i opon mózgowych u ludzi (28). *B. mandrillaris* wywołuje GAE zarówno u osób bardzo młodych, jak i starych, o obniżonym statusie immunologicznym oraz u immunokompetentnych żywicieli. Zarówno *Acanthamoeba* spp., jak i *B. mandrillaris* mogą być także przyczyną uogólnionej choroby, obejmującej płuca, skórę, kości i macicę. *N. fowleri*, wywołuje ostrą martwicową inwazję CNS (PAM) u osób młodych oraz dzieci mających w nieodległej przeszłości kontakt z zanieczyszczoną, gorącą wodą. Przyczyną pojedynczych przypadków *meningoencephalitis* może być dodatkowo inna wolno żyjąca ameba *Sappinia pedata*, wcześniej opisywana jako *Sappinia diploidea* (47).

### Ryzyko inwazji pierwotniaka a rozwój PAM u ludzi

Uwzględniając niebezpieczeństwo związane z zarażeniem amebami Centrum Zwalczenia i Zapobiegania Chorobom (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) w USA stworzyło w 1978 r. Narodowe Laboratorium ds. Wolno Żyjących Ameb (National Free-living Ameba (FLA) Laboratory), które stało się narodowym i światowym liderem w diagnostyce i doradztwie klinicznym. Diagnostyka i monitoruje większość przypadków zarażeń *Naegleria*, *Balamuthia mandrillaris*, *Acanthamoeba*, i *Sappinia*, stąd m.in. wiadomo, że ryzyko inwazji *N. fowleri* jest bardzo niskie. Nie istnieją dane szacujące rzeczywiste ryzyko zachorowań. Jeśli chodzi o ludzi, to w USA na ponad 100 milionów przypadków kąpiących się osób rocznie notuje się od 0 do 8 przypadków inwazji pasożyta (3). Niezwykle rzadkie występowanie PAM utrudnia szersze badanie epidemiologiczne; nie wiadomo m.in., dlaczego niektórzy ludzie ulegają zarażeniu amebami, podczas gdy miliony innych, korzystających z kąpielisk rekreacyjnych w ciepłych regionach świata, są na zarażenie oporni. Nie wiadomo także jaki stopień kontaminacji środowiska *N. fowleri* w środowisku wodnym stwarza ryzyko zachorowania.

Do zarażenia dochodzi drogą nosową w czasie kąpieli w zanieczyszczonym zbiorniku wodnym (m.in. gorących źródłach) (3). U ludzi pierwsze symptomy PAM występują średnio około 5 dnia po inwazji pierwotniaka (od 1 do 7 dni). Wstępne objawy mogą obejmować bóle głowy, gorączkę, nudności lub wymioty. Później pojawiać się mogą: sztywnienie karku, otępienie, utrata równowagi, ataki szału i halucynacje. Z momentem pojawienia się pierwszych symptomów choroby, postępuje ona gwałtownie i zwykle w ciągu 5 dni kończy się śmiercią (zakres od 1 do 12 dni).

### Zakażenia pierwotniacze u zwierząt

Przypadki choroby u zwierząt są do tej pory zdecydowanie rzadsze niż u ludzi. Na terenie ogrodu zoologicznego w San Diego w latach 1965-1994 u gibbonów, goryli, mandryli i małpek Kikuyu (*Colobus guereza kikuyuensis*), dotkniętych zapaleniem opon mózgowych

i mózgu, stwierdzono obecność przeciwciał *N. fowleri* (31). U części z nich występowało podostre oraz ostre martwicowe, pierwotniacze zapalenie mózgu i opon mózgowych z krótkim przebiegiem klinicznym, u pozostałych – amebowe zapalenie opon mózgowych i mózgu z ziarniniakowymi zmianami zapalnymi, zwłóknieniami oraz długim przebiegiem klinicznym. Ameby wyizolowano w 11 z 27 próbek wody. W żadnym z przypadków nie wyizolowano pierwotniaków *N. fowleri*, stwierdzano natomiast obecność *B. mandrillaris* (31).

U zwierząt kopytnych ekspozycja na zarażenie amebą wzrasta głównie na obszarach, gdzie osobniki mają dostęp do zanieczyszczonej, gorącej, stojącej wody, chociaż choroba może także być efektem kontaktu z nagrzaną słońcem warstwą wód naturalnych i zbiorników sztucznych (29). W 1998 r. i 1999 r. w Kalifornii opisywano przypadki wieloogniskowego martwiczo-ropnego krwotocznego zapalenia mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych w próbkach mózgu pozyskanych od dziewięciu 10-20-miesięcznych jałowic. Do zarażeń dochodziło w okresie letnim, kiedy temperatury powietrza wynosiły 42°C (7, 48). Mimo że badanych próbkach wody pitnej nie stwierdzono obecności *N. fowleri*, to możliwość zarażenia zwierząt w wyniku kontaktu z zanieczyszczoną wodą wydaje się najbardziej prawdopodobna. Pierwszy przypadek zapalenia mózgu u krowy podejrzanego o wściekliznę, a wywołanego inwazją *N. fowleri* notowano na Costa Rica w 2006 r. (25). Podobny przypadek obserwowano u 10-miesięcznej jałowicy w północnej Brazylii (29). Na początku lat 90. ubiegłego wieku PAM stwierdzono w Teksasie u półtorarocznego tryka rasy suffolk (9). Chorobę zarejestrowano w organizmie u południowoamerykańskiego tapira (18). Dowiedziano także, że eksperymentalnie zarażenie *N. fowleri* może być indukowane u myszy, używanych jako organizm modelowy w badaniach nad amebami (10).

Szersze badania laboratoryjne dotyczące występowania przeciwciał skierowanych przeciw *Acanthamoeba culbertsoni* i *N. fowleri* u bydła i świń przeprowadzono w Czechach. Ocenie poddano 1218 próbek krwi. Spośród 535 próbek krwi bydła pozytywnie reagowało 1,5%, głównie z antygenem *A. culbertsoni*. Spośród 411 próbek krwi pozyskanych od świń 12% posiadało antygeny *A. culbertsoni* lub *N. fowleri*. W jednej z ferm przemysłowych odsetek wyników dodatnich wynosił aż 32,2%, miano przeciwciał jednak nigdy nie przekraczało 1 : 320 (4).

U eksperymentalnie zarażonych owiec, z wykorzystaniem szczepów izolowanych od ludzi, śmierć następowała w ciągu 7 dni. W wyniku choroby dochodziło do rozmiękczenia płatów węchowych. W badaniach histologicznych wykazywano ropiejące zapalenie opony miękkiej i pajęczynówki oraz martwicę krwotoczną w płatach węchowych. W parenchymie mózgu stwierdzano ameby w dwóch stadiach rozwojowych. Pierwotniaki były zwykle rozproszone w obszarach objętych martwicą, w szczególności w okolicach okołonaczyniowych. Obserwowano zapalenie naczyń krwionośnych. Limfocytarne nacieki okołonaczyniowe

widoczne były w mózgu, mózdzku, moście, rdzeniu przedłużonym oraz w części szyjnej rdzenia kręgowego. Trofozoity były stosunkowo duże, ich rozmiary wynosiły od 15 do 35 µm i znajdowały się w wakuolach cytoplazmy komórek mózgu (9). Badania z zastosowaniem mikroskopu elektronowego ukazały trofozoity wyłącznie w płatach węchowych. Ameby posiadały centralnie ułożone jądro z wyraźnym jąderkiem o wyższej gęstości elektronowej. Cytoplazma wykazywała figury mielinowe, wakuole podobne do wakuol tłuszczowych, otwarte pęcherzyki, „elektronowo” gęste ziarnistości, mitochondria, liczne wolne rybosomy, niewielką ilość szorstkiego retikulum endoplazmatycznego i – niekiedy – sfagocytowane erythrocyty. Trofozoity były zgromadzone blisko tętniczek lub sfagocytowane wewnątrz makrofagów, neutrofilii i komórek śródbłonna (39).

U bydła objawy choroby w dużym stopniu przypominają objawy wścieklizny (25). Do zarażeń dochodzi w wyniku kontaktu błony śluzowej nosa z wodą zanieczyszczoną *N. fowleri*, skąd poprzez wypustki komórek węchowych następuje migracja ameby przez blaszkę sitową kości sitowej do mózgu (5, 20). Nie stwierdzono przypadków transmisji ameby z osobnika chorego na zdrowego. Zapaleniu opon mózgowych i mózgu towarzyszą postępujące objawy neurologiczne. Badanie sekcyjne wykazało zgrubienie opon mózgowych i wieloogniskowe pola rozmiękania w okolicy wzgórza (*thalamus*), wzgórków donosowych i doogonowych, w korze płata ciemieniowego i potylicznego oraz w mózdzku. Histologicznie stwierdzano wieloogniskowe martwicowo-ropne zapalenie opon mózgowych i mózgu, powiązane z obszarami rozmiękania zawierającymi trofozoity ameb. Badanie immunohistochemiczne mózgu w kierunku *N. fowleri* także potwierdziło wynik dodatni (29).

### Diagnostyka

Diagnostyka choroby jest trudna. Polega na wykrywaniu obecności ameby w preparatach bezpośrednich, trwałych, barwionych (pobieranych głównie z płynu mózgowo-rdzeniowego) bądź dopiero w próbkach pozyskanych podczas badania autopsyjnego. W opisanych przypadkach płyn mózgowo-rdzeniowy miał barwę żółtobiałą bądź szarą, był mętny, podbarwiony krwią, ze zwiększonym odsetkiem granulocytów i białek. W przypadku materiału pobranego z oka w celu identyfikacji gatunku ameby (*Acanthamoeba keratitis*), odpowiedzialnej za wywołanie pełzakowatego zapalenia rogówki, z powodzeniem wykorzystuje się barwienie immunofluorescencyjne oraz mikroskopię konfokalną (34).

Natomiast rzadkość występowania *N. fowleri* oraz szybki przebieg choroby (PAM) często uniemożliwiają skuteczne rozpoznanie. Ponadto próby diagnozy są często obarczone błędem ze względu na mało specyficzne różnice pomiędzy PAM a zapaleniem opon mózgowych o podłożu bakteryjnym (34). Przyżyciowe rozpoznanie za pomocą mikroskopii świetlnej możliwe jest na podstawie analizy płynu mózgowo-rdzeniowego (CSF), pobranego poprzez nakłucie lędźwiowego odcinka kręgosłupa. W pozyskanym płynie, zawieszonym

w roztworze soli fizjologicznej obserwować można *N. fowleri*, które mogą zostać utrwalone za pomocą barwnika Giemsa-Wright lub barwienia hematoksyliną i eozyną (22, 23).

Laboratorium FLA opracowało specyficzne przeciwciała skierowane przeciwko *N. fowleri* używane do testu immunofluorescencji pośredniej (indirect fluorescence antibody test, IFA). Test ten stał się „złotym standardem” w wykrywaniu ameby ([www.cdc.gov/parasites/naegleria/general.html](http://www.cdc.gov/parasites/naegleria/general.html)). CDC – *Naegleria fowleri* – general information). Za pomocą specyficznych przeciwciał poliklonalnych produkowanych w króliku oraz monoklonalnych – koniugowanych z odpowiednimi barwnikami fluorescencyjnymi – możliwe stało się wykrycie w pobranych fragmentach tkanek oraz w płynie mózgowo-rdzeniowym chorobotwórczych ameb (23, 41, 42). FLA opracowało także certyfikowaną przez CLIA reakcję PCR, jednocześnie wykrywającą w próbkach klinicznych DNA następujących gatunków: *Naegleria*, *Balamuthia* i *Acanthamoeba*. Reakcja ta uważana jest obecnie za odpowiednik „złotego standardu”, testu IFA ([www.cdc.gov/parasites/naegleria/general.html](http://www.cdc.gov/parasites/naegleria/general.html)). CDC – *Naegleria fowleri* – general information).

Do diagnozowania zarażeń *N. fowleri* odpowiedni okazał się również dostępny komercyjnie test ELISA. Opiera się on na wykorzystaniu przeciwciała monoklonalnego (5D12), które rozpoznaje epitop ameby. Przeciwciała to może być używane do rozróżniania *N. fowleri* spośród innych gatunków z rodzaju *Naegleria*, zarówno w próbkach pozyskanych z środowiska wodnego, jak i w badanych tkankach (32).

Pozyskany podczas biopsji płyn mózgowo-rdzeniowy lub fragmenty tkanki mózgowej można także poddać hodowli w warunkach *in vitro*. W tym celu płyn nanieiony zostaje na przygotowaną hodowlę komórkową np. fibroblastów i inkubowany w temperaturze 37°C, w obecności antybiotyków penicyliny-streptomycyny. Obecne w pobranej próbce ameby ulegają namnożeniu, niszcząc w przeciągu 24-48 godzin kolejno monowarstwę hodowanych komórek. Natomiast fragmenty tkanki mózgowej umieszczane są na 1,5% agarze, pokrytym warstwą hodowli bakteryjnej (np. *E. coli*) i poddawane inkubacji. W trakcie hodowli ameba przybiera postać ruchliwą, opuszcza tkankę, spożywa bakterie i ulega podziałom. Ameby w trakcie analiz można obserwować na agarze za pomocą odwróconego mikroskopu świetlnego.

Do wykrycia pierwotniaków z rodzaju *Naegleria* z powodzeniem stosuje się techniki PCR i PCR w czasie rzeczywistym (RQ-PCR) (33). Te badania w sposób ilościowy i jakościowy identyfikują obecność ameb zarówno w próbkach pozyskanych z zarażonych organizmów, jak i ze środowiska wodnego (20, 30, 34). W analizach metodą PCR wykorzystuje się sekwencje starterowe komplementarne do rejonu 5.8S rDNA otoczonego przez niekodujące sekwencje flankujące ITS1, ITS2, którego sekwencja jest gatunkowo specyficzna dla poszczególnych ameb. Test PCR pozwala na równoczesne

rozróżnienie kilku gatunków *Naegleria*, a tym samym specyficzne wykrycie *N. fowleri*, zarówno w świeżej, jak również w zatopionej w formalinie tkance mózgu (30, 36). Ostatnio informowano o możliwości skutecznej analizy amplikonu ITS w celu określenia występowania nawet siedmiu, ciepłolubnych ameb z rodzaju *Naegleria* za pomocą czułych metod RQ-PCR i analizy krzywych topnienia (*melting-cuves analysis*) stosując barwnik SYTO9 (33). Opracowano także szybki i czuły multiplex testu RQ-PCR oparty o wykorzystanie sond typu TaqMan, umożliwiając jednoczesne wykrycie w próbce gatunków *Acanthamoeba spp.*, *B. mandrillaris* oraz *N. fowleri*. (30). Przytoczone analizy cechowała wysoka czułość, umożliwiającą ujawnienie już pojedynczego osobnika w badanej próbce.

### Leczenie

Dotychczas nie opracowano jeszcze skutecznego sposobu leczenia. Większość zachorowań na negleriozę kończy się śmiercią, a chorzy umierają krótko po wystąpieniu objawów choroby. W leczeniu PAM u ludzi, zwłaszcza we wczesnych stadiach choroby skuteczne może być dożylne podawanie deksametazonu, amfoterycyny B, flukonazolu oraz doustnie rifamycyny (46). Z badań przeprowadzonych zarówno *in vitro* i *in vivo* wynika, że alternatywą dla nie zawsze bezpiecznej amfoterycyny B może być rokitamycyna (13). Donoszono także o dotchawicznym podawaniu antybiotyków. Podanie deksametazonu powinno łagodzić obrzęk mózgu, główną przyczynę śmierci w przypadku PAM. Z kolei w modelu badań przeprowadzonych na zwierzętach, azitromycyna i minocyklina wydają się mieć synergistyczne działanie z amfoterycyną w zwalczaniu ameby (2).

### Podsumowanie

Opinie dotyczące dynamiki zachorowań z powodu inwazji pierwotniaków są niejednomyślne. Z danych amerykańskich wynika, że częstość zarażeń *N. fowleri* w USA na przestrzeni ostatnich 50 lat jest u ludzi praktycznie niezmienna ([www.cdc.gov/parasites/naegleria/general.html](http://www.cdc.gov/parasites/naegleria/general.html)). CDC – *Naegleria fowleri* – general information). Podobnie, analogiczne inwazje pasożyta u zwierząt należą do rzadkości. Część światowych autorytetów wyraża opinię, że wskutek globalnego ocieplenia liczba przypadków chorób wywoływanych u ludzi przez patogeny pierwotniacze wzrosła znacznie podczas ostatnich dwóch-trzech dekad (28). W takim ujęciu wydaje się, że poszukiwanie nowych systemów szczegółowej i szybkiej diagnostyki tych rzadkich, lecz śmiertelnych zagrożeń jest w pełni uzasadnione.

### Piśmiennictwo

1. Akao S., Nishiyama M., Ichiki Y.: *Naegleria*: observations on its distribution in east Asia and South America, and electron microscopic studies on cultured trophozoites. Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiologie. Hygiene. A. 1984, 256, 273-279.
2. Alisky J. M.: Survival of *Naegleria fowleri* primary amebic meningoencephalitis (PAM) could be improved with an intensive multi-route chemo- and biotherapeutic regimen. Med. Hypotheses. 2008, 71, 969-971.

3. Cabanes P. A., 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, 2927-2931.
4. Cerva L.: Spontaneous occurrence of antibodies against pathogenic amoebae of the limax group in domestic animals. Folia Parasitol (Praha) 1981, 28, 105-108.
5. Chang S. L., Chang S. L.: Resistance of pathogenic *Naegleria* to some common physical and chemical agent. Appl. Environ. Microbiol. 1978, 35, 368-375.
6. Cogo P. E., Scagli M., Gatti S., Rossetti F., Alaggio R., Laverda A. M., Zhou L., Xiao L., Visvesvara G. S.: Fatal *Naegleria fowleri* meningoencephalitis, Italy. Emerg. Infect. Dis. 2004, 10, 1835-1837.
7. Daft B. M., Visvesvara G. S., Read D. H., Kinde H., Uzal F. A., Manzer M. D.: Seasonal meningoencephalitis in Holstein cattle caused by *Naegleria fowleri*. J. Vet. Diagn. Invest. 2005, 17, 605-609.
8. Dos Santos Neto G.: Fatal primary amoebic meningoencephalitis. A retrospective study in Richmond, Virginia. Am. J. Clin. Pathol. 1970, 54, 737-742.
9. Fuentealba I. C., Wikse S. E., Read W. K., Edwards J. F., Visvesvara G. S.: Amebic meningoencephalitis in a sheep. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1992, 200, 363-365.
10. John D. T., Nussbaum S. L.: *Naegleria fowleri* infection acquired by mice through swimming in amoebae-contaminated water. J. Parasitol. 1983, 69, 871-874.
11. Kasprzak W., Mazur T., Cerva L.: *Naegleria fowleri* in thermally polluted waters. Folia Parasitol (Praha) 1982, 29, 211-218.
12. Kemble S. K., Lynfield R., DeVries A. S., Drehner D. M., Pomputius W. F. 3<sup>rd</sup>, Beach M. J., Visvesvara G. S., da Silva A. J., Hill V. R., Yoder J. S., Xiao L., Smith K. E., Danila R.: Fatal *Naegleria fowleri* infection acquired in Minnesota: possible expanded range of a deadly thermophilic organism. Clin. Infect. Dis. 2012, 54, 805-809.
13. Kim J. H., Lee Y. J., Sohn H. J., Song K. J., Kwon D., Kwon M. H., Im K. I., Shin H. J.: Therapeutic effect of rokitamycin in vitro and on experimental meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. Int. J. Antimicrob. Agents 2008, 32, 411-417.
14. Lares-Villa F., De Jonckheere J. F., De Moura H., Rechi-Irurettagoyena A., Ferreira-Guerrero E., Fernandez-Quintanilla G., Ruiz-Matus C., Visvesvara G. S.: Five cases of primary amoebic meningoencephalitis in Mexicali, Mexico: study of the isolates. J. Clin. Microbiol. 1993, 31, 685-688.
15. Lares-Villa F., Hernández-Peña C.: Concentration of *Naegleria fowleri* in natural waters used for recreational purposes in Sonora, Mexico (November 2007-October 2008). Exp. Parasitol. 2010, 126, 33-36.
16. Laseke I., Korte J., Lamendella R., Kaneshiro E. S., Marciano-Cabral F., Oerther D. B.: Identification of *Naegleria fowleri* in warm ground water aquifers. J. Environ. Qual. 2009, 30, 147-153.
17. Lee S. H., Levy D. A., Craun G. F., Beach M. J., Calderon R. L.: Surveillance for waterborne-disease outbreaks – United States, 1999-2000. MMWR Surveill. Summ. 2002, 22, 511-547.
18. Lozano-Alarcón F., Bradley G. A., Houser B. S., Visvesvara G. S.: Primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri* in a South American tapir. Vet. Pathol. 1997, 34, 239-243.
19. Maclean R. C., Richardson D. J., LePardo R., Marciano-Cabral F.: The identification of *Naegleria fowleri* from water and soil samples by nested PCR. Parasitol. Res. 2004, 93, 211-217.
20. Marciano-Cabral F., Cabral G.: The immune response to *Naegleria fowleri* amoebae and pathogenesis of infection. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2007, 51, 243-259.
21. Marciano-Cabral F., MacLean R., Mensah A., LaPat-Polasko L.: Identification of *Naegleria fowleri* in domestic water sources by nested PCR. Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69, 5864-5866.
22. Martinez A. J., Visvesvara G. S.: Free-living, amphizoic and opportunistic amoebas. Brain Pathol. 1997, 7, 583-598.
23. Martinez A. J., Visvesvara G. S.: Laboratory diagnosis of pathogenic free-living amoebas: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, and *Leptomyxid*. Clin. Lab. Med. 1991, 111, 861-872.
24. Movahedi Z., Shokrollahi M. R., Aghaali M., Heydari H.: Primary amoebic meningoencephalitis in an Iranian infant. Case Rep. Med. 2012, 2012, Article ID 782854.
25. Morales J. A., Chaves A. J., Visvesvara G. S., Dubey J. P.: *Naegleria fowleri*-associated encephalitis in a cow from Costa Rica. Vet. Parasitol. 2006, 139, 221-223.
26. Nigsch A., Costard S., Jones B. A., Pfeiffer D. U., Wieland B.: Stochastic spatio-temporal modelling of African swine fever spread in the European Union during the high risk period. Prev. Vet. Med. 2013, 108, 262-275.
27. Parija S. C., Giri S.: Emerging protozoal pathogens in India: How prepared are we to face the threat? Trop. Parasitol. 2012, 2, 213-219.
28. Painter S. M., Pfau R. S., Brady J. A., McFarland A. M.: Quantitative assessment of *Naegleria fowleri* and *Escherichia coli* concentrations within a Texas reservoir. J. Water Health 2013, 11, 346-357.
29. Pimentel L. A., Dantas A. F., Uzal F., Riet-Correa F.: Meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri* in cattle of northeast Brazil. Res. Vet. Sci. 2012, 93, 811-812.
30. 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. 2006, 44, 3589-3595.
31. Rideout B. A., Gardiner C. H., Stalis I. H., Zuba J. R., Hadfield T., Visvesvara G. S.: Fatal infections with *Balamuthia mandrillaris* (a free-living amoeba) in gorillas and other Old World primates. Vet. Pathol. 1997, 34, 15-22.
32. Reveiller F. L., Varenne M. P., Pournard C., Cabanes P. A., Pringuez E., Pourima B., Legastelois S., Pernin P.: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the identification of *Naegleria fowleri* in environmental water samples. J. Eukaryot. Microbiol. 2003, 50, 109-113.
33. Robinson B. S., Monis P. T., Dobson P. J.: Rapid, sensitive, and discriminating identification of *Naegleria* spp. by real-time PCR and melting-curve analysis. Appl. Environ. Microbiol. 2006, 72, 5857-5863.
34. Rocha-Azevedo B. da, Tanowitz H. B., Marciano-Cabral F.: Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae. Interdiscip. Perspect. Infect. Dis. 2009, 251-406.
35. Saleem T., Rabbani M., Jamil B.: Primary amoebic meningoencephalitis: two new cases from Pakistan. Trop. Doct. 2009, 39, 242-243.
36. Schild M., Gianinazzi C., Gottstein B., Muller N.: PCR-based diagnosis of *Naegleria* sp. infection in formalin-fixed and paraffin-embedded brain sections. J. Clin. Microbiol. 2007, 45, 564-567.
37. Sheehan K. B., Fagg J. A., Ferris M. J., Henson J. M.: PCR detection and analysis of the free-living amoeba *Naegleria* in hot springs in Yellowstone and Grand Teton National Parks. Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69, 5914-5918.
38. Shenoy S., Wilson G., Prashanth H. V., Vidyakshmi K., Dhanashree B., Bharath R.: Primary meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*: first reported case from Mangalore, South India. J. Clin. Microbiol. 2002, 40, 309-310.
39. Simpson C. F., Willaert E., Neal F. C., Stevens A. R., Young M. D.: Experimental *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in sheep: light and electron microscopic studies. Am. J. Vet. Res. 1982, 43, 154-157.
40. Soike D., Schulze C., Kutzer P., Ewert B., van der Grinten E., Schliephake A., Ewers C., Bethe A., Rau J.: Akute Pasterellosis bei Damwild, Rindern und Schwein in einer Region in Osten Deutschland. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 2012, 125, 122-128.
41. Sparagano O.: Detection of *Naegleria fowleri* cysts in environmental samples by using a DNA probe. FEMS Microbiol. Lett. 1993, 112, 349-351.
42. Sparagano O., Drouet E., Brebant R., Manet E., Denoyel G.-A., Pernin P.: Use of monoclonal antibodies to distinguish pathogenic *Naegleria fowleri* (cysts, trophozoites, or flagellate forms) from other *Naegleria* species. J. Clin. Microbiol. 1993, 31, 2758-2763.
43. Stevens A. R., Tyndall R. L., Coutant C. C., Willaert E.: Isolation of the etiological agent of primary amoebic meningoencephalitis from artificially heated Walters. Appl. Environ. Microbiol. 1977, 34, 701-705.
44. Su M. Y., Lee M. S., Shyu L. Y., Lin W. C., Hsiao P. C., Wang C. P., Ji D. D., Chen K. M., Lai S. C.: A fatal case of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in Taiwan. Korean J. Parasitol. 2013, 51, 203-206.
45. Sykora J. K., Keleti G., Martinez A. J.: Occurrence and pathogenicity of *Naegleria fowleri* in artificially heated waters. Appl. Environ. Microbiol. 1983, 45, 974-979.
46. Vargas-Zepeda J., Gómez-Alcalá A. V., Vásquez-Morales J. A., Licea-Amaya L., De Jonckheere J. F., Lares-Villa F.: Successful treatment of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis by using intravenous amphotericin B, fluconazole and rifampicin. Arch. Med. Res. 2005, 36, 83-86.
47. Visvesvara G. S.: Infections with free-living amoebae. Handb. Clin. Neurol. 2013, 114, 153-168.
48. Visvesvara G. S., De Jonckheere J. F., Sriram R., Daft B.: Isolation and molecular typing of *Naegleria fowleri* from the brain of a cow that died of primary amoebic meningoencephalitis. J. Clin. Microbiol. 2005, 43, 4203-4204.
49. Wernike K., Hoffmann B., Beer M.: Schmallenberg virus. Dev. Biol. (Basel) 2013, 135, 175-182.
50. Yoder J. S., Eddy B. A., Visvesvara G. S., Capewell L., Beach M. J.: The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in the USA, 1962-2008. Epidemiol. Infect. 2010, 138, 968-975.
51. Yousuf F. A., Siddiqui R., Subhani F., Khan N. A.: Status of free-living amoebae (*Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*) in drinking water supplies in Karachi, Pakistan. J. Water Health 2013, 11, 371-375.
52. Zbikowska E., Walczak M., Krawiec A.: Distribution of *Legionella pneumophila* bacteria and *Naegleria* and *Hartmannella* amoebae in thermal saline baths used in balneotherapy. Parasitol. Res. 2013, 112, 77-83.