

Anna C. MAJEWSKA

KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII I PARAZYTOLOGII LEKARSKIEJ  
UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO  
W POZNANIU

## **NAEGLERIA FOWLERI – MAŁY I SKUTECZNY ZABÓJCA W WODZIE**

### **NAEGLERIA FOWLERI – A SMALL AND EFFECTIVE WATER-BORNE KILLER**

*Many Naegleria species occur in nature, but *N. fowleri* is the only species in its genus that is parasitic to both humans and animals. Infection with *N. fowleri* causes acute primary amoebic meningoencephalitis (PAM) that is usually fatal within days.*

**N. fowleri* is a very small (10-25 µm) free-living amoeba occurring in natural and artificial fresh water environments. *N. fowleri* has three stages in its simple life cycle: cysts, trophozoites, and flagellated forms. The trophozoite (amoeboid form) feeds on bacteria and organic matter and undergoes replication. Trophozoites can transform into transitory non-feeding flagellated forms which usually covert back to the trophozoite stage. Cysts are resistant to external environmental factors.*

**N. fowleri* is a thermophilic organism, tolerating water temperatures up to 45°C. *N. fowleri* has been isolated worldwide from fresh water such as lakes, rivers, ponds, thermal discharges of power plants, geothermal wells, hot springs, poorly maintained or minimally chlorinated swimming pools, tap water distribution systems, and soil. PAM cases were typically reported during the hot summer months, mainly in young people who swam in lakes, rivers, pools or geothermal springs just prior to exhibiting symptoms. Numerous cases on infection were tied to the use of water from drinking-water distribution systems in order to fill pools or use slip-n-slides, submerging the head underwater during baths, taking showers, irrigating the sinuses with devices such as the neti pot, daily rinsing of the nose, or ablution. Infection in humans and animals transpires once the *N. fowleri* trophozoites enter the nasal cavity. The trophozoites then colonize the nasal epithelium and migrate along the olfactory nerve to the brain, causing extensive haemorrhaging and necrosis. This is the reason for the popular moniker “the brain-eating amoeba”. Infection in humans and animals results from water containing *N. fowleri* entering the nasal cavity.*

*Symptoms of infection (including headache, stiff neck, fever, anorexia, vomiting, altered mental state, photophobia, hallucinations, coma) occur within 1 to 7 days. The median time from symptom onset to death is typically 5 days. PAM cases are difficult to diagnose because the disease is fulminant and symptoms are similar to bacterial meningitis. Thus, the determination of cause of death is usually post-mortem. So far, almost all reported PAM cases have been fatal. It had been thought in the past that infection is relatively rare, and between 1965 (the first reported case of PAM) and 2014, roughly a few hundred have been reported globally, mainly in the U.S., Australia, and Europe. However, it is believed that many incidents of PAM infection goes undiagnosed, particularly in developing countries, due to the inability to perform autopsies and/or the lack of autopsy consent from the family of the deceased. Moreover, the number of diagnosed PAM cases is rising each year, which is undoubtedly due to global warming.*

*N. fowleri infection has also been reported in animals; various species of rodents, sheep, and monkeys were susceptible to experimental infection, and natural and fatal PAM cases were documented in the South American tapir and cattle. This indicates the need for the differential diagnosis of diseases of the nervous system of animals.*

## 1. Wprowadzenie

Spośród ponad 40 gatunków z rodzaju *Naegleria*, tylko jeden gatunek - *N. fowleri* - jest pasożytem ludzi i niektórych gatunków zwierząt [25]. Pierwszy, dokładny opis wraz z rycinami cysty, trofozoitu i postaci wiciowej tych pełzaków pochodzi z końca XIX wieku. Wówczas to, Franz Schardinger [64] opublikował pracę dotyczącą pełzaków, które przekształcają się w postaci wiciowej i nazwał ten gatunek *Amoeba gruberi*; opis gatunku i załączone ryciny odpowiadają *N. fowleri*. Jednak rodzaj *Naegleria* został utworzony przez Alexeieffa dopiero w 1912 roku [1] i przez pół wieku uważano te pełzaki za nieszkodliwe i mało interesujące organizmy, które są obecne w środowisku zewnętrznym. Dopiero 60 lat temu odkryto, że pierwotnie wolno żyjące pełzaki z rodzaju *Naegleria* mogą wywołać ostrą chorobę ośrodkowego układu nerwowego u ludzi [6, 7, 21, 29]. Chorobie tej nadano nazwę - pierwotne pełzakowe zapalenie opon mózgowych i mózgu (PAM – primary amebic meningoencephalitis) [6]. Wirulentne szczepy *Naegleria* uzyskane z dwóch śmiertelnych przypadków PAM zostały później opisane przez Cartera [10], jako odrębny gatunek *Naegleria fowleri* na cześć Malcolma Fowlera, który był współautorem opisu pierwszych przypadków PAM w Australii. Odtąd zaczęła się nowa era badań dotyczących pełzaków z rodzaju *Naegleria*. W następnych latach opisano wiele śmiertelnych przypadków pierwotnego pełzakowego zapalenia opon mózgowych i mózgu w wielu krajach na świecie, głównie w USA, Australii, ale także w Anglii i dawnej Czechosłowacji [38]. Niestety, pełzaki jako czynniki etiologiczne śmiertelnych inwazji PAM u ludzi, wykrywano głównie w trakcie badań sekcyjnych. Opisano również przypadki PAM opierając się na starym, utrwalonym materiale sekcyjnym, pochodzącym z 1909 i 1937 roku [72] oraz z 1952 roku [36]. Obecnie, przypadki PAM występują u ludzi na wszystkich kontynentach, z wyjątkiem Antarktydy [24]. Przypadki PAM stwierdzano zazwyczaj w miesiącach letnich, głównie u młodych osób, które krótko przed wystąpieniem objawów pływały w jeziorach, rzekach, basenach lub źródłach z ciepłą wodą.

Nieliczne przypadki zarażenia były związane z wykorzystaniem wody z systemów wody pitnej, co staje się nowym wyzwaniem dla przedsiębiorstw odpowiedzialnych za wodę wodociągową [12, 19, 70, 85]. Tym bardziej, że PAM niemal zawsze kończy się zgonem w ciągu kilku dni, co stanowi poważny problem dla zdrowia publicznego [25]. Stosunkowo od niedawna inwazja *N. fowleri* staje się także istotnym problemem w medycynie weterynaryjnej. Naturalne, śmiertelne przypadki PAM stwierdzono u tapira i bydła [23, 49, 54, 58], co wskazuje na konieczność wprowadzenia diagnostyki różnicowej w chorobach układu nerwowego zwierząt.

## 2. *Naegleria fowleri* – czynnik etiologiczny pierwotnego pełzakowego zapalenie opon mózgowych i mózgu

### 2.1 Budowa i cykl życiowy

*N. fowleri* jest wolno żyjącym, mikroskopijnym pełzakiem, który jednocześnie może być zabójczym pasożytem ludzi i niektórych gatunków zwierząt. Jego cykl rozwojowy jest stosunkowo prosty i obejmuje trzy stadia: trofozoit w formie pełzakowej, cystę, która jest stadium przetrwalnikowym i postać wiciowca. Formy pełzakowe trofozoitów mają zmienny kształt oraz wielkość (od 7-35  $\mu\text{m}$ ) i charakteryzują się szerokimi, najczęściej pojedynczymi, szerokimi pseudopodiami zwanymi lobopodiami. W cytoplazmie znajdują się delikatne ziarnistości, jądro z dużym, centralnym kariosomem, pojedyncza wakuola tętniąca i liczne wakuole trawienne. Formy pełzakowe występują w środowisku zewnętrznym, gdzie odżywiają się bakteriami i inną materią organiczną oraz rozmnażają się przez podział. Okresowo, formy pełzakowe ulegają transformacji do form wiciowych, które są wydłużonymi komórkami, o wielkości 10-16  $\mu\text{m}$ , posiadającymi z reguły dwie wici. Transformacja formy pełzakowej do wiciowej jest stymulowana zmianami w środowisku, takimi jak np. zmniejszenie składników odżywczych czy spadek stężenia elektrolitów [74]. Formy wiciowe podczas krótkiego okresu swobodnego poruszania się, trwającego od kilku minut do jednego dnia, nie odżywiają się i nie rozmnażają się. Konwersja formy wiciowej do pełzakowej jest odwracalna wtedy, gdy wystąpią sprzyjające warunki. Wówczas wici ulegają resorpcji, a komórka zaczyna poruszać się ruchem pełzakowym. Fakt, że wszystkie gatunki *Naegleria* mają zdolność przekształcania się formy pełzakowej w wiciowca sprawia, że należą one do pełzakowiciowców. Trofozoity przekształcają się w cysty, kiedy warunki środowiskowe, takie jak spadek temperatury, zmniejszony dostęp do źródła składników odżywczych lub susza, są nieodpowiednie do kontynuowania odżywiania i wzrostu. Cysty, o średnicy 7-10  $\mu\text{m}$ , są okrągłe, jednojądrzaste, otoczone grubą, podwójną otoczką, w której znajdują się otwory (pory). Cysty są bardzo odporne na działanie niekorzystnych warunków środowiska zewnętrznego, co zwiększa szanse przeżycia *N. fowleri* do czasu wystąpienia sprzyjających warunków środowiskowych [79].

*N. fowleri* jest termofilnym organizmem, zdolnym do rozmnażania i przeżywania w wyższych temperaturach. Najlepszy wzrost tego pełzaka obserwuje się w temperaturze do 46°C [30]. Trofozoity i cysty *N. fowleri* mogą również przetrwać przez kilka minut do godziny w temperaturze 50-65°C, przy czym cysty są bardziej odporne na działanie wysokiej temperatury niż trofozoity [17, 73].

## 2.2 Występowanie w środowisku

Na początku lat 70. ubiegłego wieku w Australii, po raz pierwszy wyizolowano z prób środowiskowych patogeniczne szczepy *Naegleria* [2, 3]; pełzaki te izolowano z gleby oraz wody wodociągowej w domu pacjenta, który zmarł wskutek pierwotnego pełzakowego zapalenia mózgu i opon mózgowych. Warto dodać, że pobierana z rzeki woda nie była filtrowana ani chlorowana i była dostarczana do domu pacjenta rurami leżącymi na powierzchni ziemi na przestrzeni kilkudziesięciu kilometrów. Taki system dystrybucji wody sprawił, iż uległa ona znacznemu podgrzaniu, co sprzyjało namnożeniu pełzaków.

Później, *N. fowleri* izolowano i/lub wykrywano przy pomocy różnorodnych technik badawczych w wielu regionach świata z różnych środowisk, m. in. z: jezior, stawów i rzek, gorących źródeł, zbiorników wodnych skażonych termicznie zrzutami wody z elektrowni i z obiektów przemysłowych, ciepłej wody gruntowej, źle utrzymanych lub minimalnie chlorowanych basenów pływackich, basenów do hydroterapii, akwariów, ścieków i co najważniejsze – również z systemów wody pitnej i podgrzewaczy wody [5, 14, 26, 28, 33, 35, 41, 42, 46, 50, 52, 68, 81] oraz z gleby, klimatyzatorów, z kurzu unoszącym się w powietrzu, [47, 51, 78]. Jak dotychczas nie wykryto *N. fowleri* w zbiornikach słoneż wody, takich jak morza i oceany.

Wielu autorów wskazuje, że obecność *N. fowleri* w wodzie wiąże się przede wszystkim z podwyższoną temperaturą i materią organiczną [30, 31, 61]. Innym czynnikiem faworyzującym wzrost *N. fowleri* jest także żelazo i jego związki [45].

## 3. Inwazje *Naegleria fowleri* u ludzi

### 3.1 Możliwości zarażenia

Dalszy tekst referatu. Podwyższona temperatura ma decydujący wpływ na występowanie *N. fowleri* w środowisku, bowiem w takich warunkach zachodzi masowe namnażanie się pełzaków do poziomu, który stanowi istotne zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka. Człowiek zaraża się tylko wtedy, kiedy woda zawierająca trofozoity *N. fowleri* dostanie się do jamy nosowej. Po aspiracji wody do nosa (w trakcie kąpieli lub przepłukiwania jamy nosowej) trofozoity *N. fowleri* kolonizują początkowo śluzówkę jamy nosowej, a następnie migrują wzdłuż nerwów węchowych i poprzez blaszkę sitową wnikają do mózgu, gdzie namnażają się i przyczyniają się do rozległej destrukcji tkanki mózgowej [53, 78]. To też *N. fowleri* popularnie nazywany jest pełzakiem "mózgożernym" (brain-eating amoeba).

Prawdopodobnie, istnieje też możliwość zarażenia się *N. fowleri* przez inhalację kurzu. Opisano trzy śmiertelne przypadki PAM u dzieci z terenu Afryki; autorzy tych prac przypuszczali, że dzieci zarażyły się przez inhalację kurzu podczas harmatanu – suchego i gorącego wiatru wiejącego z nad Sahary [24, 47].

Nie można zarazić się *N. fowleri* pijąc zanieczyszczoną pełzakami wodę. Ponadto, jak dotąd nie wykazano, aby można było zarazić się tym pełzakiem od drugiej osoby. Nie można także zarazić się wskutek transplantacji organów; opisano przypadki przeszczepów narządów od dawców zmarłych z powodu PAM i żaden z biorców organów nie zaraził się *N. fowleri* [4, 44] - chociaż, w późniejszych badaniach stwierdzono występowanie *N. fowleri* poza mózgiem. W badaniach sekcyjnych dwóch pacjentów zmarłych z powodu PAM pełzaki wykryto w skrawkach płuc, nerki, serca, śledziony i tarczycy [62]. Jakkolwiek ryzyko transmisji *N. fowleri* od dawców organów wydaje się być mało prawdopodobne lub nawet zerowe, to jednak transplantolodzy powinni dokładnie rozważyć każdą decyzję przeszczepu narządu(ów) od pacjentów zmarłych z powodu PAM.

### 3.2 Objawy kliniczne i zmiany anatomopatologiczne PAM

Objawy kliniczne PAM pojawiają się niemal tuż po zarażeniu. U większości pacjentów występują silne bóle głowy, wysoka gorączka (39-40°C), brak łaknienia, nudności, wymioty, sztywność karku, rozdrażnienie i niepokój. W późniejszym przebiegu choroby występuje światłowstręt, podwójne widzenie, senność, dezorientacja, halucynacje, drgawki i śpiączka. Choroba ma przebieg gwałtowny. Średni czas od wystąpienia objawów do zgonu wynosi 5 dni. Przyczyną zgonu jest z reguły wysokie ciśnienie wewnątrzczaszkowe i przepuklina mózdzku.

Do typowych zmian anatomopatologicznych w przebiegu PAM należą: zmiany krwotoczno-martwicze w opuszkach węchowych, korze mózgowej (głównie w okolicy czołowej, skroniowej i na podstawie mózgowia i mózdzku), obrzęknięte półkule mózgowe, wzmożone ciśnienie wewnątrzczaszkowe, zaklinowanie migdałka mózdzku [53]. Mikroskopowo, największe zmiany anatomopatologiczne stwierdza się w korowej istocie szarej. Z reguły kora mózgowa wykazuje uogólnioną martwicę wszystkich elementów nerwowych i glejowych. W półkulach mózgowych, mózdzku, pniu mózgu oraz w górnych odcinkach rdzenia kręgowego stwierdza się wysięk włóknistoropny opon miękkih. W wysięku ropnym można wykryć nieliczne trofozoity *N. fowleri*. W układzie nerwowym nie tworzą się cysty *N. fowleri*.

U wielu pacjentów obserwuje się też powikłania PAM, takie jak rozległe zapalenie mięśnia sercowego i ogniskową martwicę włókien mięśnia sercowego [38].

### 3.3 Diagnostyka

Przypadki PAM są trudne do zdiagnozowania, ponieważ choroba postępuje gwałtownie, a kliniczne objawy choroby są podobne do bakteryjnego lub wirusowego zapalenia opon mózgowych. Dotychczas, niemal wszystkie opisane przypadki PAM były śmiertelne, stąd też rozpoznanie przyczyny zgonu jest z reguły w pośmiertne [25]. Ze względu na gwałtowny i śmiertelny przebieg PAM bardzo ważne jest szybkie rozpoznanie pełzaków, aby wdrożyć odpowiednie leczenie. Spośród kilku przypadków przeżycia pierwotnego pełzakowego zapalenia mózgu i opon mózgowych, tylko jeden jest dokładnie udokumentowany; u dziewięcioletniej dziewczynki bardzo szybko zdiagnozowano PAM i od razu dożylnie i dooponowo podano leki przeciwbakteryjne oraz przeciwgrzybicze (amfoterycynę B i mikonazol) oraz doustnie rifampinę. [66].

Diagnostyka PAM opiera się na badaniu osadu płynu mózgowo-rdzeniowego we wczesnym okresie choroby. W świeżych preparatach uzyskanych z osadu płynu mózgowo-rdzeniowego mikroskopowo można zidentyfikować trofozoity *N. fowleri* i czasami postacie wiciowe tego pełzaka. Płyn mózgowo-rdzeniowy nie zawiera bakterii. W celu odróżnienia komórek pełzaka od leukocytów, konieczne jest wykonanie preparatów trwałych, barwionych metodą Giemsy lub trichromem [77]. Dla dopełnienia diagnostyki konieczny jest posiew płynu mózgowo-rdzeniowego na odpowiednie podłoża. Niedawno opracowano protokoły RT-PCR i multiplex PCR w celu identyfikacji DNA *N. fowleri* oraz innych patogenicznych pełzaków – *Acanthamoeba* i *Balamuthia mandrillaris*, które mogą powodować ziarniniakowe zapalenie mózgu [59, 60]. Z reguły wynik badania uzyskuje się w ciągu pięciu godzin. Tak szybkie postawienie diagnozy pozwala na wdrożenie odpowiedniego leczenia i tym samym zwiększenia szansy uratowania życia pacjentowi.

### 3.4 Epidemiologia

Dalszy tekst referatu. Jak wspomniano wcześniej, przypadki PAM u ludzi stwierdzono na wszystkich kontynentach, z wyjątkiem Antarktydy (24, 77). Dotychczas opisano około 300 przypadków zarażenia *N. fowleri*, w tym ponad 40% stwierdzono w U.S.A. [74]. Jest to zaskakujący fakt. Mając na uwadze, że *N. fowleri* jest termofilnym organizmem, to należałoby się spodziewać, że większość przypadków wystąpi u ludzi mieszkających na obszarach tropikalnych. Zatem należy przyjąć, że w krajach strefy tropikalnej przypadki PAM pozostają nierozpoznane wśród milionów przypadków innych chorób, m. in. z powodu słabego dostępu do placówek służby zdrowia i/lub ich wyposażenia oraz braku świadomości lekarzy o istnieniu tych groźnych pełzaków [24]. Uważa się także, że wiele przypadków PAM - szczególnie w krajach rozwijających się - jest nierozpoznanych, ze względu na brak możliwości wykonania sekcji zwłok i/lub brak zgody rodziny zmarłych na przeprowadzenie autopsji [70].

Chociaż PAM wydaje się być rzadką chorobą, to jednak stanowi poważny problem dla zdrowia publicznego, ponieważ niemal wszystkie przypadki PAM kończą się zgonem i z reguły dotyczą młodych i wcześniej zdrowych ludzi. Rzadkie występowanie PAM sprawia, że badania epidemiologiczne są bardzo trudne. Według szacunków ryzyko wystąpienia PAM wynosi 1 na 2.5 mln "wystawień" na kąpiel w zbiornikach z ciepłą wodą. Z reguły przypadki PAM stwierdzano w miesiącach letnich, głównie u młodych osób, z reguły płci męskiej, które krótko przed wystąpieniem objawów pływały w jeziorach, rzekach, basenach lub źródłach z ciepłą wodą. Jednak nie wiadomo, dlaczego niektóre osoby zarażają się *N. fowleri*, podczas gdy tysiące innych osób, pływających w tych samych zbiornikach wody, nie ulega zarażeniu. Próby określenia liczby pełzaków *N. fowleri* w wodzie stanowiących ryzyko zarażenia nie powiodły się i aktualnie nie istnieje metoda, która umożliwi dokładne i powtarzalne stwierdzenie liczby pełzaków w wodzie. Natomiast, w ostatnio przeprowadzonych badaniach wykazano, że bardzo istotnym czynnikiem zanieczyszczenia zbiorników wodnych *N. fowleri* jest nanoszenie i/lub wypłukiwanie pełzaków z terenów otaczających kąpieliska [55].

Stosunkowo nieliczne przypadki zarażenia *N. fowleri* były związane z wykorzystaniem wody wodociągowej do napełniania basenów lub używaniem slip-n-slide, zanurzeniem głowy w wannie, braniem prysznicza, irygacją nosa za pomocą neti pot, rytualnym płukaniem jamy nosowej lub religijnymi praktykami [19, 27, 67, 70, 85]. Śmiertelne przypadki PAM związane z wodą pitną muszą wpłynąć na zmianę poglądu na epidemiologię *N. fowleri*. Stanowią one też potężne i nowe wyzwanie dla przedsiębiorstw odpowiedzialnych za wodę wodociągową.

W różnych częściach naszego globu istnieją odmienne czynniki ryzyka występowania PAM u ludzi. Najwięcej przypadków PAM odnotowano u ludzi w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej. Od 1962 roku do 2014 roku, w USA udokumentowano 133 przypadki PAM [84, 78, <http://www.cdc.gov/parasites/naeGLERIA>]. Zarażenie *N. fowleri* odnotowano we wszystkich grupach wiekowych (od 8 miesięcy do 66 lat), ale 112 przypadków (84%) wystąpiło u dzieci (średnia wieku wynosiła 11 lat). Ponad trzy czwarte zarażeń dotyczyło chłopców i młodych mężczyzn. Dotychczas nie określono, dlaczego w tej grupie wiekowej i u płci męskiej częściej występuje PAM. Uważa się jednak, że u młodych osób kość sitowa jest bardziej porowata, dzięki czemu pełzaki łatwiej przedostają się do mózgu; sugeruje się również, że różnego rodzaju sporty wodne są powszechniej uprawiane przez młodych chłopców. Niemal wszystkie przypadki PAM w USA wystąpiły w południowych stanach, z czego ponad połowa w Teksasie i na Florydzie [84]. W ostatnich latach przypadki PAM udokumentowano także w północnych stanach, m. in. w Minnesocie, Kansas i Wirginii, co prawdopodobnie związane jest z ociepleniem klimatu [43, 84, 85]. W Stanach Zjednoczonych PAM rozprzestrzenia się głównie poprzez uprawianie różnego rodzaju sportów wodnych w ciepłych jeziorach, stawach i rzekach oraz w gorących źródłach [84]. Przypadki PAM związane były również z pływaniem w basenach kąpielowych, rowach i kanałach. Najczęściej przypadki PAM związane były z takim sportami wodnymi jak pływanie, nurkowanie, skoki do wody, pływanie na skuterach i nartach wodnych. Nieliczne przypadki związane były z wykorzystaniem zjeżdżalni wodnych, z ochlapywaniem się wodą lub mułem z kałuż, a także z całkowitym zanurzeniem głowy w wodzie podczas chrztu baptystów [84]. Do zarażenia *N. fowleri* dochodziło głównie w miesiącach letnich (od lipca do września), kiedy temperatura wody była wysoka, a jej poziom niski. Jedynie kilka przypadków zarażeń *N. fowleri* w USA związanych było z użyciem wody z systemów wody pitnej do napełniania przydomowych basenów [52] lub używania slip-n-slide [19], zanurzaniem głowy w wannie [52], irygacją nosa za pomocą neti pot [85] lub ablucją [12]. Nie wiadomo jednak jak dochodzi do skolonizowania systemów dystrybucji wody wodociągowej przez *N. fowleri*. Nie mniej pełzaki te wykrywano w różnych miejscach domowej sieci wodociągowej [52]. Zatem, konieczne są dalsze badania nad wyjaśnieniem jak ten patogen kolonizuje biofilm w systemach dystrybucji wody wodociągowej, aby przygotować przedsiębiorstwa wodociągowe do monitorowania *N. fowleri* w wodzie oraz do opracowania optymalnych strategii dezynfekcji wody.

W Ameryce Południowej i Środkowej przypadki PAM odnotowano tylko w niektórych krajach; dziewięć przypadków w Meksyku [24], siedem w Wenezueli [11] i pięć w Brazylii [63] oraz po jednym przypadku na Kubie i w Gwatemali [20, 56]. Niemal wszystkie przypadki były związane z pływaniem w naturalnych zbiornikach wody powierzchniowej. Natomiast, 9-letni pacjent z Gwadelupy zmarł z powodu PAM po kąpielach w basenie napełnionym wodą geotermalną [56].

W Europie opisano jedynie 24 przypadki PAM [25]. Najwięcej przypadków stwierdzono w dawnej Czechosłowacji, gdzie w latach 1962-1965 zmarło 16 chłopców ze sportowej szkoły pływackiej, którzy pływali w krytym basenie z podgrzewaną wodą w Usti nad Łabą [16]. Wówczas, w wodzie basenu kąpielowego nie wykryto *N. fowleri*. Pełzaki te wykryto dopiero po kilku latach przy okazji naprawy basenu [37]. Wtedy okazało się, że w ścianie basenu był ubytek płytki, w którym pełzaki rozmnażały się w sprzyjających warunkach podwyższonej temperatury wody i były jednocześnie chronione przed działaniem chloru. Pełzaki były wyplukiwane ze szpary w ścianie basenu wskutek podwyższonego poziomu wody, specjalnie przygotowanego dla pływaków sportowych. Ponadto, w okresie, gdy występowały przypadki śmiertelne PAM, wodę w basenie chlorowano sporadycznie. Również w czterech przypadkach PAM w Belgii podejrzewano, że osoby te zarażyły się podczas pływania w dwóch krytych basenach, gdyż ofiary tej śmiertelnej inwazji należały do grupy bardzo aktywnych pływaków [32]. Obecność *N. fowleri* w krytych basenach należy do sytuacji wyjątkowych i jest możliwa tylko w źle utrzymywanych lub minimalnie chlorowanych basenach pływackich. Śmiertelne przypadki PAM wystąpiły również w dawnej Czechosłowacji i Belgii u osób po kąpieli w strumieniu, skażonym termicznie zrzutami wody z obiektów przemysłowych [13, 76], lub w wodzie geotermalnej w Wielkiej Brytanii [9]. Odnotowano także jeden przypadek PAM we Włoszech; 9-letni chłopiec zmarł po kąpieli w rzece podczas wyjątkowo gorącego lata [18]. Oprócz Belgii, Czech, Wielkiej Brytanii i Włoch, nie ma doniesień o zarażeniach *N. fowleri* z innych krajów europejskich, chociaż tego pełzaka wykrywano w środowisku, w tym także i w Polsce. Kasprzak i współpracownicy prowadząc wieloletnie badania w kompleksie zbiorników wodnych, otrzymujących zrzuty ciepłej wody z dwóch elektrowni w Koninie wykazali obecność patogenicznych szczepów *N. fowleri* w układzie wód chłodzących starszą elektrownię oraz w odległej rzece połączonej z kompleksem wód chłodzących. [15, 38, 39, 40, 41, 42]. Ponadto, patogeniczne szczepy *N. fowleri* wykryto także w kondensatorze pary wodnej w starszej elektrowni; autorzy sugerują, że kondensator pary pełnił rolę stałego „inkubatora” dla patogenicznych szczepów, które następnie były rozsiewane poprzez zrzuty ciepłej wody do systemu wód chłodzących, a nawet do odległej rzeki.

W Australii, większość z 19 pacjentów z PAM, zarażyło się podczas kąpieli w wannie lub biorąc prysznic, lub wskutek przepłukiwania jamy nosowej z powodów religijnych, albo też w trakcie pływania w przydomowych basenach napełnianych wodą wodociągową; niemal 75% przypadków PAM wystąpiło w stanie Australia Południowa [27]. Związek między występowaniem przypadków PAM a woda wodociągowa wynika ze specyfiki dostarczania wody pitnej do miast. Nieprzefiltrowana woda ze strumieni lub rzek jest dostarczana rurami prowadzonymi na długich dystansach na powierzchni ziemi, co powoduje jej znaczne nagrzanie przez słońce, a to z kolei tworzy korzystne warunki namnażania *N. fowleri*.

W Nowej Zelandii stwierdzono dziewięć przypadków PAM i wszystkie były związane z pływaniem w basenach z ciepłą wodą [22].



W Azji odnotowano 44 przypadki PAM. Najwięcej, bo 13 przypadków inwazji *N. fowleri* stwierdzono w Pakistanie i wszystkie były związane z wodą wodociągową. Ofiarami PAM byli muzułmanie, w wieku od 16 do 64 lat, którzy zarazili się w trakcie jednego z rodzajów ablucji, polegającej na wciąganiu wody wodociągowej do nosa [67]. Należy jednak podkreślić, że wszystkie przypadki PAM stwierdzono tylko w jednym, małym szpitalu w Karaczi. A przecież zdecydowana większość (ponad 70%) mieszkańców Pakistanu żyje na terenach wiejskich, gdzie ludzie nie mają możliwości korzystania z usług lekarzy lub dostęp do placówek służby zdrowia jest bardzo utrudniony. Latem temperatura powietrza w Pakistanie osiąga 50°C, a temperatura wody wynosi nawet 35°C, co stwarza idealne warunki namnażania *N. fowleri* i jednocześnie sprawia, że ludzie szukają ochłody w pobliskich zbiornikach wodnych. Stąd też sugeruje się, że większość przypadków PAM w Pakistanie pozostaje nierozpoznanych, tym bardziej, że tylko w tym jednym szpitalu rozpoznaje się w ostatnich latach dwadzieścia przypadków PAM rocznie [67].

W Tajlandii odnotowano 12 przypadków PAM i większość z nich wystąpiła po kąpielach w jeziorach i kanałach [82]. Tylko dwa przypadki były związane z zwyczajem pryskania wodą na twarz. Jeden przypadek PAM wystąpił u uczestnika święta wody Songkran Thai, podczas którego ludzie oblewają się wodą. Święto Songkran jest głęboko zakorzenioną tradycją w kulturze Tajów i jest obchodzone w Tajlandii od 13 do 15 kwietnia. Jest to jedno z najważniejszych świąt w tajlandzkim kalendarzu, wywodzi się z sanskrytu i oznacza początek nowego roku słonecznego. W trakcie tego święta istnieje zwyczaj podobny do naszego śmigusa dyngusa, wywodzący się przypuszczalnie z ceremonii wywoływania deszczu. Kolejny ciekawy przypadek zarażenia młodego mężczyzny związany był z pryskaniem wodą święconą przez buddyjskiego mnicha. Wielu Tajów wierzy, że woda święcona ma duchową moc i może przynieść im szczęście. Według wyników badań, większość wody święconej na obszarach wiejskich była zanieczyszczona wieloma bakteriami [57]. Ponadto, obecność *N. fowleri* wykazano w 70% prób wody z 162 badanych prób w Tajlandii [82]. Mając na uwadze fakt, że Tajlandię rocznie odwiedza około 20 milionów turystów z całego świata, istnieje konieczność informowania ich o dużym ryzyku zarażenia *N. fowleri* w trakcie kąpieli w różnego typu zbiornikach wodnych oraz podczas festiwalu Songkran.

W Indiach stwierdzono 11 przypadków PAM, ale trzy z nich są uważane za wątpliwe [24]. Wszystkie osoby pływały wcześniej w stawach, pluskały się w kałużach lub kąpały się w wodzie studziennej. Tak mała liczba przypadków PAM w Indiach jest zapewne wynikiem nie rozpoznania wielu przypadków zarażenia *N. fowleri*. Wystarczy wziąć pod uwagę tylko jedno religijne święto Kumbh Mela, podczas którego miliony pielgrzymów kąpie się w rzece Ganges; według gazety Khaleej Times z 12 marca 2013 rok, w Gangesie kąpało się 120 milionów ludzi w ciągu dwóch miesięcy, a dziennie około 30 milionów. Kąpiel w tak zanieczyszczonej rzece wiąże się z dużym ryzykiem transmisji wielu czynników etiologicznych chorób, w tym również *N. fowleri*.

W Japonii wykryto jeden przypadek PAM, jednak nie stwierdzono jak doszło do zarażenia 25-letniej kobiety [71]. Po jednym przypadku PAM stwierdzono w Chinach i na Tajwanie [75, 80]. W obu przypadkach przyczyną zarażenia była wcześniejsza kąpiel w wodzie geotermalnej.

Najmniej przypadków PAM opisano w Afryce [24]. W Nigerii stwierdzono cztery przypadki, z których jeden dotyczył 35-letniego rolnika, który aby dokonać ablucji wciągał wodę do nosa [48]; natomiast trzy pozostałe przypadki PAM wystąpiły u dzieci w wieku ośmiu i dziewięciu miesięcy oraz czterech lat [24, 38]. Te dzieci nie miały kontaktu z wodą, stąd też sugerowano, że zaraziły się przez inhalację kurzu w okresie harmatanu. Po jednym przypadku PAM opisano w Namibii i na Madagaskarze; ofiarami inwazji *N. fowleri* byli chłopcy, którzy wcześniej kąpali się w basenie napełnianym wodą z gorącego źródła [65] lub w jeziorze [34].

#### 4. Inwazje PAM u zwierząt

Inwazje *N. fowleri* występują także u zwierząt. Doświadczalnie wykazano, że różne gatunki gryzoni, owce i małpy są wrażliwe na zarażenie tym pełzakami i myszy laboratoryjne są często wykorzystywane do badań nad negleriozą [83, 86]. Jak dotychczas naturalne, śmiertelne przypadki PAM stwierdzono jedynie u tapira i u bydła. Pierwszy naturalny przypadek PAM opisano u 6-letniego samca tapira, hodowanego w ogrodzie zoologicznym w Phoenix, w Arizonie, USA [49]. Do śmierci zwierzęcia doszło po bardzo krótkotrwałym przebiegu klinicznym inwazji, objawiającym się suchym kaszlem, brakiem apetytu i śpiączką. W badaniach sekcyjnych, w obrębie mózgu stwierdzono typowe dla PAM zmiany anatomopatologiczne, a w skrawkach tkanki nerwowej mikroskopowo wykryto pełzaki *N. fowleri* [49]. Przypuszczalnie źródłem zarażenia tapira była woda zanieczyszczona pełzakami.

Z kolei pierwsze przypadki PAM u bydła opisano w 2005 roku w Kalifornii, USA, gdzie latem 1999 roku padło 21 młodych jałówek z objawami neurologicznymi; śmiertelne zapalenie opon mózgowych i mózgu stwierdzono u dziewięciu jałówek rasy Holstein [23]. W badaniach sekcyjnych wykazano ciężkie, wieloogniskowe krwotoczno-martwicze zmiany w obrębie płatów węchowych i mózdzku oraz w nerwie węchowym. Przy pomocy metod immunohistochemicznych wykazano obecność *N. fowleri* w mózgu i nerwie węchowym padłych jałówek. Chociaż nie udało się wyizolować pełzaków z wody, to jednak autorzy tej pracy sugerują, że woda pitna była źródłem zarażenia *N. fowleri*, mimo że pracownicy fermy nie zauważyli, aby krowy w trakcie pojenia zanurzały nozdrza w wodzie [23]. Zatem, inną, możliwą przyczyną zarażenia mogło być rozpylanie wody w celu zmniejszenia zapylenia, co mogło prowadzić do inhalacji aerozolu wodnego przez krowy. W okresie wystąpienia PAM u jałówek, w Kalifornii panowały upały; średnia, dzienna temperatura w lipcu i sierpniu wynosiła 42°C, a we wrześniu niemal 40°C. Natomiast temperatura wody w stawie wynosiła ponad 32°C, a w korytach na ranczu nawet 35.8°C. Jak już wielokrotnie wspomniano, wysokie temperatury sprzyjają namnażaniu *N. fowleri* i tym samym zwiększają ryzyko zarażenia się tym groźnym pełzakiem. Rok później opisano przypadek PAM u krowy rasy Jersej z Kostaryki; zgon krowy nastąpił po trzech dniach od wystąpienia objawów (anoreksja i paraliż) [54]. Przy pomocy metody immunohistochemicznej i mikroskopowej analizie barwionych skrawków tkanki nerwowej, stwierdzono trofozoity *N. fowleri* w mózgu. PAM stwierdzono także u młodego woła, pochodzącego z gospodarstwa znajdującego się na terenie stanu Paraiba w Brazylii [58].

Właściciel przekazał woła do uboju po dwóch dniach od wystąpienia u niego braku koordynacji ruchowej i postępującego paraliżu. W badaniach sekcyjnych wykryto w obrębie mózgu trofozoity *N. fowleri*. Tak jak sugerowano w poprzednich przypadkach PAM u bydła, źródłem zarażenia mogła być woda pitna. Zwierzęta z tego stada piły wodę ze stawów i dwóch sezonowych strumieni, które były częściowo suche.

Występowanie przypadków PAM u zwierząt z objawami neurologicznymi wskazuje na konieczność wprowadzenia diagnostyki różnicowej w chorobach układu nerwowego zwierząt. Niestety badania sekcyjne prowadzone są jedynie w przypadkach zwierząt hodowlanych lub utrzymywanych w ogrodach zoologicznych. Stąd też realne występowanie PAM u zwierząt nie jest znane. Zatem konieczne są dalsze badania w kierunku określenia występowania negleriozy, szczególnie u zwierząt dziko żyjących. Wyniki takich badań pozwoliłyby na określenie, jakie gatunki zwierząt są podatne na zarażenie tym śmiertelnie działającym pelzakiem wolno żyjącym i czy przypadki PAM u zwierząt mogą stanowić zagrożenie dla bioróżnorodności.

## 5. Wnioski

Chociaż większość przypadków PAM u ludzi związana była z uprawianiem sportów wodnych w różnego rodzaju zbiornikach wodnych, to jednak coraz częściej opisywane śmiertelne przypadki PAM związane z wodą wodociągową stanowią poważne i nowe wyzwanie dla przedsiębiorstw odpowiedzialnych za wodę wodociągową. Niestety, *N. fowleri* nie znajduje się na liście Amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska, obejmującej ponad 90 zanieczyszczeń wody pitnej, chociaż pelzak ten jest uwzględniony w liście potencjalnych zanieczyszczeń [<http://www.epa.gov/ccl/contaminant-candidate-list-3-ccl-3>]. Australia jest jedynym krajem, który przyjął standardy prawne odnośnie obecności *Naegleria* w wodach powierzchniowych [25]. Z kolei we Francji ustalono górną granicę 100 trofozoitów *N. fowleri* w 1 litrze wody, pochodzącej z systemu chłodzenia w elektrowniach lub w innych obiektach przemysłowych, ponieważ zrzuty ciepłej wody z tych obiektów do pobliskich zbiorników wodnych stanowią duże ryzyko narażenia ludzi [8]. Niestety, taką samą górną granicę przyjęto do kąpielisk geotermalnych w Gwadelupie, zamorskim terytorium Francji w Ameryce Środkowej, gdzie odnotowano śmiertelny przypadek PAM [56] i gdzie uzyskano wiele cennych informacji dotyczących obecności *N. fowleri* w wodach geotermalnych [55]. Obok kąpieliska, gdzie wystąpił śmiertelny przypadek PAM władze postawiły plakat, który informuje, że liczba pelzaków *N. fowleri* nie przekracza pięciu w jednym litrze, co wskazuje, że kąpiel w tym miejscu jest dozwolona, bo jest to poziom niższy od poziomu wskazanego przez prawo. Stąd też jeden z największych autorytetów w zakresie badań nad *Naegleria* uważa, że władze popełniają przestępstwo, zezwalając na kąpiel w tym miejscu [25].

W świetle ostatnich danych, istnieje konieczność dokonania zmian w regulacjach prawnych, dotyczących wody pitnej, a także konieczność podjęcia wszelkich działań uświadamiających społeczeństwo o groźnych następstwach wynikających z obecności *N. fowleri* w wodzie pitnej i w zbiornikach wód powierzchniowych.

## Bibliografia

- 1) Alexeieff, A. Sur les caractères cytologiques et la systematique des amibes du groupe limax (*Naegleria* nov. gen. et *Hartmannia* nov. gen.) et des amibes parasites des vertébrés (*Proctamoeba* nov. gen.). *Bulletin de la Société Zoologique de France*, 1912, 37: 55-74
- 2) Anderson, K., and Jamieson, A. Primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet*, 1972, 1: 902-903
- 3) Anderson, K., and Jamieson, A. Primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet*, 1972, 2: 379
- 4) Bennett, W.M., Nespral, J.F., Rosson, M.W., and McEvoy, K.M. Use of organs for transplantation from a donor with primary meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *American Journal of Transplantation*, 2008, 8: 1334-1335
- 5) Blair, B. *Naegleria fowleri* in well water. *Emerging Infectious Diseases*, 2008, 14: 1499-1501
- 6) Butt, C.G. Primary amoebic meningoencephalitis. *New England Journal of Medicine*, 1966, 274: 1473-1476
- 7) Butt, C.G., Baro, C., and Knorr, R.W. *Naegleria* (sp.) identified in amoebic encephalitis. *American Journal of Clinical Pathology*, 1968, 50: 568-574
- 8) Cabanes, P.A., Wallet, F., Pringuez, E., and Pernin, P. Primary amoebic meningoencephalitis risk from swimming in the presence of *Naegleria fowleri*. In: Billot-Bonef, S., Cabanes, P.A., Marciano-Cabral, F., Pernin, P., and Pringuez, E. (Eds.), IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings, 2001, 277-283
- 9) Cain, A.R.R., Wiley, P.F., Brownell, B., and Warhurst, D.C. Primary amoebic meningoencephalitis. *Archives of Diseases in Childhood*, 1981, 56: 140-143
- 10) Carter, R.F. Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis, and the experimental pathological changes induced by it. *Journal of Pathology*, 1970, 100: 217-244
- 11) Caruzo, G., and Cardozo, J. Primary amoebic meningoencephalitis; a new case from Venezuela. *Tropical Doctor*, 2008, 38: 256-257
- 12) CDC. Primary amoebic meningoencephalitis associated with ritual nasal rinsing - St. Thomas, U.S. Virgin Islands, 2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2013, 62: 903
- 13) Červa, L., Ferdinandova, N., Novak, K., Ptackova, V., Schrottenbaum, M., and Zimak, V. Meningoencephalitis durch Amoebida Naegleriidae. *Münchener Medizinische Wochenschrift*, 1969, 111: 2090-2094
- 14) Červa, L., Ječna, P., and Hyhlik, R. *Naegleria fowleri* from a canal draining cooling water from a factory. *Folia Parasitologica*, 1980, 27: 103-107
- 15) Červa, L., Kasprzak, W., and Mazur, T. *Naegleria fowleri* in electric power station cooling waters. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology*, 1982, 26: 152-161
- 16) Červa, L., and Novak, K. Amoebic meningoencephalitis: sixteen fatalities. *Science*, 1968, 160: 92
- 17) Chang, S.L. Resistance of pathogenic *Naegleria* to some common physical and chemical agents. *Applied and Environmental Microbiology*, 1978, 35: 368-375

- 18) Cogo, P.E., Scaglia, M., Gatti, S., Rossetti, F., Alaggio, R., Laverda, A.M., Zhou, L., Xiao, L., and Visvesvara, G. *Fatal Naegleria fowleri meningoencephalitis. Italy. Emerging Infectious Disease*, 2004, 10: 1835-1837
- 19) Cope, J.R., Ratard, R.C., Hill, V.R., Sokol, T., Causey, J.J., Yoder, J.S., Mirani, G., Mull, B., Mukerjee, K.A., Narayanan, J., Doucet, M., Qvarnstrom, Y., Poole, Ch.N., Akingbola, O.A., Ritter, J. Xiong, Z., da Silva, A., Roellig, D., Van Dyke, R., Stern, H., Xiao, L., and Beach, M.J. The first association of a primary amebic meningoencephalitis death with *culturable Naegleria fowleri* in tap water from a U.S. Treated public drinking water system. *Clinical Infectious Diseases*, 2015, 60: e36-42
- 20) Cubero-Menéndez, O., and Cubero-Rego, D.. Primary amoebic meningencefalitis: a case report. *Revue Neurologique*, 2004, 38: 336-338
- 21) Culbertson, C.G., Ensminger, P.W., and Overton, W.M. Pathogenic *Naegleria* sp. – study of a strain isolated from human cerebrospinal fluid. *Journal of Protozoology*, 1968, 15: 353-363
- 22) Cursons, R., Sleight, J., Hood, D., and Pullon, D. A case of primary amoebic meningoencephalitis: North Island, New Zealand. *New Zealand Medical Journal*, 2003, 116: 1-5
- 23) Daft, B.M., Visvesvara, G.S., Read, D.H., Kinde, H., Uzal, F.A., and Manzer, M. D. Seasonal meningoencephalitis in Holstein cattle caused by *Naegleria fowleri*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2005, 17: 605-609
- 24) De Jonckheere, J.F. Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infection, Genetic and Evolution*, 2011, 11: 1520-1528
- 25) De Jonckheere, J.F. What do we know by now about the genus *Naegleria*? *Experimental Parasitology*, 2014, 145: S2-S9
- 26) De Jonckheere, J., Van Dijk, P., and Van de Voorde, H. The effect of thermal pollution on the distribution of *Naegleria fowleri*. *Journal of Hygiene*, 1975, 75: 7-13
- 27) Dorsch, M.M., Cameron, A.S., and Robinson, B.S. The epidemiology and control of primary amoebic meningoencephalitis with particular reference to South Australia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 983, 77: 372-377
- 28) Ettinger, M.R., Webb, S.R., Harris, S.A., McIninch, S.P., Garman, G.C., and Brown, B.L. Distribution of free-living amoebae in James river, Virginia, USA. *Parasitology Research*, 2003, 89: 6-15
- 29) Fowler, M., and Carter, R. F. Acute pyogenic meningitis due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *Britisch Medical Journal*, 1965, 2: 740-742
- 30) Griffin, J.L. Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. *Science*, 1972, 178: 869-870
- 31) Griffin, J.L. The pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*: environmental isolations competitors, ecologic interactions, and the flagellate-empty habitat hypothesis. *Journal of Protozoology*, 1983, 30: 403-409
- 32) Hermanne, J., Jadin, J.B., and Martin, J.J. Méningo-encéphalite amibienne primitive en Belgique. Quatre premiers cas. *Acta Paediatrica Belgica*, 1973, 27: 348-365
- 33) Init, I., Lau, Y.L., Arin Fadzlun, A., Foad, A.I., Neilson, R.S., and Nissapatorn, V. Detection of free living amoebae, *Acanthamoeba* and *Naegleria*, in swimming pools, Malaysia. *Tropical Biomedicine*, 2010, 27: 566-577

- 34) Jaffar-Bandjee, M.C., Alessandri, J.L., Clouzeau, J., Samperiz, S., and Saly, J.C. Méningo-encéphalite primitive á amibes libres: premier cas observé á Madagascar. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 2005, 98: 11-13
- 35) John, D.T., and Howard, M.J. seasonal distribution of pathogenic free-living amoebae in Oklahoma waters. *Parasitology Research*, 2003, 89: 6-15
- 36) Johnson, C.M. Un caso de meningoencefalitis primaria amibiana. *Revista Medica de Panamá*, 1977, 2: 141-144
- 37) Kadlec, V., Červa, L., and Skvarova, J. Virulent *Naegleria fowleri* in an indoor swimming pool. *Science*, 1978, 201: 1025
- 38) Kasprzak, W. Pełzaki wolnożyjące o właściwościach patogenicznych dla człowieka i zwierząt. Monografie Parazytologiczne nr 10, PWN, Warszawa, 1985
- 39) Kasprzak, W., and Mazur, T. Free-living amoebae isolated from waters frequented by people in the vicinity of Poznań, Poland. Experimental studies in mice on the pathogenicity of the isolates. *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie*, 1972, 23: 198-201
- 40) Kasprzak, W., and Mazur, T. The effect of thermic pollution of waters on the distribution of pathogenic *Naegleria* strains. *Wiadomości Parazytologiczne*, 1976, 22: 457-459
- 41) Kasprzak, W., Mazur, T., and Červa, L. *Naegleria fowleri* in thermally polluted waters. *Folia Parasitologica*, 1982, 29: 211-218
- 42) Kasprzak, W., Mazur, T., and Rucka, A. Studies on some pathogenic strains of free-living amoebae isolated from lakes in Poland. *Annales de la Societe Belge de Medicine Tropicale*, 1974, 54: 351-357
- 43) Kemble, S.K., Lynfield, R., DeVries, A.S., Drehner, D.M., Pomputius, W.F. 3rd, Beach, M.J., Visvesvara, G.S., da Silva, A.J., Hill, V.R., Yoder, J.S., Xiao, L., Smith, K.E., and Danila, R. Fatal *Naegleria fowleri* infection acquired in Minnesota: possible expanded range of a deadly thermophilic organism. *Clinical Infectious Diseases*, 2012, 54: 805-809
- 44) Kramer, M.H., Lerner, C.J., and Visvesvara, G.S. Kidney and liver transplants from a donor infected with *Naegleria fowleri*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35: 1032-1033
- 45) Kyle, D., and Noblet, G.P. Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in fresh water lakes. *Journal of Protozoology*, 1985, 32:99-105
- 46) Laseke, I., Korte, J., Lamendella, R., Kaneshiro, E.S., Marciano-Cabral, F., and Oerther, D.B. Identification of *Naegleria fowleri* in Warm Ground Water Aquifers. *Journal of Environmental Quality*, 2010, 39: 147-153
- 47) Lawande, R.V. Recovery of soil amoebae from the air during the harmattan in Zaria, Nigeria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 1983, 77: 45-49
- 48) Lawande, R.V., Macfarlana, J.T., Weir, W.R., and Awunor-Renner, C. A case of primary amebic meningoencephalitis in a Nigerian farmer. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1980, 29: 21-25
- 49) Lozano-Alarcon, F., Bradley, G.A., Houser, B.S., and Visvesvara, G.S. Primary amebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri* in a South American tapir. *Veterinary Pathology*, 1997, 34: 239-243

- 50) Mahittikorn, A., Mori, H., Popruk, S., Roobthaisong, A., Sutthikornchai, C., Koompapong, K., Siri, S., Sukthana, Y., and Nacapunchai, D. Development of a rapid, simple method for detecting *Naegleria fowleri* visually in water samples by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *PLoS ONE*, 2015, 10: e0120997, <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0120997>
- 51) MacLean, R.C., Richardson, D.J., LePardo, R., and Marciano-Cabral, F. The identification of *Naegleria fowleri* from water and soil samples by nested PCR. *Parasitology Research*, 2004, 93: 211-217
- 52) Marciano-Cabral, F., MacLean, R., Mensah, A., and LaPat-Polasko, L. Identification of *Naegleria fowleri* in Domestic Water Sources by Nested PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 5864-5869
- 53) Martinez, A.J., and Kasprzak, W. Patogenne pelzaki wolnożyjące – przegląd. *Wiadomości Parazytologiczne*, 1980, 26: 495-522
- 54) Morales, J.A., Chaves, A.J., Visvesvara, G.S., and Dubey, J.P. *Naegleria fowleri*-associated encephalitis in a cow from Costa Rica. *Veterinary Parasitology*, 2006, 139: 221-223
- 55) Moussa, M., Tissot, O., Guerlotté, J., De Jonckheere, J.F., and Talarmin, A. Soils is the origin for the presence of *Naegleria fowleri* in the thermal recreational waters. *Parasitology Research*, 2015, 114: 311-315
- 56) Nicolas, M., De Jonckheere, J.F., Pernin, P., Bataille, H., Le Bris, V., and Hermann Storck, C. Diagnostic moléculaire d'une méningoencéphalite amibienne primitive à l'occasion d'un cas fatal en Guadeloupe. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 2010, 103: 14-18
- 57) Phattharangrong, N., Chantratong, N., and Jitsurong, S. Bacteriological quality of holywater from Thai temples in Songkhla Province, southern Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 1998, 81: 547-550
- 58) Pimentel, L.A., Flávio, A., Dantas, M., Uzal, F., and Riet-Correa, F. Meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri* in cattle of northeast Brazil. *Research in Veterinary Science*, 2012, 93: 811-812
- 59) Qvarnstrom, Y., Visvesvara, G.S., Sriram, R., and da Silva, A.J. Multiplex realtime PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44: 3589-3595
- 60) Robinson, B.S., Monis, P.T., and Dobson, P.J. Rapid, sensitive, and discriminating identification of *Naegleria* spp. by real-time PCR and melting-curve analysis *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 5857-5863
- 61) Rodriguez-Zaragoza, S. Ecology of free-living amoebae. *Critical Reviews in Microbiology*, 1994, 20:225-241
- 62) Roy, S.L., Metzger, R., Chen, J.G., Laham, F.R., Martin, M., Kipper, S.W., Smith, L.E., Lyon, G.M. 3rd, Haffner, J., Ross, J.E., Rye, A.K., Johnson, W., Bodager, D., Friedman, M., Walsh, D.J., Collins, C., Inman, B., Davis, B.J., Robinson, T., Paddock, C., Zaki, S.R., Kuehnert, M., DaSilva, A., Qvarnstrom, Y., Sriram, R., and Visvesvara, G.S. Risk for transmission of *Naegleria fowleri* from solid organ transplantation. *American Journal of Transplantation*, 2014, 14: 163-171
- 63) Salazar, H.C., Moura, H., Fernandez, O., and Peralta, J.M. Isolation of *Naegleria fowleri* from a lake in the city of Rio de Janeiro. Brazil. *Transactions of the Royal Society and Tropical Medicine and Hygiene*, 1986, 80: 348-349

- 64) Schardinger, F. Entwicklungskreis einer *Amoeba lobosa* (*Gymnamoeba*): *Amoeba gruberi*. *Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften in Wien Abt. I*, 1899, 108: 713-734
- 65) Schoeman, C.J., van der Vyver, A.E., and Visvesvara, G.S. Primary amoebic meningoencephalitis in southern Africa. *Journal of Infection*, 1993, 26: 211-214
- 66) Seidel, J.S., Harmatz, P., Visvesvara, G.S., Cohen, A., Edwards, J., and Turner, J. Successful treatment of primary amoebic meningoencephalitis. *New England Journal of Medicine*, 1982, 306: 346-348
- 67) Shakoor, S., Beg, M.A., Mahmood, S.F., Bandea, R., Sriram, R., Noman, F., Ali, F., Visvesvara, G.S., and Zafar, A. Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*, Karachi, Pakistan. *Emerging Infectious Disease*, 2011, 17: 258-261
- 68) Sheehan, K.B., Fagg, J.A., Ferris, M.J., and Henson, J.M. PCR Detection and analysis of the free-living amoeba *Naegleria* in hot springs in Yellowstone and Grand Teton National Parks. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (10): 5914-5918, <http://doi.org/10.1128/AEM.69.10.5914-5918.2003>
- 69) Shuster, F.L., and Visvesvara, G.S. Free-living amoebae as opportunistic and nonopportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal of Parasitology*, 2004, 34: 1001-1027
- 70) Siddiqui, R., and Khan, N.A. Primary Amoebic Meningoencephalitis Caused by *Naegleria fowleri*: An Old Enemy Presenting New Challenges. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2014, 8: e3017
- 71) Sugita, Y., Fujii, T., Hayashi, I., Aoki, T., Yokoyama, T., Morimatsu, M., Fukuma, T., and Takamya, Y. Primary amoebic meningocelalitis due to *Naegleria fowleri*: an autopsy case in Japan. *Pathology International*, 1999, 49: 468-470
- 72) Symmers, W.S.C. Primary amoebic meningoencephalitis in Britain. *British Medical Journal*, 1969, 4: 449-454
- 73) Tiewchaloren, S., and Junnu, V. Factors affecting the viability of pathogenic *Naegleria* species isolated from Thai patients. *Journal of Tropical Medicine and Parasitology*, 1999, 22: 15-21
- 74) Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F., and Ayadi, A. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Pathologie Biologie*, 2012 60: 399-405
- 75) Tung, M.C., Hsu, B.M., Tao, C.W., Lin, W.C., Tsai, H.F., Ji, D.D., Shen, S.M., Chen, J.S., Shih, F.C., and Huang, Y.L. Identification and significance of *Naegleria fowleri* isolated from the hot spring which related to the first primary amoebic meningoencephalitis (PAM) patient in Taiwan. *International Journal for Parasitology*, 2013, 43: 691-696
- 76) Van Den Driessche, E., Vandepitte, J., Van Dijck, P., De Jonckheere, J., and van de Voorde, H. Primary amoebic meningoencephalitis after swimming in stream water. *Lancet*, 1973, 2: 971
- 77) Visvesvara, G.S. Amebic meningoencephalitides and keratitis: challenges in diagnosis and treatment. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2010, 23: 590-594
- 78) Visvesvara, G.S. Infections with free-living amoebae. *Handbook of Clinical Neurology*, 2013, 114: 153-168
- 79) Visvesvara, G.S., Moura, H., and Schuster, F.L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2007, 50: 1-26



- 80) Wang, A., Kay, R., Poon, W.S., and Ng, H.K. Successful treatment of amoebic meningoencephalitis in a Chinese living in Hong Kong. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 1993, 95: 249-252
- 81) Wellings, F.M., Amuso, P.T., Chang, S.L., and Lewis, A.L. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria* from Florida lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, 34: 661-667
- 82) Wiwanitkit, V. Review of clinical presentations in Thai patients with primary amoebic meningoencephalitis. *Medscape General Medicine*, 2004, 6: 2-8
- 83) Wong, M.M., Karr, S.L., and Balamuth, W.B. Experimental infection with pathogenic free-living amoebae in laboratory primate hosts: a study on susceptibility to *Naegleria fowleri*. *Journal of Parasitology*, 1975, 61: 199-208
- 84) Yoder, J.S., Eddy, B.A., Visvesvara, G.S., Capewell, L., and Beach, M.J. The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in the USA, 1962-2008. *Epidemiology and Infection*, 2010, 138: 968-975
- 85) Yoder, J.S., Straif-Bourgeois, S., Roy, S.L., Moore, T.A., Visvesvara, G.S., Ratard, R.C., Hill, V.R., Wilson, J.D., Linscott, A.J., Crager, R., Kozak, N.A., Sriram, R., Narayanan, J., Mull, B., Kahler, A.M., Schneeberger, Ch., da Silva, A.J., Poudel, M., Baumgarten, K.L., Xiao, L., and Beach, M.J. Primary amoebic meningoencephalitis deaths associated with sinus irrigation using contaminated tap water. *Clinical Infectious Diseases*, 2012, 55: e79-85
- 86) Young, M.D., Willaert, E., Neal, F.C., Simpson, C.F., and Stevens, A.R. Experimental infection of sheep with *Naegleria fowleri* of human origin. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1980, 29: 476-477

