Patologia umana da amebe a vita libera

Massimo SCAGLIA

Laboratori di Ricerca di Area Infettivologica, Laboratorio di Parassitologia Clinica, Università degli Studi, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Riassunto. - Naegleria fowleri, Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris sono specie amebiche a vita libera che possono occasionalmente causare quadri patologici nell'uomo. L'infezione del SNC indotta da N. fowleri, denominata meningoencefalite amebica "primaria", viene acquisita a seguito di bagni in acque inquinate di piscine, fiumi, laghi. Il decorso della malattia è acuto, spesso fulminante e caratterizzato, dal punto di vista anatomopatologico, da un quadro di meningoencefalite necrotico-emorragica interessante soprattutto la base encefalica, il tronco cerebrale ed il cervelletto. Al contrario alcune specie di Acanthamoeba e B. mandrillaris provocano un quadro di encefalite cronica "granulomatosa" opportunista in soggetti immunocompromessi per cause patologiche di base o iatrogene; l'infezione cerebrale è molto probabilmente secondaria a disseminazione ematogena dei protozoi presenti in foci primari polmonari o cutanei. Solo Acanthamoeba spp. sono in grado inoltre di causare severe forme di cheratite subacuta, oggi rilevabili prevalentemente in soggetti portatori di lenti a contatto.

Parole chiave: Naegleria fowleri, Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, meningoencefalite amebica primaria, encefalite granulomatosa, cheratite.

Summary (Human pathology due to free-living amoebae). - Naegleria fowleri, Acanthamoeba spp. and Balamuthia mandrillaris are free-living amoebae that occasionally may induce pathology in human beings. CNS disease due to N. fowleri, called "primary" amoebic meningoencephalitis, is acquired after exposure to polluted waters in swimming pools, rivers, and lakes. The clinical course is acute, often fulminant and characterized pathologically by necrotizing hemorrhagic meningoencephalitis, involving mainly the base of the brain, brainstem and cerebellum. In contrast, some Acanthamoeba spp. and B. mandrillaris cause opportunistic, chronic "granulomatous" encephalitis in subjects pathologically or iatrogenically immunocompromised. There are, most likely, foci of protozoa in lung and skin reaching the CNS by hematogenous route. Only Acanthamoeba spp. can also produce severe, subacute keratitis, mainly today in contact lens wearers.

Key words: Naegleria fowleri, Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, primary amoebic meningoencephalitis, granulomatous encephalitis, keratitis.

Introduzione e note storiche

L'importanza delle infezioni umane provocate da amebe cosiddette "a vita libera", traduzione letterale della definizione corrente di "free-living amoebae" degli autori anglosassoni, è andata aumentando di pari passo con il progressivo incremento casistico, con il riconoscimento negli anni di nuovi generi e specie patogene, con la constatazione che anche questi protozoi si sono ritagliati un loro spazio come agenti eziologici di infezioni opportuniste nei soggetti immunocompromessi, compresi oggi i pazienti affetti da AIDS.

L'etichetta di microrganismi "a vita libera" deriva dal fatto che l' "habitat" naturale di queste amebe, comprese le specie dimostratesi patogene per l'uomo, sono le acque di superficie proprie di bacini naturali (laghi, fiumi, torrenti) o artificiali (piscine natatorie e riabilitative, vasche di raffreddamento di centrali elettriche e nucleari), oltre che falde sotterranee, il fango e lo stesso pulviscolo

atmosferico in cui la sopravvivenza è assicurata dalle forme cistiche dotate di parete molto resistente agli insulti ambientali.

Peraltro, anche se meno utilizzata, la definizione proposta da Page [1] di "amebe anfizoiche" per le specie che possono infettare l'uomo sembra più pertinente, poiché tende ad enfatizzare la capacità di questi protozoi di passare da una vita del tutto autonoma ad una condizione di parassitismo, se pure facoltativo ed occasionale.

Si deve a Culbertson nel 1958 la prima dimostrazione sperimentale in topi di laboratorio della patogenicità di amebe a vita libera nei confronti di mammiferi [2]: testando su "monolayers" cellulari lotti di vaccino antipolio, alcune fiasche di controllo mostravano ugualmente un effetto citopatico che faceva sospettare un inquinamento da virus polio o altro. Successivamente, topi inoculati per via endovenosa e intranasale con sospensione di queste colture erano deceduti per meningoencefalite e l'esame istologico cerebrale, oltre

che una più accurata osservazione microscopica delle fiasche di controllo, evidenziava la presenza di numerosi trofozoiti di un'ameba a vita libera attribuita al genere *Acanthamoeba*. Oltre alla patogenicità, quello che stupiva era stata la capacità del protozoo di giungere direttamente all'encefalo attraversando la mucosa nasale, risalendo l'epitelio neurolfattorio e moltiplicandosi nello spazio subaracnoideo oltre che nella corteccia cerebrale.

Dopo pochi anni, nel 1965, Fowler e Carter riferivano sui primi quattro casi di meningite amebica fulminante mortale occorsa in pazienti australiani, 3 bambini ed 1 adulto [3]. L'ipotesi della via nasale come porta d'entrata delle amebe veniva avvalorata dal fatto che numerosi protozoi erano osservabili istologicamente nello spessore della mucosa, nei bulbi olfattivi, nel prosencefalo.

Un anno dopo Butt descrivendo i primi 3 casi statunitensi [4] sottolineava il dato anamnestico che, nei giorni immediatamente precedenti la sintomatologia, i pazienti avevano nuotato in piscine riscaldate, verosimilmente infette, e coniava la definizione di meningoencefalite amebica "primaria" (MEAP) per differenziarla dalle localizzazioni cerebrali "secondarie", metastatiche dell'amebiasi intestinale causata da Entamoeba histolytica [4].

Sempre Butt, oltre che altri autori come Carter e Callicott [5-7] riuscivano per primi nel 1968 ad isolare e coltivare *in vitro* da liquor e tessuto cerebrale di soggetti umani malati amebe riconosciute preliminarmente come *Naegleria* sp. e *N. gruberi*, anch'esse diffuse ubiquitariamente nell'ambiente come *Acanthamoeba* e diversi altri generi. Si deve poi a Carter il riconoscimento che tutti i casi umani di malattia descritti dal 1965 al 1970 erano in realtà riconducibili ad una nuova specie, tipizzata con il nome di *Naegleria fowleri* in onore del Dr. Malcom Fowler [8].

Sono databili tra il 1971 e 1973 invece i primi casi di infezione cerebrale umana sicuramente attribuibili ad *Acanthamoeba* [9-11], mentre nel 1974 Nagington *et al.* dimostravano con certezza in 2 pazienti che sempre *Acanthamoeba* spp. potevano anche essere causa di grave patologia oculare, riconoscibile in cheratiti ulcerative [12].

La constatazione che la quasi totalità dei casi di acanthamebiasi cerebrale vede coinvolti soggetti immunodepressi ed il decorso clinico presenta un andamento sub-acuto o cronicizzante, con quadri istologici nettamente differenziabili dalla MEAP, ha permesso a Martinez, nel 1980, di classificare questa patologia nell'ambito delle infezioni opportuniste [13] e di coniare per essa il termine di "granulomatous amoebic meningoencephalitis" (GAE) in base a peculiari quadri istopatologici [14].

A cominciare dalla fine degli anni '80 - a conferma che le conoscenze su questo capitolo di infettivologia sono lungi dall'essere completate - risultano descritte in letteratura forme di encefalite a decorso protratto simili a quelle causate da *Acanthamoeba*, ma che vedono coinvolti un genere ed una specie amebica a vita libera con caratteristiche morfobiologiche, antigeniche e biomolecolari mai riconosciute prima. La caratterizzazione di questa nuova ameba patogena, battezzata con il nome di *Balamuthia mandrillaris*, porta la data del 1993 [15].

Ancora più recentemente alcuni autori hanno descritto forme di cheratite da amebe appartenenti ad altri generi a vita libera quali *Hartmannella* e *Vahlkampfia*: il fatto che le segnalazioni attuali siano assolutamente aneddotiche [16, 17] non deve essere sottovalutato, in relazione a quanto è progressivamente emerso per le altre specie che contano oggi casistiche nettamente più cospicue.

La classificazione tassonomica delle amebe a vita libera patogene per l'uomo è schematizzata in Fig. 1.

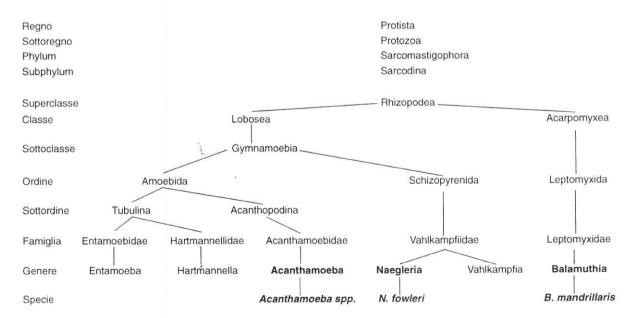


Fig. 1. - Posizione tassonomica di *Naegleria fowleri, Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*. (Riprodotta per gentile concessione da [60]).

Eziologia, morfobiologia ed epidemiologia

Naegleria fowleri

N. fowleri, come tutte le specie del genere Naegleria, è un amebo-flagellato. Infatti, oltre ai classici stadi biologici di trofozoite e cisti, è riconosciuta anche una fase vegetativa bi-tetraflagellata piriforme, temporanea e reversibile nella forma di trofozoite ameboide (Fig. 2). Questa, per il battito sincrono dei flagelli anteriori, è caratterizzata da movimenti assai rapidi e, anche in relazione a tale caratteristica, era stata incriminata come prevalente se non esclusiva fase infettante [18]. La forma classica di trofozoite ameboide (Fig. 3), con diametro massimo di 30-32 μm, si muove a seguito dell'emissione incalzante di grossi pseudopodi ectoplasmatici ialini ("lobopodi"), mentre il nucleo - come in tutte le specie a vita libera - ha un aspetto vescicoloso con grosso nucleolo (cariosoma) centrale che si distingue nettamente da quello a morfologia puntiforme delle amebe del genere Entamoeba. Altri "markers" caratteristici sono la possibilità di formazione di strutture morfo-dinamiche uniche o plurime ("amebostomi"), che rappresentano vere e proprie bocche che si formano nel corpo cellulare dei trofozoiti per fagocitare materiale nutritivo e talora esercitare fenomeni di cannibalismo [19], oltre che la presenza - anche questa comune a tutte le amebe "freeliving" - di un vacuolo pulsante e di mitocondri che assicurano a questi protozoi un metabolismo aerobio.

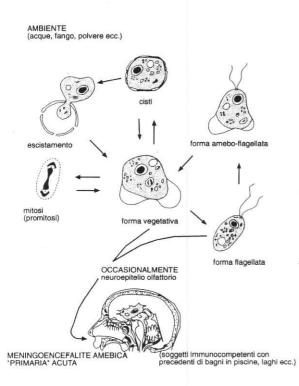


Fig. 2. - Ciclo biologico vitale di *Naegleria fowleri* e patologia correlata.

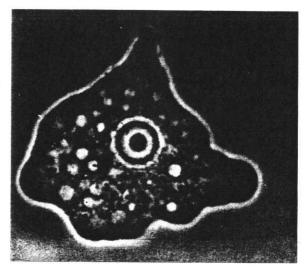


Fig. 3. - Trofozoite ameboide di *Naegleria fowleri* in fase di attiva traslazione. E' evidente un lobopodio ectoplasmatico sulla destra, mentre l'endoplasma appare ricco di vacuoli e ribosomi. Il nucleo in sede centrocellulare mostra un grosso cariosoma (Contrasto di fase; ingrandimento originale 1000 x).

Quest'ultima caratteristica era stata alla base della definizione di Naegleria aerobia da parte di qualche autore [18], sinonimo oggi non più considerato valido per la specie N. fowleri. La citodieresi, mai documentata nelle fasi flagellate, nello stadio ameboide è preceduta da una particolare modalità di cariodieresi chiamata "promitosi": nel divenire della divisione nucleare si osserva la costante persistenza della membrana nucleare, mentre il patrimonio genetico una volta duplicato si divide nelle cellule figlie contemporaneamente al citoplasma [20]. Come in tutti i protozoi, la forma cistica rappresenta la fase biologica di resistenza e, quantomeno in una certa percentuale di casi, la fase infettante. Le cisti di N. fowleri (8-15 µm di diametro), osservate in microscopia elettronica a scansione (SEM) [21], appaiono globose con parete esterna interrotta da "pori" rotondeggianti che rappresentano in ogni momento la via di uscita dei trofozoiti metacistici. Lo studio microelettronico a trasmissione (TEM) di Schuster [22] ha dimostrato che le cisti presentano una doppia parete esterna accollata, mentre i pori risultano chiusi da una sorta di tappo mucoide a minore resistenza.

N. fowleri è una specie amebica termofila, in grado di sopportare *in vitro* temperature di 42-45 °C; risulta altresì resistente in fase cistica a basse temperature, mentre appare molto sensibile all'essiccazione [23].

Naegleria spp., tra cui N. fowleri, sono state ripetutamente isolate a tutte le latitudini e da vari "habitat": acque potabili e non, fanghi, discariche fognarie, acquari tropicali, pulviscolo atmosferico ecc., oltre che da tamponi nasali di soggetti sani [24], a conferma della assoluta

ubiquitarietà di queste amebe. Dal punto di vista epidemiologico è particolarmente da temere la presenza di *N. fowleri* in piscine natatorie e piscine termali e nelle condotte di acqua potabile delle abitazioni, dal momento che in numerosi casi di infezione umana si è potuto stabilire con certezza, mediante isolamento *a posteriori* dei ceppi, che le fonti di inquinamento erano queste [23]. La letteratura ha riportato in proposito anche piccole "outbreaks": 16 soggetti infettatisi dopo aver nuotato nello stesso lago in Virginia [25], 19 giovani nella stessa piscina in Cecoslovacchia [26].

In riferimento al nostro paese, anche a causa di un persistente misconoscimento e sottovalutazione di tale patologia da parte dei clinici, nessun caso di MEAP è stato a tutt'oggi diagnosticato, mentre a tutto ottobre 1996 (A.J. Martinez, comunicazione personale) nel mondo risultavano documentati 175 casi, 80 negli USA e 95 in altri paesi sparsi in tutti i continenti.

Acanthamoeba

Diverse specie di Acanthamoeba (A. castellanii, A. polyphaga, A. culbertsoni, A. rhysodes, A. hatchetti, A. palestinensis, A. griffini, A. astronyxis, A. mauritaniensis, A. royreba, A. divionensis, A. healyi, A. terricola, A. lenticulata, A. jacobsi) sono state riconosciute finora come agenti eziologici di encefalite granulomatosa opportunista o di cheratite in soggetti umani e, più recentemente, anche di forme disseminate in pazienti AIDS. Dal punto di vista morfologico le forme vegetative, a diametro massimo assai variabile (25-55 µm) a seconda

della specie, si distinguono da Naegleria spp. e B. mandrillaris per la costante e peculiare presenza lungo tutta o parte la periferia del corpo cellulare di estroflessioni citoplasmatiche filiformi o aghiformi dette "acanthopodi" o "filopodi" (Fig. 4). Pertanto, la mancanza di veri e propri pseudopodi fa sì che i trofozoiti di Acanthamoeba abbiano movimenti molto più torpidi in rapporto ad altre specie e tendano spesso a rimanere "surplace" sotto il campo microscopico [11]. Gli organuli cellulari risultano concentrati nell'endoplasma ed il nucleo è caratterizzato dalla presenza di un grosso cariosoma centrale e da cromatina periferica disposta a corona in grosse zolle. In alcune specie, segnatamente in A. astronyxis che è la specie patogena di maggiori dimensioni, in zona paranucleare è spesso visibile la centrosfera che detta i tempi della divisione nucleare. Quest'ultima, definita "metamitosi", è simile a quanto si osserva nelle cellule dei metazoi: in fase iniziale la membrana nucleare scompare ed il cariosoma si "polverizza"; si assiste successivamente alla formazione del fuso mitotico con evidenziazione della placca cromosomica equatoriale. In telofase si assiste alla divisione dei nuclei figli cui succede, solo in un secondo tempo, la divisione citoplasmatica [27].

La forma cistica delle diverse specie osservate in SEM [21] appare globosa, con un diametro variabile (18-23 µm), con una superficie esterna mammellonata ed interrotta qua e là da pori che, come in *Naegleria*, sono presenti per permettere un'eventuale fuoriuscita del trofozoite non appena le condizioni ambientali ritornino ad essere ideali per la sopravvivenza e la moltiplicazione dello stadio metabolicamente attivo del protozoo (Fig. 5).

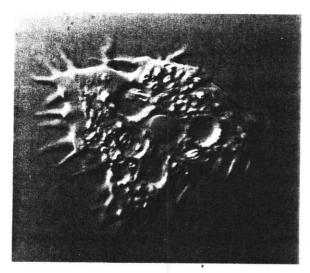


Fig. 4. - Forma vegetativa di *Acanthamoeba astronyxis*. Perifericamente sono presenti numerosi acanthopodi ialini, mentre l'*internum* cellulare mostra alcuni grossi vacuoli di fagocitosi ed un cospicuo cariosoma (Contrasto interferenziale; ingrandimento originale 1000 x).

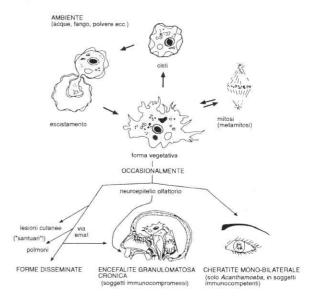


Fig. 5. - Ciclo biologico vitale di *Acanthamoeba* spp. (e *Balamuthia mandrillaris*) e patologia correlata.

Osservata in microscopia in contrasto di fase o contrasto interferenziale (Fig. 6) ed anche in TEM, la parete cistica risulta ben differenziata in un'esocisti a contorni irregolari e in un'endocisti con aspetto più o meno stellato, poligonale, festonato a seconda della specie [27, 28]. A livello dei pori eso ed endocisti convergono ed il poro stesso risulta chiuso da una membrana a limitato spessore e di minore resistenza definita "ostiolo", che potrà essere forzata in qualsiasi momento dal trofozoite metacistico [27, 28]. Le cisti di Acanthamoeba, proprio in relazione alla struttura parietale, risultano molto più resistenti alle alte e basse temperature, oltre che a varie sostanze disinfettanti, rispetto a Naegleria [23]. Pertanto, oltre che da acque di superficie potabili e non, da fango e pulviscolo atmosferico, acanthamoebe sono state isolate a livello della calotta polare, da sedimenti oceanici, da unità di dialisi, condizionatori d'aria, acque minerali ecc. [24]. Nell'uomo, oltre che da soggetti malati, questi protozoi risultano isolati da tamponi nasali ed auricolari, secrezioni bronchiali, campioni fecali ed altro materiale biologico di persone sane [24]. In relazione all'uso ormai generalizzato delle lenti a contatto, sono ormai routinari gli isolamenti di Acanthamoeba spp. dalle soluzioni di lavaggio, dai contenitori e dalle lenti stesse nei molti casi in cui non siano state seguite norme basilari di conservazione, igiene e pulizia [29]. Peraltro, anche se le casistiche di cheratiti amebiche hanno subito un drammatico incremento proprio in relazione all'uso dilagante delle lenti a contatto, fortunatamente l'isolamento anche di specie potenzialmente patogene non appare sempre correlato a quadri patologici oculari [30]. Acanthamoeba spp. si sono inoltre segnalate come frequenti "carriers" di endosimbionti batterici, comprese specie patogene come Legionella pneumophila, ma non è ancora ben chiaritò quale sia il ruolo interpretato da questi protozoi per un'eventuale diffusione ambientale od intraorganica di questi batteri [31-33].

A tutto ottobre 1996 la casistica mondiale di encefaliti granulomatose da Acanthamoeba ammontava a 95 casi di cui 65 diagnosticati negli USA e 30 in altri Paesi; nell'ambito dei pazienti statunitensi, 46 risultavano già affetti da AIDS (A.J. Martinez, comunicazione personale). Le forme di cheratite in tutto il mondo superano gli 800 casi, ma è praticamente certo che questo numero non riflette le reali prevalenze di questa patologia, soprattutto in riferimento a paesi a bassi tenori igienico-economici in cui la cheratite amebica è certamente presente, ma molto spesso non diagnosticata per obiettive difficoltà di appropriati approcci diagnostici microbiologici. In proposito, da uno studio recente condotto in Mali e nel Sahel (A.M. Simitzis-Le Flohic, dati non pubblicati; comunicazione personale) è risultato che le cheratiti ad eziologia amebica rappresentano circa il 25% del totale delle ulcere corneali croniche; esse colpiscono indifferentemente il sesso maschile e femminile, adulti e

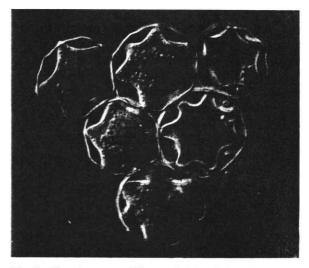


Fig. 6. - Piccolo gruppo di forme cistiche di *Acanthamoeba* astronyxis con tipica endocisti stellata. Il trofozoite è ben visibile all'interno della parete, mentre in due casi risulta già fuoriuscito attraverso pori di cui si intravedono i residui dell'ostiolo (freccia) (Contrasto interferenziale; ingrandimento originale 1250 x).

bambini e le cause scatenanti sono probabilmente plurime (venti caldi e polverosi, carenze vitaminiche in particolare da vitamina A, infezioni intercorrenti ecc.) e di solito non ascrivibili alle cause scatenanti l'infezione nei paesi occidentali, come traumi oculari accidentali e utilizzo di lenti a contatto. Una situazione simile a quella riscontrata in Mali e nel Sahel è stata rilevata in India a partire dal 1990, da quando cioè alcuni oftalmologi hanno cominciato ad approfondire il problema delle cheratiti amebiche [34, 35].

La casistica italiana a tutto il 1996 conta un solo caso di encefalite diagnosticato post mortem in un paziente con AIDS [36] e poco più di una dozzina di cheratiti, sia mono che bilaterali, in soggetti portatori di lenti a contatto [37-42]. Di alcuni di questi casi mancano tuttavia sicure conferme microbiologiche, intese come riconoscimento di Acanthamoeba in adeguati campioni biologici ("scraping", biopsia corneale) e/o isolamento del protozoo in vitro.

Balamuthia mandrillaris

B. mandrillaris è l'ameba "free-living" patogena per l'uomo di più recente scoperta e caratterizzazione sia come genere che come specie [15]. Considerate le sue affinità morfologiche con Leptomyxa, uno dei tanti generi viventi nell'ambiente esterno [43, 44], nei primi casi di infezione umana questa ameba era stata provvisoriamente etichettata come "leptomyxid ameba", vale a dire ameba simile o del tipo Leptomyxa [45-47]. In relazione poi anche alle somiglianze, soprattutto per ciò che concerne la fase cistica, con Acanthamoeba è stato dimostrato

retrospettivamente che un discreto numero di casi di encefalite opportunista erroneamente attribuiti nel passato proprio ad *Acanthamoeba* spp. erano in realtà dovuti a *B. mandrillaris* [15].

All'osservazione microscopica ottica [15] i trofozoiti presentano dimensioni assai variabili (15-60 µm) con una lunghezza media di 40 µm. La morfologia più tipica è quella ad aspetto ramificato, con pseudopodi estroflessi in varie direzioni, un po' come si osserva per le forme vegetative di Acanthamoeba, ma decisamente più cospicui in lunghezza e dimensioni (Fig. 7). L'endoplasma è granuloso ed al suo interno il nucleo, di diametro medio di 5 µm, è generalmente unico, vescicoloso, evidenziante un cariosoma di grosse dimensioni. In TEM [15] si osservano numerosi vacuoli e mitocondri "a manubrio" ed un denso endoplasma che sfocia perifericamente nell'ectoplasma ialino; l'endoplasma è ricco di cisterne del RER oltre che di vacuoli e ribosomi, ma non è stato descritto finora un vero e proprio complesso di Golgi. Nello stesso studio sono stati osservati elementi cellulari in fase di divisione nucleare i cui stadi sembrano riconducibili alla metamitosi di Acanthamoeba e delle cellule somatiche in genere [15].

Le cisti sono tendenzialmente sferiche o talora ovoidali, a diametro medio di $15 \, \mu m$ (range: $10\text{-}30 \, \mu m$), mononucleate o talora binucleate, con una parete esterna che in TEM evidenzia tre strati: un'endocisti elettrondensa e più spessa, un'esocisti sottile a morfologia ondulata ed uno spazio intermedio ("mesocisti") fibrillare amorfo [15].

Benché non siano stati ancora pubblicati studi epidemiologici che riferiscano su isolamenti di *Balamuthia* direttamente dall'ambiente, la struttura delle cisti sembra ideale per permettere la sopravvivenza del protozoo anche in condizioni precarie, per cui si ritiene che la diffusione di questa specie sia correlabile, almeno in parte, a quanto dimostrato per *Acanthamoeba*.

Una caratteristica biologica che ha contraddistinto fino a pochi mesi fa *B. mandrillaris* da *N. fowleri* ed *Acanthamoeba* spp. è stata la capacità di questa specie di essere coltivata *in vitro* solo su "monolayers" di linee cellulari continue, in particolare le linee E6 (rene di scimmia) ed MRC-5 (fibroblasti fetali umani), mentre sono risultati sempre infruttuosi i tentativi di isolamento e replicazione sul terreno classico non-nutrient agar "batterizzato" in superficie con sospensione di una specie Gram-, che si è sempre dimostrato il più agevole e semplice per la coltura di *Naegleria* e *Acanthamoeba*, oltre che di svariate altre specie a vita libera. In compenso, recentemente è stato messo a punto un terreno di sintesi in cui ceppi di *B. mandrillaris* ben'si adattano a crescere axenicamente [48].

Anche il fatto di non essere in grado di moltiplicarsi su un terreno banale come l'agar non-nutrient è stato interpretato come un segno che la distribuzione di Balamuthia possa essere più limitata rispetto ad altre

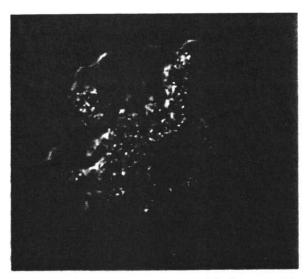


Fig. 7. - Trofozoite di *Balamuthia mandrillaris* con aspetto ramificato dovuto all'emissione di più pseudopodi in varie direzioni. Il copsicuo cariosoma endonucleare appare al centro di un endoplasma grossolanamente granuloso (Contrasto interferenziale; ingrandimento originale 1000 x).

specie [24], ma siamo ancora nel campo delle ipotesi. Il fatto che il parassitismo umano o animale sia emerso molto spesso in estate o in inverno è stato interpretato inoltre più come un fatto casuale che una reale caratteristica stagionale [49]. Infine non è ancora dato di sapere se esistono serbatoi animali preferenziali o se, come sembra più verosimile, l'infezione risulta accidentale ed occasionale allo stesso modo di quanto avviene per *N. fowleri* o *Acanthamoeba* spp.

In riferimento alla casistica essa ammontava a tutto ottobre 1996 a 60 pazienti (A.J. Martinez, comunicazione personale), ribadendo il fatto che la maggior parte di queste infezioni sono state riconosciute a posteriori su preparati istologici di soggetti deceduti prima del riconoscimento di B. mandrillaris come specie a sé stante ed attribuiti in modo erroneo a specie diverse di Acanthamoeba [15, 48]. Nonostante poi i quadri patologici encefalici risultino sovrapponibili a quanto codificato per le acanthamebe e la popolazione colpita sia rappresentata da soggetti con deficit immunologici (compresi pazienti con AIDS), non risulta al momento che B. mandrillaris sia in grado di provocare infezioni a livello oculare.

Quadri clinico-patologici

Meningoencefalite amebica primaria da N. fowleri (MEAP)

Patogenesi.-L'infezione cerebrale da N. fowleri viene acquisita mediante penetrazione diretta del protozoo nella cavità nasale nuotando in piscine riscaldate

artificialmente o in bacini naturali (fiumi, laghi, rogge ecc.), a seguito di inspirazione di acqua nel corso di docce o semplici abluzioni al viso ed anche per aerosol; più raramente mediante veicolazione con terra sollevata dal vento o pulviscolo atmosferico [25] (Fig. 2). Nel caso sia coinvolta acqua inquinata, a temperatura variabile tra i 20-22 °C e 35-37 °C, considerata la termofilia di N. fowleri, è probabile che in molti casi la fase infettante sia costituita direttamente dalle forme vegetative, mentre le cisti sono sicuramente in gioco se l'infezione avviene con la polvere [50, 51] ovvero con aerosol di acqua infetta [23]. Una volta superata la barriera mucosa, verosimilmente attraverso microlesioni, le amebe penetrano e/o vengono fagocitate dalle cellule subtentoriali dell'epitelio neurolfattivo. Nel corso della loro "migrazione" verso il sistema nervoso centrale (SNC), i trofozoiti seguono la via degli spazi mesassonici dei nervi olfattivi amielinici superando la lamina cribrosa dell'etmoide [23]. Questi ultimi terminano a livello dei bulbi olfattivi localizzati nello spazio subaracnoideo che si trova a contatto con il liquido cefalo-rachidiano e risulta ben vascolarizzato. Tale ricchezza di vasi è alla base della disseminazione ematogena delle amebe in fase vegetativa alle diverse porzioni e strutture anatomiche che costituiscono il SNC [23, 52] e della successiva azione patogena sul parenchima nobile che porta al quadro clinico conclamato di MEAP.

Segni e sintomi. - La MEAP è, per definizione, una infezione acuta, molto spesso fulminante. Il periodo di incubazione è breve (5-7 giorni). Il debutto della malattia è brusco e caratterizzato da rinite, cefalea frontale o temporale non responsiva ad analgesici, febbre che si eleva rapidamente (oltre i 39-40 °C), nausea, vomito non di rado "a getto", segni e sintomi di meningite ed encefalite focale o diffusa, ingravescenti in modo incalzante e sfocianti in stato convulsivo spesso accompagnato da emesi, coma ed exitus nel giro di 4-6 giorni per arresto cardiorespiratorio ed edema polmonare [23, 52].

La MEAP è del tutto simile e non distinguibile, soprattutto per ciò che concerne lo stadio iniziale di malattia, da meningiti e meningoencefaliti ad eziologia batterica: convulsioni generalizzate, atassia cerebellare, alterazioni del gusto (ageusia) e dell'olfatto (parosmia) possono essere segni e sintomi anche precoci accompagnati a rigor nucale con segni di Kernig e Babinski positivi. In fase più avanzata è spesso presente fotofobia e può sopravvenire paresi del III, IV e VI nervo craniale come conseguenza di edema ed erniazione encefalica che coesistono con un marcato aumento della pressione endocranica [23].

Approcci diagnostici. - In fase iniziale di malattia le indagini strumentali anche più accurate (tomografia computerizzata, TC; risonanza magnetica nucleare, RMN) possono non essere significative. Peraltro, in

tempi brevi rilevano segni di ipertensione endocranica e "rinforzo" meningeo, soprattutto alla base encefalica, a seguito di iniezione di mezzo di contrasto. Sono anche osservabili aree di minore densità come segno di infarto cerebrale, mentre l'evidenziazione di edema accentuato è un dato indiretto di prognosi infausta [53].

E' frequentemente presente leucocitosi periferica con iperglicemia e glicosuria. Il liquor si presenta purulento e mostra una pleiocitosi in particolare riferibile a polimorfonucleati (PMN), un aumento anche sensibile della proteinorrachia (> 500 mg/dl) ed una diminuzione della glicorrachia. Le colture routinarie per batteri, miceti e virus risultano naturalmente negative (liquor "sterile"), mentre è frequente il reperimento diretto di trofozoiti amebici mobili nel sedimento, che peraltro vanno ben differenziati dalla popolazione macrofagica [23].

Neuropatologia. - All'apertura della scatola cranica gli emisferi cerebrali appaiono diffusamente e notevolmente edematosi, congesti con evidenti erniazioni uncali e cerebellari; le leptomeningi risultano anch'esse iperemiche e congeste, mentre i bulbi olfattori hanno un aspetto necrotico ed emorragico e possono essere ricoperti da essudato purulento [23, 52].

A livello istologico la sostanza grigia corticale appare gravemente e diffusamente interessata. Gli emisferi, il tronco cerebrale, il cervelletto e la parte superiore del midollo spinale presentano ampie zone necrotico-emorragiche con essudato purulento ricco di PMN, ma in cui sono anche presenti eosinofili, linfociti e monociti. Veri e propri ammassi di trofozoiti amebici sono evidenziabili nel parenchima che, in fase avanzata, può essere quasi completamente sostituito da questi (Fig. 8); tipica è inoltre la disposizione a corona delle forme

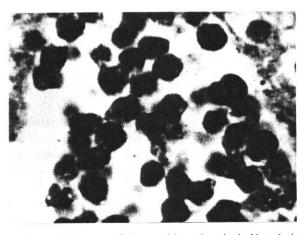


Fig. 8. - Meningoencefalite amebica primaria da Naegleria fowleri: il quadro istologico evidenzia numerosi trofozoiti che hanno praticamente sostituito il parenchima (Colorazione tricromica di Masson; ingrandimento originale 400 x; cortesia del Prof. A.J. Martinez).

vegetative intorno agli spazi perivascolari delle medie e piccole arterie. Un dato differenziale importante rispetto alle encefaliti da *Acanthamoeba* e *B. mandrillaris* è la costante assenza di forme cistiche, anche questo segno istologico indiretto del decorso galoppante della malattia. In alcuni casi le amebe sono state osservate anche nel sistema ventricolare, guadagnato attraverso i forami di Luschka e Magendie e un'ependimite acuta è la conseguenza patologica. Una necrosi emorragica estesa è evidenziabile in neuroni, astrociti e oligodendrociti [52, 53].

Encefalite granulomatosa da Acanthamoeba spp. e B. mandrillaris (GAE)

Patogenesi. - L'encefalite amebica granulomatosa è generalmente secondaria e veicolata per via ematica al SNC dalle forme vegetative presenti in foci primari localizzati a livello polmonare, di ulcere cutanee od anche corneali [23, 52] (Fig. 5). Sono comunque riportati in letteratura casi umani di infezione con patogenesi sovrapponibile alle MEAP, a seguito cioè di passaggio diretto dei protozoi al SNC attraverso l'epitelio neuroolfattorio [52, 53] (Fig. 5); tale possibilità è stata anche dimostrata sperimentalmente nel modello animale a più riprese [54, 55]. Lesioni ulcerative o nodulari non ulcerate della cute in cui sono stati reperiti trofozoiti e cisti amebiche sono state descritte in passato in soggetti deceduti per GAE [56] e questo dato è quasi una costante in casi diagnosticati recentemente in pazienti già in AIDS conclamato o HIV positivi [57, 58]. Significativo per una secondaria diffusione al SNC a partenza oculare rimane il primo caso di cheratite da Acanthamoeba descritto da Jones et al. [59] dal momento che lo stesso paziente ha sviluppato poi una meningoencefalite fatale.

LaGAEda Acanthamoebae B. mandrillaris è da includere a buon diritto nell'ambito delle patologie opportuniste, anche in questo caso tuttavia con eccezioni [23]. La malattia è infatti solitamente riconosciuta in soggetti già affetti da patologie di base (alcolismo, diabete mellito, collagenopatie, AIDS ecc.) o immunode pressi per cause iatrogeniche (chemioterapie o terapie radianti antine oplastiche, cortisonici, terapie antirigetto ecc.) [23, 52].

Segni e sintomi. - Il periodo di incubazione della GAE non risulta mai ben definibile ed è stato stimato in settimane o mesi [23, 52]. Tuttavia, come avviene per molte altre infezioni opportuniste, esso potrebbe essere legato ad una attivazione di forme amebiche già presenti nell'organismo (polmoni) in forma cistica latente. Il debutto della malattia è insidioso ed il decorso è lento, subacuto o più spesso cronicizzante. I segni e sintomi clinici (Tab. 1) sono correlabili a quanto osservabile nelle encefalopatie focali spazio-occupanti e la diagnosi differenziale si pone con forme tumorali, meningite tubercolare od anche encefaliti virali e micotiche. Febbre

contenuta con cefalea persistente sono seguiti gradatamente da rigor nucale, nausea, vomito, emiparesi, alterazioni dello stato mentale, convulsioni, paralisi di alcuni nervi cranici (III e VI), diplopia. In modo progressivo il quadro si complica ulteriormente con segni di atassia cerebrale, alterazioni della personalità, depressione dello stato di vigilanza che sfocia in letargia, coma ed *exitus* [23, 52].

Approcci diagnostici. - L'indagine tomodensitometrica e la RMN non sono di grande ausilio nel rilevare aree multiple di minore densità nella corteccia cerebrale e nelle zone sottocorticali della sostanza bianca. Le caratteristiche del liquor, limpido, sono una spiccata pleiocitosi caratterizzata da abbondante quota linfocitaria e PMN. La glicorrachia è al di sotto dei valori normali, mentre è moderatamente elevata la quota proteica. A differenza di quanto rilevabile nelle forme da N. fowleri, forme vegetative amebiche sono molto raramente osservabili nel sedimento liquorale osservato in microscopia a fresco o dopo colorazioni permanenti. Nei

Tabella 1. - MEAP da *Naegleria fowleri* e GAE da *Acanthamoeba* spp. e *Balamuthia mandrillaris*: principali sintomi e segni

Sintomi	MEAP	GAE
Ipertermia (> 38 °C)	+	+/-
Cefalea	+	+
Nausea e vomito	+	+
Anoressia	+/-	+
Rigor nucale	+	+/-
Convulsioni	+	+
Diplopia e caduta visus	+	+
Fotofobia	+	+
Allucinazioni	+	+
Disturbi del sonno	_	+
Angina	+	140
Rinite	+	-
Ageusia	+	(#4)
Parosmia	+	(=)
Deficit uditivi	-	+
Alterazioni mentali (*)	+	+

Segni	Precoci	Tardivi
Nistagmo	+	+
Papilledema	+	+
Anisocoria	+	+/-
Paralisi nervi cranici (III e VI)	+	+/-
Babinski	+	+
Kernig	+	+
Emiparesi		+
Afasia	*	+
Coma	+	+

^(*) Sonnolenza e letargia, stato stuporoso, disorientamento, ottundimento, delirio, irritabilità ecc. (Modificata da [106]).

casi, frequenti, in cui non si riesca ad arrivare ad una diagnosi precisa è formalmente indicata la biopsia cerebrale in tecnica stereotattica: su frustolo processato per l'indagine istopatologica potranno osservarsi forme vegetative ed anche cistiche di *Acanthamoeba* (Fig. 9) o *B. mandrillaris*, soprattutto in sede perivascolare, sia a seguito di colorazione classica con ematossilina-eosina, sia con ausilio di tecniche specifiche di immunoperossidasi o di immunofluorescenza indiretta [23, 60].

Neuropatologia. - Gli emisferi cerebrali evidenziano un modesto e focale stato edematoso con aree di encefalomalacia corrispondenti a focolai di necrosi emorragica accanto a zone assolutamente indenni. Sono pure osservabili, nelle zone interessate dal processo patologico, appiattimenti delle circonvoluzioni cerebrali e restringimenti dei solchi, così come erniazioni delle tonsille cerebellari. Le strutture della fossa posteriore, diencefalo, talamo e tronco cerebrale risultano le zone più massivamente coinvolté [23, 52]. Le leptomeningi appaiono solo parzialmente interessate e, in questo caso, risultano opacizzate dalla presenza di modeste quantità di essudato purulento.

Microscopicamente si osservano zone emorragiche e di necrosi localizzate, tipicamente circondate da reazione granulomatosa cronica ricca di cellule giganti multinucleate [52]. Sono anche evidenziabili flogosi periarteriolare (angiite), talora associata ad arterite necrotica. Negli spazi perivascolari e nell'ambito del tessuto necrotico sono obiettivabili sia forme amebiche vegetative che cistiche [52].

Patologia oculare da Acanthamoeba spp.

Il primo caso ha visto coinvolto un colono texano che aveva accusato una lesione corneale all'occhio destro provocata accidentalmente mentre lavorava nei campi e che aveva deterso in qualche modo con acqua di rubinetto [59]. Quasi contemporaneamente altri 2 casi di infezione umana venivano descritti da autori inglesi [12]. Fino al 1981 le segnalazioni rimarranno comunque assolutamente sporadiche [61], contribuendo ad avvalorare la tesi che anche questa manifestazione clinica fosse un fatto assolutamente eccezionale e secondario ad evidenti quanto accidentali ulcerazioni traumatiche corneali od anche a contatti di viso e occhi con acqua contaminata [24]. Dal 1985 il quadro della patologia oculare da Acanthamoeba è radicalmente mutato con un incremento impressionante di casi che è risultato strettamente legato, dal punto di vista epidemiologico e patogenetico, all'utilizzo sempre più generalizzato delle lenti a contatto [24, 30]. La loro applicazione ripetuta può provocare nel corso del tempo microtraumi asintomatici od anche uno stato di ipossia che danneggia l'epitelio provocando vere e proprie "porte di entrata" per le amebe, veicolate a

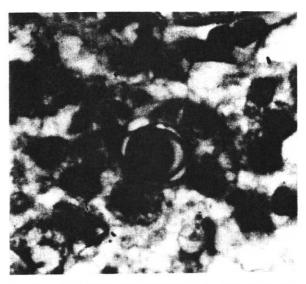


Fig. 9. - Encefalite granulomatosa da Acanthamoeba spp.: nel contesto del parenchima cerebrale è obiettivabile una forma cistica con tipica parete esterna distinta in eso ed endocisti (Colorazione ematossilina-eosina; ingrandimento originale 400 x; cortesia del Prof. A.J. Martinez).

seguito dei lavaggi quotidiani del viso con acqua di rubinetto o con pulviscolo atmosferico o con le lenti stesse quando queste non vengano conservate e trattate prima dell'applicazione all'occhio seguendo basilari norme di igiene [24, 30].

Quadri clinici. - Il debutto clinico della cheratite amebica si differenzia a seconda di quale sia stata la causa scatenante della malattia [23]. Nelle forme, ormai decisamente più rare, secondarie a traumi accidentali con evidenti abrasioni corneali, segni e sintomi presentano una successione più incalzante, mentre i casi più frequenti legati all'uso di lenti a contatto morbide hanno un esordio decisamente più subdolo [23].

Il paziente inizia ad accusare fotofobia, dolore, caduta del visus che si accentuano con il passare dei giorni e si associano ad un quadro obiettivo di iniezione e congestione congiuntivale (limbite). In caso di mancata o errata diagnosi, fatto che nelle prime settimane di malattia è tuttora abbastanza frequente e porta a trattamenti incongrui con antivirali o antibiotici in relazione ad una supposta eziologia "tradizionale" virale (in particolare da virus Herpes) o batterica, i protozoi hanno modo di continuare nella loro azione patogena provocando un infiltrato stromale anulare paracentrale associato a lesioni di tipo dendritico che può complicarsi ulteriormente con opacizzazione, assottigliamento dello stroma e perforazione corneale terminale [23, 60] (Fig. 10). In casi estremi, oltre alla perdita totale del visus nell'occhio interessato, può rendersi necessaria l'ablazione in toto dello stesso globo oculare.

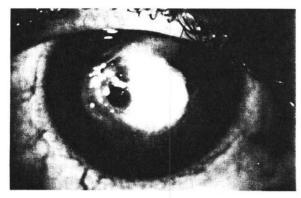


Fig. 10. - Cheratite acanthamebica in occhio destro: denso leucoma all'interno del quale si osserva un descemetocele con grave rischio di perforazione.

(Cortesia del Dr. P. Rama)

Istopatologia. - La valutazione istologica della cornea evidenzia in fase iniziale una modesta infiltrazione flogistica dello stroma a livello delle lamelle superficiali e medie e costituita da PMN, linfociti ed eosinofili che si concentrano in vicinanza od intorno alle amebe, presenti spesso in fase cistica, talora in fase vegetativa [23, 60] (Fig. 11). Possono anche essere obiettivabili, ma in misura minore, macrofagi, plasmacellule e rare cellule giganti multinucleate. Nelle forme di malattia più datate l'indagine bioptica può evidenziare un deficit stromale diffuso o un vero e proprio descemetocele con ricca presenza di protozoi caratterizzati dalla tipica doppia parete con endocisti a morfologia poligonale o festonata nel caso si tratti di forme cistiche e citoplasma vacuolizzato con evidente nucleo e cariosoma cospicuo se in forma vegetativa [23, 60].

Forme AIDS-correlate

Le infezioni AIDS-correlate da amebe a vita libera tendono spesso, come avviene per molti altri patogeni opportunisti, a presentarsi con aspetti clinico-patologici anomali.

Se si eccettua una recente segnalazione di un singolo caso di MEAP [62], in cui peraltro più che il quadro clinico è l'agente protozoario che ha presentato aspetti anomali (presenza di sole fasi flagellate nel sedimento liquorale anche in divisione cellulare, fatto mai documentato prima in *Naegleria*), per cui l'aftribuzione della malattia a *N. fowleri* rimane quantomeno dubbia, le specie amebiche in causa in questi pazienti si sono sempre rivelate *Acanthamoeba* e *B. mandrillaris*. A tutto ottobre 1996, in 46 pazienti era stata riconosciuta un'infezione da *Acanthamoeba*, in 7 da *Balamuthia* (A.J. Martinez, comunicazione personale).

Nonostante alcuni soggetti abbiano palesato all'indagine diagnostica, nella maggior parte dei casi *post mortem*, un classico ed esclusivo coinvolgimento del SNC [36, 63, 64] con quadri istopatologici di GAE,

i quadri clinici delle infezioni da amebe "free-living" nei pazienti con AIDS si caratterizzano spesso con forme disseminate che possono vedere un interessamento del SNC. In compenso, in diversi di questi soggetti si sono osservate localizzazioni, singole o più spesso multiple, cutaneo-dermiche con lesioni ad aspetto polimorfo di tipo eritemato-nodulare non ulcerato, di papula, di pustola, di lesione crostosa od ulcerata, talora associate ad interessamento delle vie respiratorie superiori (mucosa nasale, turbinati, seni paranasali) [57, 58, 65-70].

Recentemente la letteratura ha anche riportato due casi di acanthamebiasi in AIDS caratterizzati rispettivamente da noduli cutanei associati ad uveite e lesione perforante palatina [71] e da interessamento cutaneo, infiltrati polmonari bilaterali ed endoftalmite [72, 73]. Sulla scorta di questa casistica viene avvalorata l'affermazione, evidenziata a livello sperimentale nel modello animale, che cute, derma e vie respiratorie costituirebbero i foci più importanti, oltre che primari, di eventuali disseminazioni ematogene di queste infezioni amebiche opportuniste ad altri organi, segnatamente al SNC.

Diagnostica di laboratorio

La diagnosi di certezza di infezione amebica da *N. fowleri*, *Acanthamoeba* spp. o *B. mandrillaris* è ottenibile in laboratorio con metodiche varie riconoscibili essenzialmente in: ricerca microscopica diretta dei

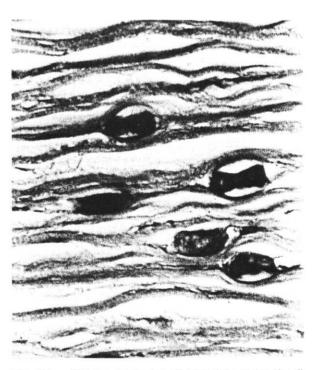


Fig. 11. - Quadro istologico di biopsiato corneale di paziente con cheratite acanthamebica: alcuni protozoi sono visibili nello stroma lamellare (Colorazione PAS; ingrandimento originale 630 x).

protozoi su preparati a fresco o colorati, valutazione istopatologica classica o a seguito di applicazione di tecniche immunologiche ed immunoistochimiche, coltura *in vitro*, prova biologica.

La ricerca diretta "a fresco" di forme vegetative ameboidi può risultare utile se eseguita su liquido cefalorachidiano in caso di sospetta meningoencefalite acuta da *N. fowleri*, mentre risulta eccezionale in casi di GAE opportunista da *Acanthamoeba* o *Balamuthia*.

Appena eseguita la puntura lombare il liquor va inviato al laboratorio, centrifugato sterilmente a bassa velocità (250 g) per alcuni minuti (5-8) allo scopo di non danneggiare gli eventuali trofozoiti presenti. Alcune gocce del sedimento vanno poi poste su vetrino, coperte da coprioggetto ed osservate preferibilmente in microscopia in contrasto di fase. In caso di positività i trofozoiti di N. fowleri (Fig. 3) saranno riconoscibili in base alle loro peculiarità citologiche quali il grosso cariosoma endonucleare, l'emissione "eruttiva" di cospicui pseudopodi che dettano il movimento, l'eventuale presenza di vacuolo pulsante, tutte caratteristiche che debbono contribuire ad una diagnosi differenziale con macrofagi vitali che pure possono essere presenti nel sedimento liquorale. Aliquote dello stesso liquor possono essere strisciate su vetrino, fatte asciugare all'aria, fissate in metanolo e colorate con tecniche quali Giemsa, Giemsa-Wright o tricromiche [23, 52, 74].

Nelle forme di sospetta MEAP in cui l'esame diretto del liquor non risulti dirimente e, di regola, nelle encefaliti croniche da Acanthamoeba o B. mandrillaris una diagnosi di certezza si pone più agevolmente a seguito di esame istologico del parenchima cerebrale ottenuto con biopsia stereotattica o di valutazione istopatologica post mortem. Le fettine, colorate con ematossilina-eosina od acido periodico-Schiff (PAS) o tecniche tricromiche, mostrano quadri differenziali importanti: in caso di infezione da N. fowleri ampie zone di parenchima risultano spesso letteralmente invase od addirittura sostituite da grossi "clusters" di soli trofozoiti amebici (Fig. 8), mentre le forme di GAE si caratterizzano per una minore invasività della popolazione amebica, la presenza sia di trofozoiti che di cisti (Fig. 9) e la tipica reazione granulomatosa secondaria. Comune ad entrambe le forme patologiche cerebrali è il frequente reperimento di protozoi in sede perivascolare [23, 57, 74].

In caso di sospetta cheratite le acanthamebe possono venire ricercate anche su materiale ottenuto da "scraping" oltre che in biopsiato corneale, previamente colorati anch'essi con le tecniche sopra citate: nel primo caso è possibile visualizzare le forme cistiche con il loro tipico aspetto parietale festonato o poligonale (Fig. 12), mentre nei preparati istologici le amebe sono eventualmente obiettivabili in sede infralamellare [23, 52, 60] (Fig. 11). In riferimento specifico ai pezzi bioptici corneali, una metodica rapida di riconoscimento di *Acanthamoeba* consiste nel colorare le fettine sparaffinate con Calcofluor

bianco allo 0,1% controcolorando con blu Evans ed osservando i preparati in microscopia a fluorescenza [75]. La sensibilità di questa metodica viene aumentata ove si proceda a parziale digestione enzimatica con tripsina, collagenasi e ialuronidasi dello stroma corneale [75].

La semplice valutazione istopatologica a livello cerebrale ed oculare può essere integrata da metodiche più sofisticate, anche se più indaginose, riconoscibile nella applicazione dell'analisi del preparato mediante immunofluorescenza indiretta utilizzando antisieri specifici di coniglio (anti-N. fowleri, Acanthamoeba spp., B. mandrillaris) coniugati con fluoresceina [74, 75]. Tale tecnica e stata con successo applicata anche su preparati ottenuti da "scraping" corneale [76]. Ugualmente valide si sono dimostrate le metodiche immunoistochimiche (immunoperossidasi) [77-80].

Le indagini intese alla evidenziazione microscopica diretta dei protozoi eventualmente presenti in campioni biologici vari andrebbero, se appena possibile, sempre integrate dal tentativo di isolamento in vitro su terreni di sintesi o "monolayers" di linee cellulari. Il terreno non-nutrient agar 1,5-3% distribuito a becco di clarino in provetta o meglio a piatto in piastre petri, batterizzato in superficie con sospensione viva od uccisa al calore (56 °C per 1h) di una specie batterica Gram-(preferibilmente E. coli o E. aerogenes) che costituirà il supporto nutritivo per le amebe, rappresenta tuttora il "medium" di base più utilizzato per Naegleria ed Acanthamoeba [74, 80]. Sedimenti liquorali, frammenti bioptici, tamponi nasali, materiale ottenuto da grattato corneale o lesioni cutanee una volta posti sul letto di agar vanno incubati a 35-37 °C e le cellule andranno osservate giornalmente sotto microscopio rovesciato per non meno

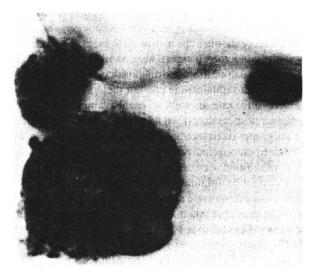


Fig. 12. - "Scraping" corneale: tre forme cistiche di *Acanthamoeba* sono obiettivabili nel campo microscopico; in quella centrale si apprezza bene la morfologia poligonale dell'endocisti (Colorazione PAS; ingrandimento originale 630 x).

di 21 giorni prima di affermare una negatività della coltura. Al contrario, in caso di crescita amebica, le forme vegetative tendono a moltiplicarsi verso i margini esterni della piastra poiché è perifericamente che le nuove generazioni di trofozoiti trovano di volta in volta nutrimento batterico da fagocitare. Man mano che la coltura "invecchia" le amebe tendono ad incistarsi, per cui questo stesso terreno ben si presta anche a questo scopo.

A differenza di *N. fowleri* e delle varie specie di *Acanthamoeba*, *B. mandrillaris* non è suscettibile alla crescita su agar non-nutrient, mentre è in grado di moltiplicarsi agevolmente su varie linee cellulari [15].

In riferimento a *Naegleria* ed *Acanthamoeba* si dispone da tempo anche di vari terreni di sintesi monofasici liquidi che, opportunamente antibiotati nel caso il ceppo amebico risulti "accompagnato" da contaminanti batterici, permettono una crescita axenica degli isolati [80-82] che rappresenta un *pabulum* ottimale anche per eventuali test di farmacologia sperimentale. E' del tutto recente invece la messa a punto di un *medium* sintetico per *B. mandrillaris* [49].

Per una diagnosi di certezza si può anche ricorrere alla prova biologica nel topo: disponendo di liquor od altro materiale biologico sicuramente sterile per ciò che concerne flora batterica o micotica e agenti virali, si può infettare l'animale direttamente per via intracranica nel caso si sospetti un'infezione da *N. fowleri* o *Acanthamoeba* [83] o anche per via intraperitoneale nell'ipotesi di una forma patologica da *B. mandrillaris* [56]. La via "naturale" di infezione mediante instillazione nasale di liquor o filtrato di altro materiale biologico sospetto può provocare ugualmente un'infezione nell'animale, mail tempo perché essa si manifesti, soprattutto se sono in causa *Acanthamoeba* spp. o *B. mandrillaris*, risulta molto più prolungato.

L'avvento delle tecniche di caratterizzazione immunologica, biochimica e biomolecolare ha permesso in anni recenti, oltre che un rimodellamento generale per ciò che concerne gli aspetti tassonomici, talora anche la loro applicazione in ambito diagnostico, pur se è d'obbligo la consueta segnalazione che tali metodologie possono essere utilizzate in routine esclusivamente da centri altamente specializzati ed adeguatamente equipaggiati. Vari gruppi di ricerca si sono cimentati dapprima nella messa a punto, quindi nell'applicazione di varie metodiche -immunofluorescenza con anticorpi monoclonali, analisi isoenzimatica, immunoblotting, reazione PCR [84-88] -che si sono dimostrate altamente specifiche non tanto per ciò che concerne una diagnosi di genere quanto per una corretta diagnosi di specie.

Terapia e misure profilattiche

Le infezioni da amebe a vita libera, in particolare quelle ad esclusiva espressività clinica cerebrale da *Acanthamoeba* e *B. mandrillaris*, si caratterizzano tuttora per la assenza di presidi terapeutici efficaci e ciò ha comportato che la quasi totalità dei casi di GAE finora descritti in letteratura sono esitati nel decesso dei pazienti [60]. Numerosi test di sensibilità *in vitro* ed anche nel modello animale condotti su ceppi diversi di *Acanthamoeba* [89-95] e, più recentemente, anche su *B. mandrillaris* [49], hanno rivelato un'efficacia amebostatica o amebicida di varie sostanze (sulfadiazina, polimixina B ed E, 5-fluorocitosina, composti fenotiazinici, pentamidina, α-DFMO, sinefungina, derivati acridinici, maigainine ecc.) che tuttavia non è mai stata confermata, e talora neppure testata, su soggetti umani affetti da GAE.

Per ciò che concerne la meningoencefalite acuta da N. fowleri, questa specie protozoaria si è invece dimostrata, oltre che sperimentalmente [96-100], sufficientemente responsiva ad alcuni farmaci anche nelle forme di malattia umana, in particolare ad anfotericina B (ANF-B), specie se associata a rifampicina e/o miconazolo [53, 60]. Il trattamento con ANF-B in dosi variabili tra 0,75-1,5 mg/kg/die, somministrata per via endovenosa (EV) ed intratecale o intraventricolare, associata in 4 casi a rifampicina orale, in 1 caso anche a miconazolo (EV ed intratecale), ha permesso la risoluzione clinica di MEAP in sette pazienti [53]. E' ipotizzabile a questo proposito che altri soggetti affetti da MEAP avrebbero potuto positivamente rispondere ad ANF-B somministrata singolarmente o in associazione, se in tutti i casi segnalati la diagnosi eziologica fosse stata definita nei primissimi giorni o addirittura al debutto del quadro clinico.

Contrariamente a ciò che avviene nelle forme di GAE ed a quanto si è dovuto osservare per vari anni a seguito della codificazione della cheratite da *Acanthamoeba*, da qualche tempo le associazioni di alcuni farmaci ad uso topico e sistemico si sono dimostrate efficaci nel guarire radicalmente queste forme morbose oculari, pur se il trattamento va prolungato spesso per mesi e non sono rari i fenomeni di intolleranza legati alla tossicità delle sostanze utilizzate [30, 60]. Anche in questi casi inoltre il successo terapeutico farmacologico è spesso legato alla precocità di una corretta diagnosi eziologica che scongiura, tra l'altro, gravi complicanze quali, prima fra tutte, la perforazione corneale.

Ripetutamente efficaci in casi umani si sono dimostrati la somministrazione topica di propamidina isetionato 0,1% associata a collirio a base di polimixina B, neomicina e gramicidina ovvero ad una soluzione allo 0,02% di poliesametilenbiguanide (PHMB) [30]. Si è solitamente dimostrata utile anche la prescrizione contemporanea di derivati azolici (fluconazolo, itraconazolo, ketoconazolo) per via orale [30]. La recente segnalazione della resistenza di alcuni ceppi di *Acanthamoeba* a PHMB [101, 102] ha suggerito ad alcuni autori l'utilizzo alternativo, sempre in associazione a propamidina, di un altro biguanide quale la clorexidina digluconato anch'essa in soluzione 0,02% [103]. Sulla scorta di preliminari esperienze di autori

francesi, si sta rivelando promettente l'utilizzo topico di un altro derivato diamidinico quale l'esamidina in soluzione allo 0.1% [104].

In relazione infine alle forme disseminate AIDS-correlate con prevalente coinvolgimento cutaneo ed assenza di concomitante interessamento del SNC è da sottolineare la segnalazione di Slater *et al.* [105] in riferimento a un singolo caso di acanthamebiasi da *A. rhysodes* risoltosi radicalmente con protocollo terapeutico costituito da pentamidina isetionato (4 settimane EV in dose di 4 mg/kg/die) seguito da itraconazolo *per os* (200 mg/die poi 100 mg a dì alterni) per alcune settimane, associati a terapia locale delle lesioni cutanee diffuse con ketoconazolo in crema al 2%. Il follow-up clinico a diversi mesi ha mostrato la persistente scomparsa delle ulcere cutanee e la guarigione è stata ulteriormente confermata dalla caduta progressiva del sierotitolo anticorpale [105].

In riferimento alla prevenzione, il discorso va differenziato: le infezioni acute del SNC da N. fowleri vanno prevenute evitando di esercitare il nuoto, anche occasionale, in piscine e tanto meno in bacini naturali di acqua dolce come laghi e fiumi che presentino una temperatura dell'acqua elevata e, soprattutto, non diano garanzie sufficienti di igiene. In particolare vanno preferenziate le piscine a ricambio continuato dell'acqua soprattutto a livello dei fondali e con debordamento continuo della superficie che, comunque, devono essere regolarmente controllate per ciò che concerne il tasso di sostanze disinfettanti. Il National Health and Medical Research Council australiano, alla luce di diversi casi di MEAP segnalati in quel paese, raccomanda una concentrazione di cloro attivo di 1 mg per litro di acqua quando questa raggiunga al massimo temperature di 26 °C. Le dosi di cloro vanno poi aumentate a 2 g/l ed a 3 g/l ove la temperatura dell'acqua superi rispettivamente i 26 ed i 28 °C [60].

La profilassi ed il controllo delle forme di GAE risultano molto più ardue, se non inattuabili, alla luce del fatto che tale patologia si sviluppa in relazione a stati di immunodepressione patologica o iatrogena e la malattia è verosimilmente legata al "risveglio" di ceppi protozoari precedentemente silenti nel santuario organico rappresentato dal polmone ed anche dalla cute.

Quanto infine alle forme di cheratite da Acanthamoeba, dal momento che oggi la popolazione nettamente più a rischio è rappresentata dai portatori di lenti a contatto, questi vanno adeguatamente e ripetutamente "educati" sulla necessità di osservare in ogni occasione scrupolose, quanto banali, norme di igiene proscrivendo il risciacquo delle lenti stesse sotto acqua di rubinetto, il fare docce o bagni con le lenti applicate, conservarle nei contenitori e lavarle quotidianamente utilizzando soluzioni saline sterili del commercio.

Ricevuto il 3 marzo 1997. Accettato il 2 giugno 1997.

BIBLIOGRAFIA

- PAGE, F.C. 1974. Rosculus ithacus Hawes, 1963 (Amoebida, Flabellulidae) and the amphizoic tendency in amoebae. Acta Protozool. 13: 143-154.
- CULBERTSON, C.G., SMITH J.W. & MINNER J.R. 1958. Acathamoeba: observations on animal pathogenicity. Science 127: 1506.
- FOWLER, M. & CARTER, R.F. 1965. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* spp.: a preliminary report. *Br. Med.* J. 2: 240-242.
- BUTT, C.G. 1966. Primary amebic meningoencephalitis. N. Engl. J. Med. 274: 1473-1476.
- BUTT, C.G., BARO, C. & KNORZ, R.W. 1968. Naegleria (sp.) identified in amebic encephalitis. Am. J. Clin. Pathol. 50: 568-574.
- CARTER, R.F. 1968. Primary amoebic meningo-encephalitis: Clinical, pathological, and epidemiological features of six fatal cases. J. Pathol. Bacteriol. 96: 1-25.
- CALLICOTT, J.H., NELSON, E.C. JONES, M.M., DOS SANTO,S J.G., UTZ, J.P., DENNA, R.J. & MORRISON, J.V. 1968. Meningoencephalitis due to pathogenic free-living amoebae. J. Am. Med. Assoc. 206: 579-582.
- CARTER, R.F. 1970. Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J. Pathol.* 100: 217-244.
- KENNEY, M. 1971. The micro-kolmer complement fixation test in routine screening for soil ameba infection. *Hlth. Lab. Sci.* 8: 5-10.
- JAGER, B.V. & STAMM, W.P. 1972. Brain abscess caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *Lancet* ii: 1343-1345.
- ROBERT, U.B. & RORKE, L.B. 1973. Primary amebic encephalitis, probabily from Acanthamoeba. Ann. Intern. Med. 79: 174-179.
- NAGINGTON, J., WATSON, P.G., PLAYFAIR, T.J., MCGILL, J., JONES, B.R. & STEELE, A.D. 1974. Amoebic infection of the eye. *Lancet* ii: 1537-1540.
- MARTINEZ, A.J. 1980. Is Acanthamoeba encephalitis an opportunistic infection? Neurology 30: 567-574.
- MARTINEZ, A.J., GARCIA, C.A., HALKS-MILLER, M. & ARCE-VELA, M. 1980. Granulomatous amebic encephalitis presenting as cerebral mass lesion. *Acta Neuropathol*. (Berlin) 51: 85-91
- VISVESVARA, G.S., SCHUSTER, F.L. & MARTINEZ, A.J. 1993. Balamuthia mandrillaris N.G., N.sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. J. Euk. Microbiol. 40: 504-514.
- KENNEDY, S.M., DEVINE, P., HURLEY, C., OOI, Y.S. & COLLUM, L.M.T. 1995. Corneal infection associated with Hartmannella vermiformis in contact-lens wearer. Lancet 346: 637-638.

- AITKEN, D., HAY J., KIRKNESS, C.M., LEE, W.R. & SEAL, D.V. 1996. Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmannella* infection. *Ophthalmology* 103: 485-494.
- SINGH, B.N. & DAS S. 1972. Intra-nasal infection of mice with flagellate stage of *Naegleria aerobia* and its bearing on epidemiology of human meningo-encephalitis. *Curr. Sci.* 41: 625-628.
- JOHN, D.T., COLE, T.B. JR & JOHN, R.A. 1985. Amebostomes of Naegleria fowleri. J.Protozool. 32: 12-19.
- WILLAERT, E. 1976. Etude immuno-taxonomique des genres Naegleria et Acanthamoeba (Protozoa: Amoebida). Acta Zool. Pathol. Antwerp. 65: 1-239.
- JOHN, D.T. 1993. Opportunistically pathogenic free-living amebae. In: *Parasitic Protozoa*. 2. ed. J.P.Kreier, & J.R.Baker (Eds). Academic Press, New York. p. 143-246.
- SCHUSTER, F.L. 1975. Ultrastructure of cysts of Naegleria spp. A comparative study. J. Protozool. 22: 352-359.
- MA, P., VISVESVARA, G.S., MARTINEZ, A.J., THEODORE, F.H., DAGGETT, P.M. & SAWYER, T.K. 1990. Naegleria and Acanthamoeba infections: review. Clin. Infect. Dis. 12: 490-513.
- VISVESVARA, G.S. & STHER-GREEN, J. 1990. Epidemiology of free-living ameba infection. J. Protozool. 37: 25S-33S.
- MARTINEZ, A.J. 1985. Free-living amebas: natural history, prevention, diagnosis, pathology and treatment of disease. CRC Press Publ., Boca Raton, FL.
- CERVA, L., NOVAK, K. & CULBERTSON, C.G. 1968. An outbreak of acute fatal amebic meningoencephalitis. Am. J. Epidemiol. 88: 436-444.
- RONDANELLI, E.G. & SCAGLIA, M. 1987. Pathogenic amphizoic amoebae (*Naegleria fowleri - Acanthamoeba* spp.).
 Morphology and cytology. In: *Amphizoic amoebae. Human pathology*. E.G. Rondanelli (Ed.). Piccin, Padova. p. 49-85.
- RONDANELLI, E.G., CAROSI, G., LANZARINI, P. & FILICE, G. 1987. Ultrastructure of Acanthamoeba - Naegleria free-living amoebae. In: Amphizoic amoebae. Human pathology. E.G. Rondanelli (Ed.). Piccin, Padova. p. 87-125.
- RADFORD, C.F., BACON, A.S., DART, J.K.G. & MINASSIAN, D.C. 1995. Risk factors for *Acanthamoeba* keratitis in contact lens users: a case-control study. *Brit. Med. J.* 310: 157-1570.
- 30. KILVINGTON S. & WHITE, D.G. 1994. Açanthamoeba: biology, ecology and human disease. Rev. Med. Microbiol. 5: 12-20.
- ANAND, C.M., SKINNER, A.R., MALIC, A. & KURTZ, J.B. 1983. Interaction of L. pneumophila and a free-living amoeba (Acanthamoeba palestinensis). J. Hyg. Camb. 91: 167-178.
- HALL, J. & VOELZ, H. 1985. Bacterial endosymbionts of Acanthamoeba sp. J. Parasitol. 71: 89-95.
- FRITSCHE, T.R., GANTOM, R.K., SEYEDIRASHTI, S., BERGERON, D.C. & LINDQUIST, T.D. 1993. Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from nasal and environmental specimens and contact lenses. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1222-1226.

- SHARMA, S., SRINIVASAN, M. & GEORGE, C. 1990. Diagnosis of Acanthamoeba keratitis: a report of four cases and review of literature. Ind. J. Ophthalmol. 38: 50-56.
- SHARMA, S., SRINIVASAN, M. & GEORGE, C. 1990. Acanthamoeba keratitis in non-contact lens wearers. Arch. Ophthalmol. 108: 676-678.
- DIGREGORIO, C., RIVASI, F., MONGIARDO, N., DERIENZO, B., WALLACE, S. & VISVESVARA, G.S. 1992. Acanthamoeba meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. Arch. Pathol. Lab. Med. 116: 1363-1365.
- 37. RASSU, M., BENZI, G., PUGINA, P., BORDIN, P., SICHIROLLO, R., MERLIN, U. & BERTOLONI, G. 1993. Cheratite da Acanthamoeba: secondo caso in Italia. Microbiol. Med. 8: 26-28.
- 38. DETTORI, G., VIANI, I., BRACCIO, L., CALDERARO, A., POLONELLI, L., CHEZZI, C. & MARAINI, G. 1993. Isolamento, a Parma, di un ceppo di Acanthamoeba dal raschiato corneale e dal liquido di lavaggio delle lenti a contatto di una paziente con cheratite. In: Atti del Primo congresso nazionale Società Italiana Microbiologia Medica e Odontoiatria Clinica. Pisa, 18-19 giugno 1993. p. 83.
- SICHIROLLO, R., BORDIN, P., PARESCHI, A., MERLIN, U., PUGINA, P., BENZI, G. & RASSU, M. 1993. Cheratite bilaterale da *Acanthamoeba* in pazienti portatori di lenti a contatto per cheratocono: due casi. *Contattol. Med. Chir. Refratt.* 15: 149-153.
- BIAVASCO, F., MANSO, E., GIOVANNINI, A., FRONGIA, G., SCAGLIA, M., LUPIDI, R., GIOVANNETTI, E., TITTARELLI, R., STEELE, A.D., VISVESVARA, G.S. & VARALDO, P.E. 1994. Bilateral Acanthamoeba keratitis. Clin. Infect. Dis. 18: 661-662.
- RIVASI, F., LONGANESI, L., CASOLARI, C., CROPPO, G.P., PIERINI, G., ZUNARELLI, E. & VISVESVARA, G.S. 1995. Cytologic diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. Report of a case with correlative study with indirect immunofluorescence and scanning electron microscopy. *Acta Cytol.* 39: 821-826.
- RAMA, P., DIONISI, P.M., PENSO, G., CEVINI, C., GATTI, S. & SCAGLIA M. 1995. Patologia oculare da *Acanthamoeba*: un problema emergente anche in Italia. *Giorn. It. Mal. Inf.* 1: 299-355.
- PUSSARD, M. & PONS, R. 1976. Etude des genres Leptomyxa et Gephyramoeba (Protozoa, Sarcodina). I. Leptomyxa reticulata Goodey, 1915. Protistologica 12: 151-168.
- PUSSARD, M. & PONS, R. 1976. Etude des genres Leptomyxa et Gephyramoeba (Protozoa, Sarcodina). II. Leptomyxa flabellata Goodey, 1915. Protistologica 12: 307-319.
- 45. VISVESVARA, G.S., MARTINEZ, A.J., SCHUSTER, F.L., LEITCH, G.J., WALLACE, S.V., SAWYER, T.K. & ANDERSON, M. 1990. Leptomyxid ameba, a new agent of amebic meningoencephalitis in humans and animals. J. Clin. Microbiol. 28: 2750-2756.
- ANZIL, A.P., CHAUDRAKANT, R., WRZOLEK, M.A., VISVESVARA, G.S., SHER, J.H. & KOZLOWSKI, P.B. 1991.
 Amebic meningoencephalitis in a patient with AIDS caused by a newly recognized opportunistic pathogen. Leptomyxid ameba. Arch. Pathol. Lab. Med. 115: 21-25.
- 47. TARATUTO, A.L., MONGES, J., ACEFE, J.C., MELI, F., PAREDES, A. & MARTINEZ, A.J. 1991. Leptomyxid ameba encephalitis: report of the first case in Argentina. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85: 77.

- SCHUSTER, F.L. & VISVESVARA, G.S. 1996. Axenic growth and drug sensitivity studies of *Balamuthia mandrillaris*, an agent of amoebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J. Clin. Microbiol.* 34: 385-388.
- ROWEN, J.L., DOERZ, C.A., VOGEL, H. & BAKER, C.J. 1995. Balamuthia mandrillaris: a newly recognized agent of amoebic meningoencephalitis in humans and other animals. Pediatr. Infect. Dis. J. 14: 705-710.
- LAWANDE, R.V., ABRAHAM, S.N., JOHN, I. & EGLER, L.J. 1979. Recovery of soil amebas from the nasal passage of children during the dusty harmattan period in Zaria. Am. J. Clin. Pathol. 71: 201-203
- LAWANDE, R.V. 1983. Recovery of soil amebae drom the air during the harmattan in Zaria, Nigeria. Ann. Trop. Med. Parasitol. 77: 45-48.
- MARTINEZ, A.J. 1993. Free-living amebas: infection of the central nervous system. Mount Sinai J. Med. 60: 271-278.
- 53. BARNETT, N.D.P., KAPLAN, A.M., HOPKIN, R.J., SAUBOLLE, M.A. & RUDINSKY, M.F. 1996. Primary amoebic meningoencephalitis with *Naegleria fowleri*: clinical review. *Pediatr. Neurol.* 15: 230-234.
- 54. MARTINEZ, A.J., MARKOWITZ, S.M. & DUMA, R.J. 1975. Experimental pneumonitis and encephalitis caused by Acanthamoeba in mice: pathogenesis and ultrastructural features. J. Infect. Dis. 131: 692-699.
- 55. JANITSCHKE, K., MARTINEZ, A.J., VISVESVARA, G.S. & SCHUSTER, F. 1996. Animal model *Balamuthia mandrillaris* CNS infection: contrast and comparison in immunodeficient and immunocompetent mice. A murine model of "granulomatous" amebic encephalitis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55: 815-821.
- GULLETT, J., MILLS, J., HADLEY, K., PODEMSKI, B., PITTS,
 L. & GELBER, R. 1979. Disseminated granulomatous Acanthamoeba infection presenting an unusual skin lesion. Am. J. Med. 67: 891-895.
- 57. WILEY, C.A., SAFRIN, R.E., DAVIS, C.E., LAMPERT, P.W., BRANDE, A.I., MARTINEZ, A.J. & VISVESVARA, G.S. 1987. Acanthamoeba meningoencephalitis in a patient with AIDS. J. Infect. Dis. 155: 130-13.
- TAN, B., WELDON-LINNE, C.M., RHINE, D.P., PENNING, C.L. & VISVESVARA, G.S. 1993. Acanthamoeba infection presenting as skin lesions in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Arch. Pathol. Lab. Med. 117: 1043-1046.
- JONES, D.B., VISVESVARA, G.S. & ROBINSON, N.M. 1975.
 Acanthamoeba polyphaga keratitis and Acanthamoeba uveitis associated with fatal meningoencephalitis. Trans. Ophthalmol. Soc. UK 95: 221-232.
- MARTINEZ, A.J. & VISVESVARA, G.S. 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol.* 7: 583-598.
- MA, P., WILLAERT, E., JUECHTER, K.B. & STEVENS, A.R. 1981. A case of keratitis due to *Acanthamoeba* in New York and features of 10 cases. *J. Infect. Dis.* 143: 662-667.
- 62. CLAVEL, A., FRANCO, L., LETONA, S., CUESTA, J., BARBERA, A., VAREA, M., QUILEZ, J., CASTILLO, F.J. & GOMEZ-LUS, R. 1996. Primary amebic meningoencephalitis in a patient with AIDS: unusual protozoological findings. *Clin. Infect.* Dis. 23: 1314-1315.

- ROBINSON, G., WILSON, S.E. & WILLIAMS, R.A. 1987. Surgery in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Arch. Surg. 122: 170-175.
- 64. GARDNER, H.A.R., CHIR, M.B., MARTINEZ, A.J., VISVESVARA, G.S. & SOTRAL, A. 1991. Granulomatous amebic encephalitis in an AIDS patient. *Neurology* 41: 1993-1995.
- GONZALES, M.M., GOULD, E., DICKINSON, G., MARTINEZ, A.J., VISVESVARA, G.S., CLAERY, T.J. & HENSLEY, G.T. 1986. Acquired immunodeficiency syndrome associated with Acanthamoeba infection and other opportunistic organisms. Arch. Pathol. Lab. Med. 110: 749-751.
- MAY, L.P., SIDHU, G.S. & BUCHNESS, M.R. 1992. Diagnosis of Acanthamoeba infection by cutaneous manifestations in a man seropositive to HIV. J. Am. Acad. Dermatol. 26: 352-355.
- FRIEDLAND, L.R., RAPHAEL, S.A., DEUTSCH, E.S., JOHAL, J., MARTIN, L.J., VISVESVARA, G.S. & LISCHNER, H.W. 1992. Disseminated Acanthamoeba infection in a child with symptomatic human immunodeficiency virus infection. Pediatr. Infect. Dis. J. 11: 404-407.
- 68. KHALIFE, G.E., PAMBUCCIAN, S.E., VISVESVARA, G.S. & HORTEN, B. 1994. Disseminated Acanthamoeba infection masquerading as bacillary angiomatosis in a patient with AIDS. Int J. Surg. Pathol. 2: 11-16.
- SISON, J.P., KAMPER, C.A., LOVELESS, M., MCSHANE, D., VISVESVARA, G.S. & DERESINSKI, S.C. 1995. Disseminated Acanthamoeba infection in patients with AIDS: case reports and review. Clin. Infect. Dis. 20: 1207-1216.
- MURAKAWA, G.J., MCCALMONT, T., ALTMAN, J., TELANG, G.H., HOFFMAN, M.D., KANTOR, G.R. & BERGER, T.G. 1995. Disseminated acanthamebiasis in patients with AIDS. Arch. Dermatol. 131: 1291-1296.
- DELUOL, A.M., TEILHAC, M.F., POIROT, J.L., MASLO, C., LUBOINSKI, J., ROZENBAUM, W. & CHATELET, F.P. 1996. Cutaneous lesions due to *Acanthamoeba* in a patient with AIDS. J. Euk. Microbiol. 43: 130S.
- TELANG, G.H., SCOLA, F., KANTOR, G.R., STIERITZ, D. & REBOLI, A.C. 1996. Disseminated *Acanthamoeba* infection in a patient with AIDS. *Infect. Dis. Clin. Pract.* 5: 387-389.
- HEFFLER, K.F., ECKHARDT, T.J., REBOLI, A.C. & STIERITZ,
 D. 1996. Acanthamoeba endophthalmitis in acquired immunodeficiency syndrome. Am. J. Ophthalmol. 122: 584-586.
- MARTINEZ, A.J. & VISVESVARA, G.S. 1991. Laboratory diagnosis of pathogenic amoebas: Naegleria, Acanthamoeba and Leptomyxid. Clin. Lab. Med. 11: 861-872.
- SILVANY, R.E., LUCKENBACK, M.A. & MOORE, M.B. 1987.
 The rapid detection of *Acanthamoeba* in paraffin-embedded sections of corneal tessue with Calcofluor white. *Arch. Ophthalmol.* 105: 1366-1367.
- EPSTEIN, R.J., WILSON, L.A., VISVESVARA, G.S. & PLOURADE, E.G. 1986. Rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis from corneal scrapings using indirect fluorescent antibody staining. *Arch. Ophthalmol.* 104: 1318-1321.
- CULBERTSON, C.G. 1975. Soil ameba infection. Specific indirect immunoenzymatic (Peroxidase) staining of formalin-fixed paraffin sections. Am. J. Clin. Pathol. 63: 475-482.

- CULBERTSON, C.G. & HARPER, K. 1977. Immunoperoxidase staining of *E. histolytica* and soil amebas in formalin-fixed tissue. *Am. J. Clin. Pathol.* 68: 529.
- CURSONS R.,T.M., BROWN T.J. & CULBERTSON, C.G. 1976. Immunoperoxidase staining of trophozoites in primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet* i: 223-224.
- VISVESVARA, G.S. 1987. Laboratory diagnosis. In: Amphizoic amoebae. Human pathology. E.G. Rondanelli (Ed.). Piccin, Padova. p. 193-215.
- DE JONCKHEERE, J. 1977. Use of axenic medium for differentiation between pathogenic and nonpathogenic Naegleria floweri isolates. Appl. Environm. Microbiol. 33: 751-757.
- HAIGHT, J.B. & JOHN, D.T. 1980. Growth of Naegleria fowleri in several axenic media. Folia Parasitol. 27: 207-212.
- MARTINEZ, A.J. & SCAGLIA, M. 1987. Experimental infections (Animal model). In: Amphizoic amoebae. Human pathology. E.G. Rondanelli (Ed.). Piccin, Padova. p. 240-246.
- 84. VISVESVARA, G.S., PERALTA, M.J., BRANDT, F.H., WILSON, M., ALOISIO, C. & FRANKO, E. 1987. Production of monoclonal antibodies to *Naegleria floweri*, agent of primary amebic meningoencephalitis. J. Clin. Microbiol. 25: 1629-1634.
- MATIAS, R., SCHOTTELINS, J., RADDATZ, CH.F. & MICHEL, R. 1991. Species identification and characterization of an Acanthamoeba strain from human cornea. Parasitol. Res. 77: 469-474.
- PERNIN, P., HULLO, A., OMAR, S. & PUSSARD, M. 1992. Kératite amibienne à *Acanthamoeba*. Etude morphologique et isoenzymatique d'une souche isolée d'un cas traité médicalement. *Bull. Soc. Path. Ex.* 85: 226-231.
- MOURA, H., WALLACE, S. & VISVESVARA, G.S. 1992.
 Acanthamoeba healyi N.sp. and the isoenzyme and immunoblot profiles of Acanthamoeba spp., group 1 and 3. J. Parasitol. 39: 573-583.
- VODKIN, M.H., HOWE, D.K., VISVESVARA, G.S. & MCLAUGHLIN, G.C. 1992. Identification of Acanthamoeba at the generic and specific levels using the polymerase chain reaction. J. Protozool. 39: 378-385.
- CASEMORE, D.P. 1970. Sensitivity of Hartmannella (Acanthamoeba) to 5-fluorocytosine, hydroxystilbamidine, and other substances. J. Clin. Pathol. 23: 649-652.
- 90. ROWAN-KELLY, B., FERRANTE, A. & THONG, Y.H. 1982. The chemotherapeutic value of sulphadiazine in treatment of *Acanthamoeba* meningoencephalitis in mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76: 636-638.
- FERRANTE, A., ROWAN-KELLY, B. & THONG, Y.N. 1984. In vitro sensitivity of virulent Acanthamoeba culbertsöni to a variety of drugs and antibiotics. Int. J. Parasitol. 14: 55-56.
- SCHUSTER, F.L. & MANDEL, N. 1984. Phenotiazine compounds inhibit in vitro growth of pathogenic free-living amoebae. Antimicrob. Ag. Chemother. 25: 109-112.

- FERRANTE, A., ABELL, T.J., ROBINSON, B. & LODERER, E. 1987. Effects of sinefungin and difluoromethylornithine on pathogenic free-living amoebae in vitro. FEMS Microbiol. Lett. 40: 67-70.
- 94. OSUNA, A., RODRIGUEZ-SANTIAGO, J.I., RUIZ-PEREZ, L.M., GAMARRO, F., CASTANY, S., GIOVANNANGELI, G., GALY, A.M., GALY, J.P., SOYFER, J.C. & BARBE, J. 1987. Antiamebic activity of new acridinic derivatives against Naegleria and Acanthamoeba species in vitro. Chemotherapy 33: 18-21.
- SCHUSTER, F.L. & JACOB, L.S. 1992. Effects of maigainins on ameba and cyst stages of *Acanthamoeba polyphaga*. *Antimicrob*. *Ag. Chemother.* 36: 1263-1271.
- SCHUSTER, F.L. & RECHTHAND, E. 1975. In vitro effect of amphotericin B on growth and ultrastructure of the ameboflagellates Naegleria gruberi and Naegleria fowleri. Antimicrob. Ag. Chemother. 8: 591-605.
- DUMA, R.J. & FINLEY, R. 1976. In vitro susceptibility of pathogenic Naegleria and Acanthamoeba species to a variety of therapeutic agents. Antimicrob. Ag. Chemother. 10: 370-376.
- LEE, K.K., KARR, S.L., WONG, M.M. & HOEPRICH, P.D. 1979. In vitro susceptibilities of Naegleria fowleri strain HB-1 to selected antimicrobial agents, singly and in combination. Antimicrob. Ag. Chemother. 16: 217-220.
- FERRANTE, A. 1982. Comparative sensitivity of Naegleria fowleri to amphotericin B and amphotericin B methyl ester. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 76: 476-478.
- 100. GOGATE, A. & DADKER, F. 1986. Effect of some antimicrobial agents in primary amoebic meningoencephalitis in mice. *Indian* J. Med. Res. 83: 148-151.
- 101. HAY, J., KIRKNESS, C.M., SEAL, D.V. & WRIGHT, P. 1994. Drug resistance and *Acanthamoeba* keratitis: the quest for alternative antiprotozoal chemotherapy. *Eye* 8: 555-563.
- ELDER, M.J., KILVINGTON, S. & DART, J.K.G. 1994. A clinicopathological study of in vivo sensitivity testing and Acanthamoeba keratitis. Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. 35: 1059-1064.
- SEAL, D.V., HAY, J. & KIRKNESS, C.M. 1995. Chlorexidine or polyhexamethylene biguanide for *Acanthamoeba* keratitis. *Lancet* 345: 136.
- 104. BRASSEUR, G., FAVENNEC, L., PERRINE, D., CHENU, J.P. & BRASSEUR, P. 1994. Successful treatment of *Acanthamoeba* by hexamidine. *Cornea* 13: 459-462.
- 105. SLATER, C.A., SICKEL, J.Z., VISVESVARA, G.S., PABICO, R.C. & GASPARI, A.A. 1994. Brief report: successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* infection in an immunocompromised patient. N. Engl. J. Med. 331: 85-87.
- A.J. MARTINEZ. 1991. Free-living amebas Naegleria and Acanthamoeba. In: Medical Microbiology. L.J.Olson & S. Boven (Eds.) Churchill Livingstone, New York. p. 1007-1016.