

MONIKA DERDA¹, EDWARD HADAŚ¹, BARBARA THIEM², WALDEMAR JERZY WOJT¹,
AGNIESZKA WOJTKOWIAK-GIERA¹, MARCIN CHOLEWIŃSKI¹, ŁUKASZ SKRZYPCZAK¹

TANACETUM VULGARE L. JAKO ROŚLINA O POTENCJALNYCH WŁAŚCIWOŚCIACH LECZNICZYCH W ACANTHAMOEBA KERATITIS

TANACETUM VULGARE L. AS A PLANT WITH POTENTIAL MEDICINAL PROPERTIES FOR ACANTHAMOEBA KERATITIS

¹ Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik: prof. dr hab. n. biol. Anna C. Majewska
² Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik: prof. dr hab. n. farm. Jaromir Budzianowski

Streszczenie

Wstęp. Wrotycz pospolity, znany pod łacińską nazwą jako *Tanacetum vulgare* L. charakteryzuje się długą historią swojego użycia w medycynie ludowej. Leczenie pełzakowego ziarniniakowego zapalenia rogówki oka jest bardzo trudne i nie zawsze skuteczne. Stosuje się w nim oprócz antybiotyków, zapobiegających dalszym następstwom uszkodzenia tkanki, związki, które mają działanie pełzakobójcze lub pełzakostatyczne.

Cel. Ze względu na potencjalnie silne właściwości toksyczne składników chemicznych wrotyczu, postanowiono przebadać etanolowe ekstrakty tej rośliny jako potencjalny środek stosowany zewnętrznie w leczeniu zarażenia pełzakami wolno żyjącymi w szczególności w leczeniu *Acanthamoeba keratitis*.

Metodyka. Wpływ substancji leczniczych uzyskanych z roślin testowano in vitro na szczepie 309 *Acanthamoeba castellanii* – patogenicznym dla myszy, izolowanym ze środowiska, oraz szczepie *Acanthamoeba* sp. – patogenicznym dla człowieka, izolowanym z przypadku *Acanthamoeba keratitis*.

Wyniki. Stwierdzono, że ekstrakty alkoholowe sporządzone z około 25 mg wysuszonego wrotycza pospolitego w 1 ml roztworu posiadają właściwości terapeutyczne przeciw patogenicznym i niepatogenicznym szczepom *Acanthamoeba* spp. i mogłyby być stosowane jednocześnie z antybiotykami w kombinowanej terapii pełzakowego zapalenia rogówki (AK).

Wnioski. Ekstrakty roślinne mogą być wykorzystane w połączeniu z antybiotykami w leczeniu zapalenia rogówki oka wywołanego przez *Acanthamoeba*.

SŁOWA KLUCZOWE: *Tanacetum vulgare* L., *Acanthamoeba* sp., akantameboza, leczenie.

Summary

Introduction. Tansy is the common name for the flowering plant species known as *Tanacetum vulgare* L. from Asteraceae. This plant has a long history of folk medicinal use. *Acanthamoeba keratitis* can be extremely difficult and not effective to treat. In this situation treatment with antibiotic may be very helpful. It is very important to prevent damage to the tissue using the compounds, which have a amoebakilling or a amoebaestatic activity.

Aim. *T. vulgare* contains chemical substances with toxic properties therefore the aim of our study was to examine the ethanol extracts of tansy as potential external therapeutical substances in treatment of *Acanthamoeba keratitis*.

Material and methods. Effect of medicinal substances (extracts) from plants were tested in vitro on *Acanthamoeba castellanii* 309. This strain is pathogenic for mice and isolated from the environment. Another of *Acanthamoeba* spp. is pathogenic for humans and isolated from the case of *Acanthamoeba keratitis*.

Results. Based on our results we may confirm that the ethanol extracts prepared from approximately 25 mg of dried tansy common in 1 ml solution have therapeutic properties against pathogenic and nonpathogenic of *Acanthamoeba* spp. strains.

Conclusions. The extracts of plant could be used in combination with antibiotics in therapy of *Acanthamoeba keratitis* (AK).

KEY WORDS: *Tanacetum vulgare* L., *Acanthamoeba* sp., acanthamoebosis, treatment.

Wstęp

Wrotycz pospolity (*Tanacetum vulgare* L.), bylina należąca do rodziny Asteraceae, podrodziny Asteroideae, plemienia Anthemide to roślina lecznicza mająca długą historię zastosowania w medycynie ludowej. Jest to silnie

aromatyczna roślina, o korzennym zapachu, podobnym do aromatu pokrewnego, leczniczego gatunku – *T. parthenium* L. Okazy tej rośliny osiągają wysokość do 160 cm; silne łodygi zakończone są złocistożółtymi kwiatami zebranymi w koszyczki. Gatunek występuje w naturalnym środowisku w umiarkowanych strefach półkuli

północnej. Jego zasięg obejmuje Europę i Azję Środkową, aż po Daleki Wschód i Syberię. Do Azji Wschodniej, Ameryki Północnej i krajów arktycznych wrotycz został zawleczony. W Polsce pospolity jest na nizinach, rośnie na brzegach rzek, wzdłuż poboczy dróg, brzegów lasów i zarośli oraz na otwartych przestrzeniach. Ta mrozoodporna bylina, znana również jako roślina ozdobna, rozmnaża się z nasion i przez podział korzeni [1].

Surowcem leczniczym wrotyczu pospolitego są części nadziemne rośliny – kwitnące ziele i kwiaty (koszyczki) – *Tanacetum herba* i *Tanacetum flos*. Ziele wrotyczu zawiera do 0.6% oleju lotnego, a kwiaty od 1 do 1,5% olejku, którego głównym składnikiem jest toksyczny β -tujon (około 70%), kamfora, borneol, α -pinen, 1,8-cyneol, umbelloni, sabinen. Stwierdzono zasadnicze różnice w składzie metabolitów wtórnych tej rośliny w zależności od lokalizacji geograficznej. Znanych jest dziesięć ras chemicznych wrotyczu różniących się składem frakcji olejku eterycznego, w którym kamfora jest najczęściej pojawiającym się komponentem. Niektóre chemotypy nie zawierają toksycznego β -tujonu [2, 3]. Inne składniki surowców to terpenoidy: α -amaryna i β -amaryna, laktony seskwiterpenowe, głównie gorzka tanacetyna i arbuskulina-A, także gerkakren D i krispolid [4], steroidy – β -sitosterol, kampesterol, stigmasterol i cholesterol oraz flawonoidy: pochodne kwercetyny i luteoliny oraz akacetyna [5], kwas kawowy, garbniki, kwas askorbinowy i sole mineralne [3, 5, 6, 7, 8]. Biologiczne i lecznicze działanie przypisane tej roślinie spowodowane jest głównie obecnością β -tujonu, ale laktony seskwiterpenowe również wpływają na aktywność surowca [9]. Wrotycz pospolity dzięki swoim właściwościom stosowany był jako *stomachicum* i *tonicum* oraz jako środek przeciworobaczy do zwalczania robaków obłych w układzie pokarmowym (na glisty i owsiki), wiatropędny i przeciwskurczowy [3]. Zgodnie z tradycją ziele wrotycza było używane jako środek leczniczy w zaburzeniach żołądkowych, stosowany zewnętrznie przynosił ulgę przy naciągnięciu ścięgien i bólach reumatycznych. Surowiec, jak i jego przetwory straciły obecnie znaczenie w lecznictwie. Wyciąg alkoholowy z kwiatów, wchodzący w skład płynu Artemisol, obecnie stosowany jest tylko zewnętrznie we wszawicy i świerzbie. Preparat przeciw wszawicy zawiera zarówno α -tujon (z piołunu), jak i β -tujon z wrotycza. W związku z możliwością działania toksycznego, wrotycz pospolity jest rzadko używany, ponieważ nawet zewnętrzne zastosowanie tego zioła niesie ze sobą ryzyko intoksykacji. Wrotycz pospolity dzięki swojemu silnemu zapachowi jest wykorzystywany jako naturalny środek (repellent) odstraszający owady [10].

Ze względu na potencjalnie silne właściwości toksyczne związków chemicznych wrotyczu postanowiono przebadać etanolowe ekstrakty z surowca, zakładając możliwość stosowania zewnętrznego tej rośliny jako potencjalnego środka w leczeniu zarażenia pełzakami wolno żyjącymi, w szczególności w leczeniu *Acanthamoeba keratitis*.

Pełzaki wolno żyjące z rodzaju *Acanthamoeba* stanowią czynnik etiologiczny przewlekłego pełzakowego

ziarniniakowego zapalenia mózgu (granulomatous amebic encephalitis – GAE), zapalenia rogówki oka (amebic keratitis – AK), zapalenia płuc (amebic pneumonitis – AP), jak również zmian w innych narządach człowieka i zwierząt.

Acanthamoeba keratitis (AK) pełzakowe zapalenie rogówki jest chorobą rzadką, spowodowaną inwazją różnych gatunków *Acanthamoeba*. Do roku 1997 odnotowano 700 przypadków zachorowania [11]. W ostatnich latach liczba odnotowanych zarażeń szybko rośnie na całym świecie. Dane z okulistycznych laboratoriów diagnostycznych w USA wskazują, że roczna liczba przypadków stopniowo zwiększa się od 22 w 1999 r. do 43 w 2003 r., z wyraźnym początkiem wzrostu w 2004 r. (93 przypadków), które trwały do 2007 r. (170 przypadków) [12]. Do dnia dzisiejszego przybliżona liczba przypadków przekracza kilka tysięcy. Większość z nich jest związana z użyciem twardych lub miękkich soczewek kontaktowych.

Leczenie pełzakowego ziarniniakowego zapalenia rogówki oka jest bardzo trudne i nie zawsze skuteczne. Stosuje się w nim oprócz antybiotyków, które zapobiegają dalszemu uszkodzeniu tkanki, związki mające działanie pełzakobójcze lub pełzakostatyczne. Są to często substancje o działaniu silnie drażniącym i toksycznym, stosowane do dezynfekcji [13, 14].

Material i metody

Części nadziemne (kwitnące ziele) wrotycza pospolitego (*Tanacetum vulgare* L.) zebrano z naturalnego stanowiska – przydrożnego rowu w okolicach Zalasewa (Swarzędz, Poznań). Okazy zielnikowe oznaczono i zdeponowano w Herbarium Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Wysuszony i rozdrobniony materiał roślinny w ilości 10 g ekstrahowano w 150 ml etanolu w aparacie Soxhleta (około 30 cykli). Uzyskany ekstrakt filtrowano, a następnie odparowywano w podciśnieniu do sucha. Suchą pozostałość rozpuszczono na gorąco w wodzie destylowanej.

Wpływ roślinnego ekstraktu testowano *in vitro* na szczepie 309 *Acanthamoeba castellanii* – patogeniczny dla myszy, izolowany ze środowiska [15], oraz szczepie Ograbek *Acanthamoeba* sp. (patogenicznym dla człowieka, izolowanym z przypadku *Acanthamoeba keratitis* – szczep własny nieopisany). Patogeniczność pełzaków sprawdzono na myszach szczepu BALB/c, opierając się na procedurze opisanej przez Kasprzaka i Mazura [15] oraz Mazura [16].

Pełzaki hodowano w płynnych kulturach aksenicznych zawierających 2% Bacto Casiton (Difco) i 10% surowicy końskiej normalnej, według procedury opisanej przez Cervę [17] oraz na podłożu stałym NN (non-nutrient agar) zawierającym 2% nie odżywczy agar Difco wylany na płytki Petriego o średnicy 80 mm i pokryty 0,5 ml zawiesiny żywych bakterii *Enterobacter aerogenes*.

Do aksenicznej hodowli pełzaków (5×10^4 komórek/ml) dodawano ekstrakt w stężeniach przeliczonych na 10, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100 mg suchej masy rośliny w 1 ml. Przyrost liczby pełzaków badano w 4 dni fazy logarytmicznej hodowli, stosując komorę hemocytometryczną Thoma. Kontrolę stanowiła hodowla pełzaków bez badanego ekstraktu. Współczynnik IC_{50} oznacza najniższe stężenie badanej substancji, które hamuje wzrost pełzaków w 50%.

Drugim sposobem badania działania ekstraktów z materiału roślinnego była metoda oparta na hodowli pełzaków na NN agarze, na którym umieszczano krążki z bibuły filtracyjnej nasyczonej roztworem ekstraktu sporządzonym z 50 lub 100 mg suchej masy/ml. Kontrolę stanowiły krążki nasyczone jałową wodą. Obserwowano wpływ ekstraktu na wzrost i migrację pełzaków przez 7–14 dni.

Wyniki

Tabela 1. przedstawia współczynnik terapeutyczny IC_{50} wyznaczony dla ekstraktu uzyskanego z wrotycza pospolitego. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że ekstrakt uzyskany z 25 mg suchej rośliny zawieszony w 1 ml wody hamuje wzrost pełzaków w 50%. Wyniki badań są identyczne dla obu badanych szczepów *Acanthamoeba* spp.

Badania wpływu ekstraktów na hodowle agarowe wykazały zahamowanie wzrostu i migracji pełzaków w stężeniu 100 mg/ml. W przypadku szczepu niepatogenicznego *Acanthamoeba* ekstrakty hamują nawet encystację. Na rycinie 1 przedstawiono zahamowanie migracji i wzrostu pełzaków w strefie działania ekstraktu.

Tabela 1. Współczynnik terapeutyczny IC_{50} wyznaczony dla różnych stężeń etanolowego ekstraktu z *Tanacetum vulgare* L. (wrotycz pospolity)

Table 1. Therapeutic index IC_{50} determined for different concentrations of ethanol extract of *Tanacetum vulgare* L.

Stężenie ekstraktu*	% hamowania wzrostu pełzaków**
10 mg/ml	27
20 mg/ml	41
25 mg/ml	50
30 mg/ml	58
40 mg/ml	66
50 mg/ml	72
75 mg/ml	82
100 mg/ml	95

* Ekstrakt uzyskany z podanej ilości suchej masy rośliny.

** Wartości zaokrąglono do pełnego procenta. Błąd oznaczenia $\pm 5\%$, $n = 8$.

Dyskusja

Pełzaki wolno żyjące należące do rodzaju *Acanthamoeba* są organizmami występującymi powszechnie w otaczającym środowisku człowieka. Żywią się bakteriami, grzybami i innymi cząsteczkami stałymi i są

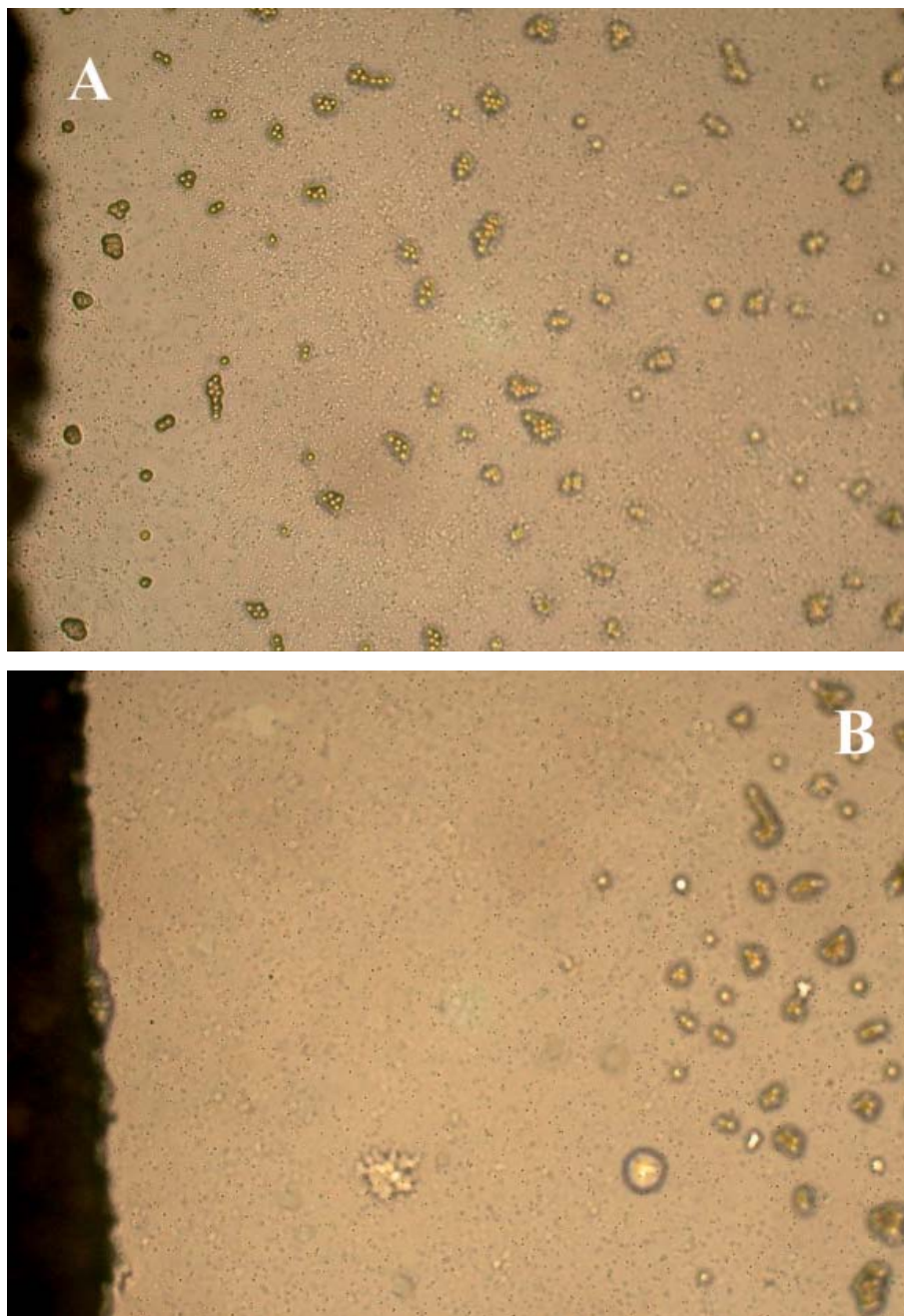
doskonale dostosowane do środowiska [18]. Organizmy te są znajdowane w próbkach gleby, powietrza, w zbiornikach wody słodkiej i słonej na wszystkich kontynentach, a ponadto w urządzeniach klimatyzacyjnych, w wodzie wodociągowej, prysznicach, urządzeniach sanitarnych, basenach kąpielowych, dializatorach, płynach do soczewek kontaktowych i zakażonych hodowlach tkankowych. Trofozoity i cysty pełzaków są wykrywane w osadach oceanicznych, w wodzie mineralnej butelkowanej, jak również w wymazach z błony śluzowej jamy nosowej i gardła [19, 20, 21, 22]. Pierwsze sugestie wskazujące, że pełzaki te mogą wywołać choroby u człowieka pochodzą z roku 1958 z USA [23, 24]. Obecnie ludzkie przypadki pełzakowego ziarniniakowego zapalenia mózgu, zapalenia rogówki oka, zapalenia płuc i skóry są notowane na całym świecie [12, 25, 26, 27, 28].

Kliniczne objawy ziarniniakowego zapalenia mózgu u człowieka (GAE) charakteryzują się silnym bólem głowy, zaburzeniami neurologicznymi, takimi jak: halucynacje, dezorientacja i zaburzenia wzrokowe; wysoką gorączką oraz śpiączką [11]. Zapalenie rogówki oka (AK) charakteryzuje się silnymi bólami oka, światłowstrętem i krwawymi wybroczynami [27]. W płucach pełzaki wywołują liczne ogniska zapalenia (AP) z wysiękiem płynu surowiczego zawierającego trofozoity i cysty [29]. Zmiany skórne mają charakter licznych, mniej lub bardziej rozległych owrzodzeń. Wszystkie infekcje są zazwyczaj przewlekłe [30, 31].

Chemoterapia w przypadkach inwazji *Acanthamoeba* sp. stanowi ogromny problem. Większość inwazji kończy się śmiertelnie. Zanotowano zaledwie kilka przypadków skutecznej chemoterapii w bardzo wczesnym stadium rozpoznania zarażenia i przy zastosowaniu bardzo toksycznych leków używanych zazwyczaj do dezynfekcji; np. pochodnych chloroheksydyny [14, 32, 33]. Większość terapeutyków w późnych stadiach zarażenia jest nieskuteczna [34, 35, 36, 37, 38].

Szerokie zastosowanie terapeutyków w AK jest niekwestionowane, jednakże większość leków wykazuje wysoką toksyczność dla człowieka, wywołując reakcje niepożądane. Z tego powodu poszukuje się alternatywnych propozycji nadających się do zastosowania w przypadku AK, będącej przyczyną wysokiej śmiertelności.

Od kilku lat wzrosło zainteresowanie roślinami, których metabolity wtórne mogą wykazywać potencjalne właściwości przeciwpierwotniakowe. Nasze wcześniejsze badania aktywności przeciwko *Acanthamoeba* sp. *in vitro* i *in vivo* dotyczyły ekstraktów z wybranych roślin leczniczych takich jak: malina moroszka (*Rubus chamaemorus*), ołownik łatkowaty (*Pueraria lobata*), nawłoc pospolita (*Solidago virgaurea*) i nawłoc wąskolistna (*Solidago graminifolia*) [39]. W piśmiennictwie pojawia się coraz więcej publikacji o przeciwpęczakowym działaniu różnych gatunków roślin i substancji roślinnych. Badane były m.in. orzech ziemny (*Arachis hypogaea* L.), ostryż długi (*Curcuma longa* L.), lilia piaskowa (*Pancreatum maritimum* L.) [40]. Ostatnio wykazano, że wiele gatunków roślin leczniczych posiada amebobójcze lub amebostatyczne działanie przeciwko trofozoitom



Rycina 1. Zahamowanie migracji pełzaków w hodowli na NN agarze pod wpływem ekstraktu z *Tanacetum vulgare* L (wrotycza pospolitego). A) Kontrola. B) Hodowla z krążkiem bibuły nasączonej ekstraktem (ciemne pole). Powiększenie 100x.

Figure 1. Inhibition of amoebae's migration in culture on NN agar under the influence of extract of *Tanacetum vulgare* L. A) Control. B) The culture containing paper disc soaked in the extract (dark field). Magnification: 100x.

i cystom *Acanthamoeba castellani in vitro* [41, 42, 43]. Rośliny takie mogłyby znaleźć potencjalne zastosowanie w leczeniu akantamebozy. Badania nasze wskazują, że również ekstrakty etanolowe z *Tanacetum vulgare* L. mogłyby być stosowane w leczeniu miejscowym w kombinowanej terapii z antybiotykami. Testy oparte na hodowli pełzaków na NN agarze, na którym umieszczano krążki z bibuły nasyczonej roztworem ekstraktu

wskazują, że substancje obecne w ekstrakcie nie tylko hamują wzrost, ale również migrację pełzaków.

Z leków pochodzenia naturalnego korzystano już dużo wcześniej w przypadku różnych chorób pasożytniczych [34, 35, 36, 37, 44]. Laktony seskwiterpenowe, charakterystyczne dla rodziny *Asteraceae*, są związkami o różnorodnej strukturze. Z szerokiej aktywności farmakologicznej tej grupy związków wymienić można m.in.

właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, owadobójcze i przeciwpierwotniakowe [45–46]. Ich przeciwpierwotniakowy potencjał obrazuje artemizyna, antymalaryczny lek o dużym znaczeniu klinicznym, izolowany z chińskiej rośliny *Artemisia annua* i kilka innych laktonów seskwiterpenowych [45]. Wykazano, że gwajanolidy z pokrewnego gatunku *Tanacetum parthenium* wykazują aktywność przeciw lejszmaniową [47]. Pomyślnie próby zastosowania substancji zawartych we wrotyczu i w połączeniu z benznidazolami wykorzystano w terapii przeciwko *Trypanosoma cruzi* [48] i *Leishmania amazonensis* [47].

W przypadkach zarażenia ludzi *Acanthamoeba* sp., kombinowana terapia w połączeniu ze standardowym antybiotykiem byłaby na pewno bardziej skuteczna niż terapia samym, pojedynczym lekiem. Wiele bowiem leków posiada właściwości pełzakostatyczne, lecz nie posiada właściwości pełzakobójczych. Niektóre leki są zabójcze dla trofozoitów, ale nie są skuteczne w przypadku cyst. Jak do tej pory nie znaleziono skutecznych leków w obu przypadkach (cyst i trofozoitów). Badania skuteczności działania ekstraktów roślinnych *in vitro* i *in vivo* na *Acanthamoeba* sp. i w akantamebozie są kontynuowane.

Piśmiennictwo

- Nowiński M. Dzieje upraw i roślin leczniczych. PWRiL, Warszawa. 1980.
- Héthelyi E., Tétényi P., Kettenes-van den Bosch J.J. *et al.* Essential oils of five *Tanacetum vulgare* genotypes. *Phytochem.* 1981;20(8):1847–1850.
- Barnes J., Anderson L. A., Phillipson J.D. *Herbal Medicines. A guide for healthcare professionals.* Pharmaceutical Press. 2 ed., London. 2002, 460–461.
- Yunusov A.I., Sidiyakin G.P., Nigmatullaev A.M. Sesquiterpene lactones of *Tanacetum vulgare*. *Chem Nat Comp.* 1979, 15, 1, 88–89.
- Kurkina A.V., Khusainova A.I., Daeva E.D. *et al.* Flavonoids from *Tanacetum vulgare* flowers. *Chem Nat Comp.* 2011;47(2):284–285.
- Kohlmünzer S. *Farmakognozja*, PZWL Warszawa, 2001.
- Williams C.A., Harborne J.B., Geiger H. *et al.* The flavonoids of *Tanacetum parthenium* and *T. vulgare* and their anti-inflammatory properties. *Phytochem.* 1999;51(3):417–423.
- Duke J. A., Buts-Godwin M. J., du Cellier J. *et al.* *Handbook of medicinal herbs.* CRC Press. 2002; s. 277–278.
- Rodríguez E., Dillon M.O., Mabry T.J. *et al.* Dermatologically active sesquiterpene lactones in trichomes of *Parthenium hysterophorus* L. (Compositae). *Experientia.* 1976 32;2:236–238.
- Ożarowski A. *Ziołolecznictwo. Poradnik dla lekarzy.* PZWL, Warszawa. 1976.
- Martinez A.J., Visvesvara G.S. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol.* 1997;7(1):583–598.
- Yoder J.S., Verani J., Heidman N. *et al.* *Acanthamoeba* keratitis: the persistence of cases following a multistate outbreak. *Ophthalmic Epidemiol.* 2012;19(4):221–225.
- Kitagawa K., Nakamura T., Takahashi N. *et al.* A novel combination treatment of Chlorohexidine gluconate, natamycin (pimaricin) and debridement for a *Acanthamoeba* keratitis. *Jpn J Ophthal.* 2003;47(6):616–617.
- Seal D.V. *Acanthamoeba* keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye.* 2003;17(8):893–905.
- Kasprzak W., 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. *Z Tropenmed Parasitol.* 1972;23(4):391–398.
- Mazur T. Występowanie *Naegleria fowleri* w środowisku wolnym i właściwości biologiczne izolowanych szczepów. *Wiad Parazytol.* 1984;30(1):3–35.
- Červa L. Amoebic meningoencephalitis: axenic culture of *Naegleria*. *Science.* 1969;163:576.
- Khan N. A. *Acanthamoeba: Biology and Pathogenesis.* Caister Academic Press, Norfolk UK; 2009.
- De Jonckheere J. F. Ecology of *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis.* 1991;13(supl. 5):385–387.
- Mergeryan H. The prevalence of *Acanthamoeba* in the human environment. *Rev Infect Dis.* 1991;13(supl. 5):390–391.
- Szenasi Z., Endo T., Yagita K. *et al.* Isolation, identification and increasing importance of „free-living” amoebae causing human disease. *J Med Microbiol.* 1998;47(1):5–16.
- Visvesvara G.S., Stehr-Green J. Epidemiology of free-living amoeba infections. *J Protozool.* 1990;37(4):25–33.
- Culbertson C.G., Smith J.W., Minner J.R. Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Am J Pathol.* 1959;35(1):185–197.
- Fowler M., Carter R.F. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp. a preliminary report. *Br Med J.* 1965;2(5464):740–742.
- Marciano-Cabral F., Puffenbarger R., Cabral G. The increasing importance of *Acanthamoeba* infections. *J Eucaryot Microbiol.* 2000;47(1):29–36.
- Marciano-Cabral F., Cabral G. *Acanthamoeba* spp. As agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(2):273–307.
- Wanachiwanawin D., Booranapong W., Kosrirukvongs P. Clinical features of *Acanthamoeba* keratitis in contact lens wearers and non-wearers. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2012;43(3):549–556.
- Kao P.M., Hsu B.M., Chen N.H. *et al.* Isolation and identification of *Acanthamoeba* species from thermal spring environments in southern Taiwan. *Exp Parasitol.* 2012;130(4):354–358.
- Vernon S.E., Acar B.C., Pham S.M. *et al.* *Acanthamoeba* infection in lung transplantation: report of a case and review of the literature. *Transpl Infect Dis.* 2005;7(3–4):154–157.
- Paltiel M., Powell E., Lynch J. *et al.* Disseminated cutaneous acanthamebiasis: a case report and review of the literature. *Cutis.* 2004;73(4):241–248.
- Galarza C., Ramos W., Gutierrez E.L. *et al.* Cutaneous acanthamebiasis infection in immunocompetent and immunocompromised patients. *Int J Dermatol.* 2009;48(12):1324–1329.
- Kitagawa K., Nakamura T., Takahashi N. *et al.* A novel combination treatment of Chlorohexidine gluconate, natamycin (pimaricin) and debridement for a *Acanthamoeba* keratitis. *Jpn J Ophthalmol.* 2003;47(6):616–617.

33. Polat Z.A., Vural A. Effect of combined chlorhexidine gluconate and neosporin on experimental keratitis with two pathogenic strains of *Acanthamoeba*. *Parasitol Res.* 2012;110(5):1945–1950.
34. Dougherty P.J., Binder P.S., Mondino B.J. *et al.* *Acanthamoeba* sclerokeratitis. *Am J Ophthalmol.* 1994;117(4):475–479.
35. Ficker L., Seal D., Warhurst D. *et al.* *Acanthamoeba keratitis* – resistance to medical therapy. *Eye.* 1990;4(6):835–838.

Adres do korespondencji:

dr Monika Derda
Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego
ul. Fredry 10
61-701 Poznań
tel.: 61 854 62 37
fax: 61 854 62 31
e-mail: mderda@ump.edu.pl

Piśmiennictwo, pozycje 36–48 dostępne u autorów.