JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, July 2003, p. 2992–3000 Vol. 41, No. 7

0095-1137/03/$08.00\_0 DOI: 10.1128/JCM.41.7.2992–3000.2003

Авторское право© 2003, Американское микробиологическое общество (American Society for Microbiology). Все права защищены.

**Определение амебоцидной активности универсальных растворов для контактных линз методом подсчета наиболее вероятного количества**

Тара К. Битти (Tara K. Beattie),1[[1]](#footnote-1)\* Девид В. Сил (David V. Seal),2 Алан Томлинсон (Alan Tomlinson),1 Ангус К. МакФадйен (Angus K. McFadyen),3 и Энтони М. Гримасон (Anthony M. Grimason)4

*Факультет науки о зрении1 и факультет математики3 университета г. Глазго, департамент охраны окружающей среды, департамент гражданского строительства, университет г. Страйтклайд 4 Глазго, Шотландия, Центр прикладных исследований в области зрения, Университет г. Лондон, Великобритания2*

Получено 4 февраля 2003 г./ Возвращено для изменения 23 марта 2003 г./Принято 6 апреля 2003 г.

**Шесть универсальных растворов для контактных линз** **[All-in-One, All-in-One (Light), ReNu MultiPlus, Optifree Express,Complete и Solo-care soft] были испытаны на предмет эффективности в отношении трофозоитов и цист *Acanthamoeba castellanii* методом подсчета наиболее вероятного количества (ПНВК) амеб. Что касается трофозоитов, при использовании растворов All-in-One, ReNu Multiplus и Optifree Express было достигнуто полное уничтожение микроорганизмов (логарифмическое уменьшение >3) по истечении минимального рекомендованного производителем времени дезинфекции (МРПВД), при использовании остальных растворов не было достигнуто логарифмического уменьшения 1. После 24 ч экспозиции было подтверждено трофозоицитное действие растворов с достижением полного уничтожения, за исключением раствора Complete (логарифмическое уменьшение 3,13). В отношении цист логарифмическое уменьшение при использовании раствора All-in-One составило >3 в рамках МРПВД, а все остальные растворы не достигли логарифмического уменьшения 1. После 24 ч экспозиции раствора All-in-One было достигнуто полное уничтожение цист (логарифмическое уменьшение 3,74), при использовании раствора ReNu MultiPlus было получено логарифмическое уменьшение 3,15, а при использовании остальных растворов были достигнуты уменьшения от 1,09 до 2,27. Техника ПНВК обеспечивает простой, надежный и воспроизводимый метод подсчета амеб, который зависит от простого установления присутствия либо отсутствия роста культур в чашках, инкубируемых с рядом разведений, и определения ПНВК присутствующих амеб на основании статистических таблиц. При использовании данной техники для двух универсальных испытуемых растворов, ReNu MultiPlus и Optifree Express, была продемонстрирована эффективная активность в отношении трофозоитов в течение рекомендованного времени дезинфекции; однако было подтверждено, что только All-in-One является эффективным как против трофозоитов, так и против цист в течение такого же периода времени. Данная техника ПНВК, которая использует произведенные в сериальных условиях трофозоиты и зрелые цисты с двумя стенками, может стать основой государственного стандарта для испытания амебоцидной эффективности универсальных растворов для дезинфекции контактных линз.**

*Acanthamoeba* - род свободноживущих простейших, которые широко распространены в окружающей среде. Организмы данного рода часто встречаются в почве (8) и водной среде (9,23), но их также выделяли в плавательных бассейнах (32), водопроводной воде (44, 46), бутилированной минеральной воде (37), образцах атмосферы (22) и даже в растворах по уходу за контактными линзами (47). Цикл жизни организма состоит из двух различных стадий: подвижной, метаболически активной стадии трофозоита, в которой организм способен к размножению и чувствителен к вредным воздействия, и стадии покоящейся цисты, в которой организм устойчив к обезвоживанию, дезинфекции и экстремальным температурам.

Глазные инфекции, вызываемые *Acanthamoeba*,впервые были зарегистрированы в начале 1970 г. (18, 34), но связь между заболеванием и ношением контактных линз была установлена только в середине 1980-х (33). Лиди (Ledee) и соавторы (27) показали прямую цепь причинной взаимосвязи между кератитом, вызываемым *Acanthamoeba* (АК) с использованием ДНК, соответствующих изолятам *Acanthamoeba griffini* из соскобов роговицы инфицированных лиц, футляров для хранения линз и водопроводной воды пациента. В таких случаях футляры загрязнялись после промывания водопроводной водой, зараженной *Acanthamoeba*. Организм, в свою очередь, попадал на линзы, что действовало в качестве механического вектора, переносящего амебы на поверхность роговицы, где и происходило заражение и последующее развитие инфекции. Использование неэффективных систем дезинфекции линз (49), самостоятельно приготовленного физиологического раствора (48) и водопроводной воды (44, 46), а также загрязнение футляров для хранения линз (10, 15, 25) считаются важными факторами риска развития заболевания.

Изначально частота развития АК среди пользователей контактными линзами (ПКЛ) считалась низкой. Однако в 1996 г. Матерс (Mathers) с коллегами (29) использовали тандемную растровую конфокальную микроскопию для изучения инфицированных глаз 217 пациентов с кератитом на наличие *Acanthamoeba*. Наличие организма предполагалось у 51 пациента, а его присутствие было цитологически подтверждено у 43 из них. Это позволило исследователям сделать заключение о том, что выраженное увеличение случаев обнаружения *Acanthamoeba* при тандемной растровой конфокальной микроскопии позволило предположить, что заболевание было распространено более широко, чем считалось изначально.

В когортном исследовании в Шотландии в 1995 г. АК был отмечен у 1 из 6720 ПКЛ (45). В подобных исследованиях в Голландии в 1996 (5) и Гон-Конге в 1997 и 1998 (24) годовая частота развития АК составила 1 случай из 200000 ПКЛ и 1 случай из 33000 ПКЛ соответственно. Популярность жестких газопроницаемых контактных линз в Голландии является основной причиной низкой частоты заболеваемости в данной стране. Редфорд (Radford) с коллегами (39, 40) провели три многоцентровых анкетирования по АК.

Впервые в Англии с 1992 по 1996 г., а затем в Англии и Уэльсе с 1997 по 1998 г. и с 1998 по 1999 г. была получена частота возникновения в 1 случае из 39370 ПКЛ (39), 1 случае из 47620 ПКЛ (40) и в 1 случае из 55555 ПКЛ (40) соответственно. Данные, полученные во втором исследовании, недавно были скорректированы следующим образом: 1 на 32260 и 1 на 37040 соответственно Силом и соавт. (Seal) (D. V. Seal, A. Tomlinson, T. K. Beattie, D. Fan, and E. Wong, Letter, Br. J. Ophthalmol. **87:**516–517, 2003) по причине занижения оригинальных данных (40). Считается, что внедрение универсальных очищающих и дезинфицирующих растворов является основным фактором, вносящим вклад в уменьшение частоты развития данного заболевания (49).

Повышение частоты распространения АК, связанного с ношением контактных линз в конце 1980 - начале 1990 гг. привело к проведению нескольких исследований амебоцидных эффектов растворов для контактных линз.

Тем не менее, основным препятствием для преодоления при проведении такого исследования является подсчет амеб. В недавнем обзоре методов, используемых для оценки эффективности растворов для контактных линз против *Acanthamoeba*, Бак (Buck) и его коллеги (4) показали, что из рассмотренных исследований, в 30% не использовался метод подсчета, а лишь сообщалось о наличии или отсутствии жизнеспособных амеб. Было использовано несколько количественных методов, например, метод прямого подсчета с помощью гемоцитометра (2, 6), стандартный анализ бляшек (16, 19), метод количественного микротитрования (2), и подсчета единиц, образующих дорожки на непитательном агаре с бактериальным слоем (20).

За исключением одного исследования (38) методика подсчета организмов, которая в значительной степени игнорируется, является наиболее вероятной техникой подсчета (ПНВК), которая является средством для оценки плотности организмов, присутствующих в жидкости, без какого-либо прямого подсчета. Методика ПНВК была впервые введена McCrady (30, 31) и состоит из инкубации аликвоты разбавлений образца с соответствующей средой при идеальной для желаемого организма температуре. После инкубации аликвоты рассматривают на предмет присутствия роста (при наличии роста, указывающего на наличие, как минимум, одного организма в данной аликвоте). Изначального приблизительно решались математические уравнения для определения числа присутствующих организмов, на основании числа аликвот, для которых был продемонстрирован рост (30, 31). Для разработки более точных таблиц ПНВК используются компьютеры (51, 52).

Ранее используемые методы подсчета *Acanthamoeba*,такие как прямой подсчет или анализ бляшек, могут требовать существенных затрат времени и труда, а некоторые методы не позволяют отличить жизнеспособных амеб от нежизнеспособных. В настоящем исследовании использовали технику простого подсчета, ПНВК, для определения эффективности универсальных растворов для контактных линз в отношении трофозоитов и цист *Acanthamoeba castellanii* .

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Организм** *A. castellanii* был выбран в качестве испытуемого организма, поскольку он является наилучшим индикатором молекулярного вида *Acanthamoeba* типа T4, характерного для штаммов, вызывающих АК (T. K. Beattie, A. Tomlinson, D. V. Seal, Letter, Br. J. Ophthalmol. **86:** 1319–1320, 2002). Аксеническая культура *A. castellanii* 1501/1A была получена из Коллекции культур водорослей и простейших (Freshwater Biological Association, The Ferry House, Эмблсайд, Соединенное Королевство) и поддерживалась в аксеничной форме в колбах с культурой ткани, содержащих протеозо-пептонный глюкозный бульон (PPG) (36). Трофозоиты для экспериментального использования были произведены путем пересева амеб в 75-см2 колбах с культурой ткани, содержащих 30 мл PPG, и инкубации при 32° С в течение 2 дней. После инкубации PPG был замещен солевым амебным раствором Пейджа (PAS) (36), а для мягкого удаления трофозоитов, которые приклеились к основанию колбы с клеточной культурой, использовали стерильные клеточные скребки. Затем PPG, содержащий трофозоиты, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре, супернатант удаляли, а пеллеты *Acanthamoeba* ресуспендировали в PAS. Для производства зрелых цист амебы пересеяли в 75-см2 колбы с культурой ткани, содержащие 30 мл PPG, и инкубировали при 32° С в течение 4 дней. После инкубации трофозоиты извлекли, как описано выше и перенесли на чашки со свежим непитательным агаром (НПА), не содержащим бактерий (36). Чашки запечатали парафином и инкубировали в течение 10 - 14 дней при 32°C. После инкубации цисты были промыты НПА без PAS. Культуры трофозоитов или цист в физиологическом растворе были подсчитаны при помощи гемоцитометра Нойбауэра и скорректированы до значения 106 трофозоитов или цист/мл путем разведения или центрифугирования.

**ПРОЦЕДУРА**

Трофозоиты или цисты были подвержены воздействию шести универсальных растворов (МЦР) и контрольного раствора (0,9% PAS). В качестве МЦР использовали растворы All-in-One, All in One (Light), ReNu Multiplus, Optifree Express, Solo-care soft и Complete (см. сведения о производителях и компонентах в Таблице 1). Аликвоты (0,1 мл) культуры трофозоитов или цист прибавили к 9,9 мл каждого МЦР и контрольного раствора в стерильных универсальных стеклянных флаконах, чтобы получить концентрации 106 трофозоитов или цист/мл. Универсальные флаконы были обработаны на вортексе, чтобы однородно распределить организмы между МЦР или другим контрольным растворов. Все универсальные флаконы были помещены на орбитальный шейкер и встряхивались при 80 об/мин в инкубаторе при температуре 25°C для поддержания постоянной температуры в течение всего периода дезинфекции.

Через установленные интервалы (0, 2, 4, 8 и 24 ч) аликвоты 1 мл были отобраны из МЦР и контрольного раствора и помещены в 9 мл бульона по Ди Ингли (ДИ) (Difco) для нейтрализации дезинфектанта. Из данного разведения 1 к 10 было приготовлено разведение 1 к 100 в PAS, а из данного разведения пять аликвот, каждая из которых была объемом 1, 0,1 и 0,01 мл, высевали на чашки с НПА, засеянные убитыми жаром *Klebsiella aerogenes* (WPRL CN345). Лунки плоскодонных планшетов на 6 лунок с культурой ткани использовали для аликвот объемом 1 мл, а лунки 12-луночных планшетов использовали для аликвот объемом 0,1 и 0,01 мл. Все чашки были запечатаны и инкубировались при 32°C. Чашки были исследованы на предмет наличия жизнеспособных трофозоитов после 3 - 7 дней инкубации.

Чашки, на которых отмечался рост, считали как 1, а чашки с отсутствием роста - 0. Показатель для каждого из 10-кратных разведений (т.е. 1, 0,1 и 0,01 мл) дал одно значение в виде трехзначного числа, которое было внесено в таблицу ПНВК (Таблица 2), чтобы получить наиболее вероятное число амеб на миллилитр МЦР или контрольного раствора в каждый момент времени. Например, при внесении в таблицу пяти положительных результатов с 1 мл, четырех положительных планшетов с 0,1 мл, а также двух положительных планшетов с 0,01 мл было получено трехзначное число 542, которое при вводе в Таблицу 2 давало значение ПНВК 2200 амеб/мл.

Пять аликвот объемом 1 мл разведения 1 к 10, приготовленных в бульоне по ДИ, также высевали на 90-мм чашки Петри, содержание НПА, засеянные убитыми жаром бактериями; использовали чашки Петри, поскольку окрашенный бульон по ДИ затемнял амебы в шестилуночных планшетах с культурами ткани. Если в аликвотах разведения 1 к 100 не отмечался рост, то на наличие роста проверяли чашки с бульоном по ДИ с разведением 1 к 10; отсутствие роста указывало на полное уничтожение трофозоитов и цист.

Каждый МЦР трижды испытывали на содержание трофозоитов и цист. При использовании ПНВК трофозоитов или цист на миллилитр МЦР определяли средние логарифмические уменьшения в течение минимального рекомендованного производителем времени дезинфекции (МРПВД) и 24 ч. Для анализа данных использовали однофакторный сбалансированный дисперсионный анализ с парным сравнением Тьюки для последующего испытания.

Эффект экспозиции нейтрализующего дезинфектант бульона по ДИ на трофозоиты и цисты был оценен путем прибавления 0,1-мл аликвот культуры трофозоитов или цист к 9,9 мл бульона по ДИ в стерильных стеклянных универсальных флаконах, что снова приводило к изначальной концентрации 104 трофозоита или цисты/мл. Затем бульон по ДИ, содержащий трофозоиты или цисты был обработан, как описано выше для МЦР и контрольного раствора.

В литературе сообщалось (53), что некоторые активные ингредиенты испытуемых МЦР, а именно, Альдокс (миристиламидо-пропилдиметиламина) и полигексаметиленбигуанид (PHMB), могут приклеиваться к определенным типам пластика и стекла соответственно. Таким образом, изначально испытание проводили с двумя испытуемыми растворами, Optifree Express (который содержит Aldox) и All-in-One (который содержит PHMB), чтобы определить оказывала ли емкость, в которой проводили испытание, какое-либо влияние на эффективность растворов. Аликвоты (0,1 мл) культуры цист были прибавлены к 9,9 мл раствора Optifree Express либо в стеклянном флаконе, либо в пластиковом флаконе, либо в пластиковом флаконе, вымоченном в растворе Optifree Express в течение ночи, либо к 9,9 мл раствора ReNu Multiplus в стеклянном флаконе, либо в пластиковом флаконе, либо в стеклянном флаконе, вымоченном в растворе ReNu Multiplus в течение ночи. МЦР в различных флаконах были обработаны, как описано выше, для всех МЦР и контрольного раствора.

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

Среднее значение и стандартное отклонение log10 ПНВК через 0 ч после МРПВД и через 24 часа для репликатов трех трофозоитов и цист во всех испытуемых МЦР и контрольного раствора представлены в Таблице 3. Не отмечалось существенных различий между репликатами трофозоитов и цист любых МЦР в каждом анализе, что показывает надежность метода подсчета ПНВК. Отмечалась существенная разница между двумя контрольными репликатами трофозоитов (*P* < 0,032) и двумя контрольными репликатами цист; это было вызвано низкой инокуляцией двух репликатов; однако, число амеб в каждом контрольном репликате оставалось постоянным.

Среднее логарифмическое уменьшение для трофозоитов и цист, достигнутое с использованием шести МЦР в течение 24 ч, представлено на Рис. 1 и 2 соответственно. В Таблице 3 представлено среднее логарифмическое уменьшение жизнеспособных трофозоитов и цист после МРПВД в 24 ч.

Было установлено, что эффекты трех МЦР (All-in-One, ReNu Multiplus и Optifree Express) существенно отличались (*P* < 0,001) от эффектов контрольного раствора и трех других МЦР после МРПВД (4 ч для All-in-One и ReNu, ч для Optifree), достигнув полного уничтожения трофозоитов (логарифмическое уменьшение > 3). Остальные МЦР [All-in-One (Light), Complete, Solo- care soft] не оказали никакого влияния на трофозоиты в течение МРПВД [4ч для All-in-One (Light) и Complete, 10 мин для Solo-care soft], не отмечалось достоверной разницы от установленного эффекта контрольного раствора. Однако через 24 ч все растворы продемонстрировали достоверные (*P* < 0,001) трофозотицидные эффекты.

Раствор All-in-One продемонстрировал трофозотицидную активность в течение МРПВД, достигнув логарифмического уменьшения жизнеспособности 3,44, что достоверно отличалось от уменьшений, показанных для контрольного раствора и других МЦР (*P* < 0,001). За исключением раствора ReNu Multiplus, остальные растворы не оказали цистоцидного эффекта в течение МРПВД; раствор ReNu Multiplus показал логарифмическое уменьшение 0,98, но данный результат не был статистически достоверным. К 24 ч только растворы All-in-One и ReNu Multiplus демонстрировали эффекты, которые достоверно отличались от эффектов контрольного раствора (*P* < 0,001); при применении остальных растворов были достигнуты логарифмические уменьшения жизнеспособности цист от 1,09 до 2,27, но их статистическая достоверность не была установлена.

Было установлено, что Воздействие бульона, нейтрализующего дезинфектант, в течение 24 ч не оказало отрицательного влияния на амеб. При использовании трехкомпонентного дисперсионного анализа не было выявлено достоверной разницы числа амеб при испытании двух растворов, ReNu Multiplus и Optifree Express в стеклянных или пластиковых пробирках, или стеклянных и пластиковых пробирках, смоченных МЦР (Рис. 3).

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Международная организация по стандартизации (ISO) разработала стандарты оценки дезинфицирующих растворов для контактных линз. Для соответствия основному критерию "микробиологические требования и методы испытаний продуктов и режимов гигиенической обработки контактных линз" (17), растворы должны достигать 3-логарифмического уменьшения каждого из трех видов бактерий и 1-логарифмического уменьшения каждого из двух видов грибов в течение МРПВД. Данный стандарт не требует проведения испытания в отношении *Acanthamoeba*; таким образом, растворы, испытуемые в настоящем исследовании, не должны быть акантомебоцидными. Причина, по которой ISO делает исключения для *Acanthamoeba* в своих стандартах заключается в отсутствии стандартного метода испытания эффективности растворов в отношении жизнеспособности *Acanthamoeba,* отсутствует стандартный метод извлечения или подсчета амеб, а также не был установлен видовой тип. ISO считает, что уменьшение числа бактерий, присутствующих в футляре для линз вместе с подходящим бактерицидным раствором по уходу за линзами, является достаточной мерой профилактики контаминации и размножения *Acanthamoeba* в футляре путем устранения источника пищи амеб. Однако, поскольку не была определена минимальная инфицирующая доза *Acanthamoeba*, присутствие *Acanthamoeba* в футляре для контактных линз может ставить пользователя линз под угрозу инфицирования.

Из испытанных МЦР только раствор All-in-One достиг 3-логарифмического уменьшения, как трофозоитов, так и цист в течение МРПВД, а данное уменьшение было уровнем уничтожения для раствора, который, согласно стандарту ISO, действует против бактерий. Как ReNu Multiplus, так и Optifree Express достигли 3-логарифмического уменьшения против трофозоитов в течение МРПВД. Поскольку цисты более устойчивы к дезинфекции, чем трофозоиты (12, 14, 26), данный результат менее значим, поскольку ни один из растворов не оказал эффективного воздействия против цист в течение такого же времени. Остальные растворы не оказали ни трофозоитицидного, ни цистицидного воздействия в течение МРПВД. Однако через 24 часа все растворы уничтожили, как минимум, 99,9% трофозоитов. Раствор ReNu Multiplus оказал цистицидное воздействие

после 24 ч, уничтожив 99,9% цист, а остальные растворы позволили достичь логарифмического уменьшения от 1,089 до 2,27.

Метод ПНВК широко используется для анализа воды, но недавно его стали применять для подсчета ряда организмов, отличающихся от бактерий, например, для подсчета жизнеспособных планктонных диатомей в образцах осадка (13) и радя простейших в почве и системах фильтрации (11, 50). В 1995 г. Пиррайн (Perrine) и соавторы (38) использовали технику ПНВК для подсчета *Acanthamoeba* в исследованиях, определяющих амебоцитную эффективность ряда диамидинов в отношении двух штаммов *Acanthamoeba polyphaga*; ПНВК были подсчитанными таблицами, опубликованными Американской ассоциацией здравоохранения (1) без изменений. Однако исследователи не сделали подробного комментария о фактической пользе данного метода при его использовании для подсчета *Acanthamoeba*. В настоящем исследовании было установлено, что техника ПНВК является простым методом, который, при повторном использовании, позволяет достичь последовательного определения амебоцидной активности различных МЦР. Несмотря на то, что в данном исследовании изучали только МЦР, планируется провести работу для использования данного метода для определения амебоцидной активности одно- и двухэтапных систем на основании перекиси водорода.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **ТАБЛИЦА 1 Ингредиенты и производители МЦР** | **Хелирующее**  **средствоb** | Динатрия эдетат (0,1%) | Динатрия эдетат (0,1%) | Гидранат (гидроксиалкила фосфонат) (0,03%),  ЭДТА (0,1%) | ЭДТА (0,5%) | Динатрия эдетат (0,025%) | ЭДТА (0,02%) | a PHMB и фенилгексанид - одинаковые консерванты.  b ЭДТА и динатрия эдетат - одинаковые хелирующие средства. |
| **Очищающее или смазывающее средство** | Полоксамин | Полоксамер | Полоксамин (1%) | Полоксамина цитрат | Полоксамер 407 | Полоксамер (0,05%),  гидроксипропил  метилцеллюлоза (0,15%) |
| **Буферная система** | Фосфат | Фосфат | Натрия борат,  борная кислота | Борат, сорбитол  аминометила пропанол | Натрия гидрофосфат | Натрия фосфат |
| **Консервант(ы)** | 0,0005% полигексанид | 0,0001% полигексанид | 0,0001% полигексанид | 0,001% поликвад (полидрония  хлорид), 0,0005% Альдокс  (миристамидопропил диметиламин) | 0,0001% полигексанид | 0,0001% PHMB |
| **Производитель** | Sauflon | Sauflon | Bausch  & Lomb | Alcon | Ciba Vision | Allergan |
| **МЦР** | All-in-One | All-in-One (Light) | Renu MultiPlus | Optifree Express | Solo-care soft | Complete |

**ТАБЛИЦА 2 Таблица для оценки ПНВК *Acanthamoeba* на миллилитр испытуемых универсальных растворов*a***

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Число положительных аликвот из  бульонов по ДИ, нейтрализующих дезинфектант | | | ПНВК | Наиболее вероятный диапазон  (95% ДИ)*b* | Число положительных аликвот из  бульонов по ДИ, нейтрализующих дезинфектант | | | ПНВК | Наиболее вероятный диапазон  (95% ДИ) |
| 1 мл | 0,1 мл | 0,01 мл | 1 мл | 0,1 мл | 0,01 мл |
| 0 | 0 | 0 | <1 | <1 | 4 | 4 | 0 | 320 | 290-340 |
| 0 | 0 | 1 | 20 | 20 | 4 | 4 | 1 | 380 | 340-410 |
| 0 | 1 | 0 | 20 | 20 | 5 | 0 | 0 | 220 | 200-230 |
| 1 | 0 | 0 | 20 | 20 | 5 | 0 | 1 | 290 | 250-340 |
| 1 | 0 | 1 | 40 | 40 | 5 | 0 | 2 | 410 | 360-500 |
| 1 | 1 | 0 | 40 | 40 | 5 | 1 | 0 | 310 | 270-360 |
| 1 | 2 | 0 | 50 | 50 | 5 | 1 | 1 | 430 | 360-500 |
| 2 | 0 | 0 | 40 | 40 | 5 | 1 | 2 | 600 | 500-700 |
| 2 | 0 | 1 | 50 | 50 | 5 | 1 | 3 | 850 | 700-950 |
| 2 | 1 | 0 | 50 | 50 | 5 | 2 | 0 | 500 | 400-550 |
| 2 | 1 | 1 | 70 | 70 | 5 | 2 | 1 | 700 | 600-800 |
| 2 | 2 | 0 | 70 | 70-90 | 5 | 2 | 2 | 950 | 800-1 100 |
| 2 | 3 | 0 | 110 | 110 | 5 | 2 | 3 | 1 200 | 1 050-1 350 |
| 3 | 0 | 0 | 70 | 70 | 5 | 3 | 0 | 750 | 650-900 |
| 3 | 0 | 1 | 90 | 90 | 5 | 3 | 1 | 1 100 | 900-1 250 |
| 3 | 1 | 0 | 90 | 90 | 5 | 3 | 2 | 1 400 | 1 200-1 600 |
| 3 | 1 | 1 | 130 | 130 | 5 | 3 | 3 | 1 750 | 1 550-2 000 |
| 3 | 2 | 0 | 130 | 130 | 5 | 3 | 4 | 2 100 | 1 850-2 400 |
| 3 | 2 | 1 | 160 | 140-160 | 5 | 4 | 0 | 1 300 | 1 100-1 500 |
| 3 | 3 | 0 | 160 | 140-160 | 5 | 4 | 1 | 1 700 | 1 500-2 000 |
| 4 | 0 | 0 | 110 | 110-130 | 5 | 4 | 2 | 2 200 | 1 900-2 500 |
| 4 | 0 | 1 | 140 | 140-160 | 5 | 4 | 3 | 2 800 | 2 400-3 200 |
| 4 | 1 | 0 | 160 | 140-160 | 5 | 4 | 4 | 3 450 | 3 000-3 900 |
| 4 | 1 | 1 | 200 | 180-200 | 5 | 5 | 0 | 2 400 | 2 000-2 800 |
| 4 | 2 | 0 | 200 | 180-220 | 5 | 5 | 1 | 3 500 | 2 900-4 200 |
| 4 | 2 | 1 | 250 | 230-270 | 5 | 5 | 2 | 5 400 | 4 500-6 600 |
| 4 | 3 | 0 | 250 | 230-270 | 5 | 5 | 3 | 9 100 | 7 500-11 000 |
| 4 | 3 | 1 | 310 | 290-340 | 5 | 5 | 4 | 16 000 | 13 500-19 000 |
|  |  |  |  |  | 5 | 5 | 5 | >18000 | >18000 |

*a* Таблица была взята из работы Tillett (52).

*b* Наиболее вероятный диапазон охватывает числа, которые составляют, как минимум, 95% ПНВК. ДИ, доверительный интервал

*c* Было испытано пять аликвот каждого разведения.

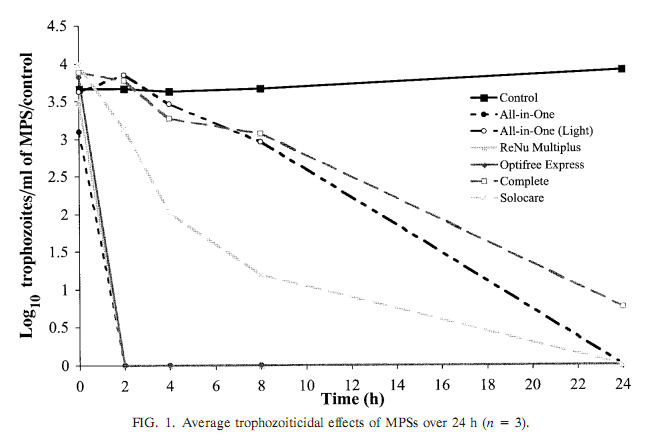
**ТАБЛИЦА 3. Среднее значение и стандартное отклонение log10 числа репликатов*a* трофозоитов и цист *Acanthamoeba* в начале эксперимента (0 ч) после МРПВД (см. результаты по времени) и через 24 ч, а также среднее логарифмическое уменьшение для трофозоитов и цист после МРПВД и через 24 ч**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| МЦР | Среднее (СО) log10 число  в 0 ч | | Среднее (СО) log10 число  после МРПВД | | Логарифмическое уменьшение после  МРПВД | | Среднее (СО) log10 число  через 24 ч | | Логарифмическое уменьшение через 24 ч | |
|  | Трофb | Цисты | Троф | Цисты | Троф | Цисты | Троф | Цисты | Троф | Цисты |
| Контроль | 3,67 (0,11) | 3,60 (0,44) | 3,63 (0,30) | 3,54 (0,20) | 0,04 | 0,06 | 3,90 | 3,68 | - 0,23 | - 0,08 |
| All-in-One | 3,10 (0,36) | 3,74 (0,21) | 0 (0) | 0,30 (0) | 3,10 (ОУ*c*) | 3,44 | 0 (0) | 0 (0) | 3,10 (ОУ) | 3,74 (ОУ) |
| All-in-One (Light) | 3,63 (0,30) | 3,58 (0,48) | 3,46 (0,97) | 3,46 (0,32) | 0,17 0, | 12 | 0 (0) | 2,00 (0,97) | 3,63 (ОУ) | 1,58 |
| ReNu Multiplus | 3,49 (0,09) | 3,68 (0,24) | 0 (0) | 2,70 (0,96) | 3,49 (ОУ) | 0,98 | 0 (0) | 0,53 (0,92) | 3,49 (ОУ) | 3,15 |
| Optifree Express | 3,82 (0,34) | 3,60 (0,11) | 0 (0) | 3,42 (0,49) | 3,82 (ОУ) | 0,18 | 0 (0) | 2,37 (0,68) | 3,82 (ОУ) | 1,23 |
| Завершено | 3,89 (0,27) | 3,74 (0,21) | 3,27 (0,47) | 3,73 (0) | 0,62 | 0,01 | 0,76 (0,69) | 2,65 (0,41) | 3,13 | 1,09 |
| Solo-care soft | 3,98 (0,38) | 3,74 (0,21) | 3,91 (0,37) | 3,73 (0,19) | 0,07 | 0,01 | 0 (0) | 1,47 (1,56) | 3,98 (ОУ) | 2,27 |

*a* Было испытано три репликата трофозоитов и цист.

*b* Троф - трофозоиты.

*c* ОУ - общее уничтожение



Контроль

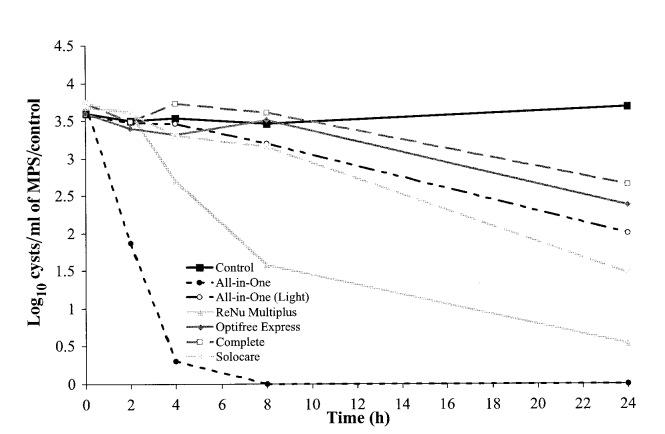
Время (ч)

Log10 трофозоитициды/мл МЦР/контроль

РИС. 1 Средние трофозоитицидные эффекты МЦР в течение 24 часов (*n* \_ 3).

Контроль

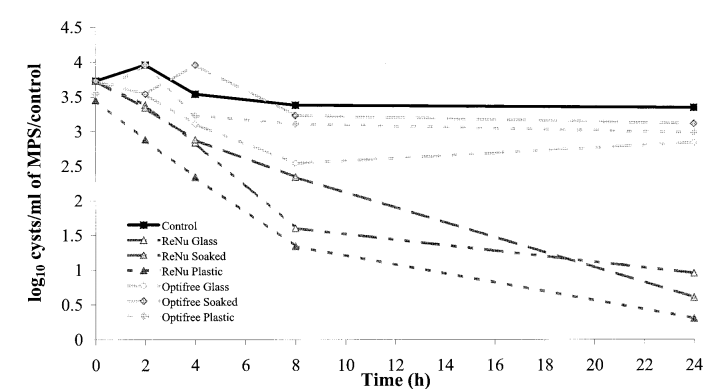
Время (ч)



Log10 цистиды/мл МЦР/контроль

РИС. 2 Средние цистицидные эффекты МЦР в течение 24 часов (*n* \_ 3).

РИС. 3 Цистицидные эффекты растворов ReNu Multiplus и Optifree Express в пластиковых и стеклянных пробирках, а также в пластиковых и стеклянных пробирках, смоченных МЦР в течение 24 ч.



 Log10 цистиды/мл МЦР/контроль

 Время (ч)

 Контроль

Бак (Buck) и соавт. (4) сделали заключение в своем обзоре методов, используемых для оценки эффективности растворов контактных линз против *Acanthamoeba* путем перечисления ключевых процедур, которые должны быть включены в любой "стандартный" метод, используемый для изучения эффективности раствора для контактных линз. Во-первых, необходимо использовать вид *Acanthamoeba*, связанный с кератитом, а именно, *A. castellanii* или *A. polyphaga.* При этом необходимо использовать штам, который хорошо размножается в аксеничных условиях и позволяет достичь достаточного числа организмов для определения антиамебного действия и сравнения активности с активностью контрольного раствора. Должен быть включен подходящий этап нейтрализации, чтобы остановить активность раствора для контактных линз; необходимо также оценить токсичность нейтрализатора. Наконец, необходимо использовать адекватный метод извлечения, с помощью которого можно определить жизнеспособность и подсчитать количество выживших организмов. Настоящий протокол соответствует вышеуказанным критериям. *A. castellanii*, один из наиболее распространенных патогенных микроорганизмов, вызывающих АК, был выбран в качестве испытуемого организма. Амебы выращивались в аксеничных условиях, и были получены многочисленные трофозоиты и инцистирование на чашках с НПА при отсутствии бактерий, продуцирующих многочисленные зрелые цисты с двойной стенкой. Дезинфектант МЦР был доведен до конечной точки нейтрализующим бульоном по ДИ, который виспытании, описанном Баком (Buck) и Розенталем (Rosenthal) (2), был определен как не оказывающий токсических эффектов на амебы. Наконец, техника ПНВК обеспечила простой метод, с помощью которого была определена жизнеспособность и подсчитано количество выживших микроорганизмов, главным образом, путем определения присутствия или отсутствия амебоцитного роста на культурных чашках, полученных из трех 1-кратных разведений, которые культивировали пять раз, и считывания количества микроорганизмов, хоть и адаптированных к чашкам ПНВК. Мы считаем, что данный новый метод, включающий подсчет ПНВК обеспечивает основу для стандартизированного испытания амебоцидной активности растворов для контактных линз.

За исключением раствора Optifree Express, все растворы, содержащие консервант PHMB в концентрации 5 ppm в растворе All-in-One и в концентрации 1 ppm во всех остальных растворах. В нескольких исследованиях изучали как минимальную трофозоитную амебоцидную концентрацию (MTAC), так и минимальную цистицидную концентрацию (MCC) PHMB. Ларкин (Larkin ) и соавт. (26) провели in vitro испытание чувствительности изолятов *Acanthamoeba* с роговицы к различным лекарственным препаратам, и определили, что MTAC PHMB составляет 0,87 мкг/мл (диапазон: 0,49-1,49мкг/мл для пяти изолятов), а MCC составляет 2,11мкг/мл (диапазон от 0,97 до 3,9мкг/мл для пяти изолятов) после 48 часов экспозиции. В подобном исследовании изолятов *Acanthamoeba* с роговицы Хей (Hay) и соавт. (14) показали, что MTAC PHMB составляет 1мкг/мл, а MCC составляет 3мкг/мл после 48 часов экспозиции. В третьем исследовании, проведенном Элдером (Elder) и соавт., (12) было показано, что MTAC PHMB составляет 1,3мкг/мл, а MCC составляет 2,2мкг/мл после 48 часов экспозиции. Таким образом, не является неожиданным, что раствор All-in-One, который содержит 5 мкг PHMB в 1 мл (5 ppm), был как трофозоитицидным, так и цистицидным после 24 ч экспозиции; однако, раствор также эффективно уничтожал как трофозоитоы, так и цисты с МРПВД 4 ч. Ожидалось, что остальные растворы, содержащие 1 мкг PHMB в 1 мл (1 ppm), проявят трофозоитицидный эффект после 24 ч экспозиции, но не ожидалось, что они полностью уничтожат трофозоитов, чего достигли все растворы, кроме Complete (3,13-логарифмическое уменьшение). Не ожидалось, что растворы, содержащие 1 ppm PHMB, окажут цистицидный эффект через 24 ч, не говоря о МРПВД; однако после 24 ч экспозиции все растворы, за исключением раствора ReNu Multiplus, продемонстрировали логарифмическое уменьшение числа жизнеспособных амеб в пределах от 1,09 до 2,27; раствор ReNu Multiplus уничтожид \_99,9% цист.

Компания Alcon, производитель раствора Optifree Express (который содержит Поликвад и Альдокс), провела несколько исследований амебоцидной активности их МЦР (3, 42, 43). После 6 ч экспозиции было установлено, что раствор Optifree Express вызвал логарифмическое уменьшение жизнеспособности 1,3 - 4,8 для трофозоитов и 2 - 3,2 для цист различных видов и штаммов *Acanthamoeba* (3, 42, 43). В независимом исследовании, проведенном Килвингтоном (Kilvington) (20)

с использованием различных видов *Acanthamoeba*, включая *A. castellanii* и *A. polyphaga*, раствор Optifree Express достиг логарифмического уменьшения жизнеспособности приблизительно 4 для трофозоитов и 2-3 для цист после МРПВД. Однако Килвингтон (Kilvington) и Энджер (Anger ) (21) недавно провели исследование эффективности раствора Optifree Express против цист *A. polyphaga*, произведенных с использованием различных методов, т.е. определенной инкапсулирующей среды с постоянным рН Неффа (Neff) и соавт. (35) или чашками с НПА, засеянными *Escherichia coli*, а также различными стадиями зрелости. Они установили, что независимо от метода, используемого для получения зрелых цист (7 дней инкубации в обоих метода), экспозиция раствора Optifree оказывала незначительный эффект, достигая логарифмического уменьшения лишь 0,3-0,5. Логарифмические уменьшения жизнеспособности 1,1 - 2 были, однако, достигнуты с использованием незрелых цист, полученных после 0,5 и 1 дня инкубации в установленной инкапсулирующей среде с постоянным значением рН Neff et al. (35). Mowrey- McKee (M. F. Mowery-McKee, Abstr. Assoc. Res. Vision Ophthalmol., abstr. 3084, 2002) также показали, что Optifree Express обладал ограниченным амебоцидным эффектом по истечении рекомендованного времени дезинфекции 6 ч, когда его снова испытывали в отношении *A. castellanii*, а полученные логарифмические уменьшения составили 2,5 и 0,5 для трофозоитов и цист, соответственно. В настоящем исследовании после 6 ч экспозиции раствор Optifree Express привел к среднему логарифмическому уменьшению 3,82 и 0,18 для трофозоитов и цист, соответственно.

В ходе обзора методов, используемых для оценки эффективности растворов для контактных линз, Бак (Buck) и соавторы (4) предположили, что на первый взгляд противоречивые результаты активности растворов для контактных линз в отношении *Acanthamoeba* частично объяснялись вариациями используемой методологии. Они включали штамм организма, образование цисты, приготовление инокулята, нейтрализацию испытуемого раствора, метод количественного определения и определение жизнеспособности выживших микроорганизмов, как переменных, которые могут отвечать для различия в результатах различных исследований (4). Kilvington и Anger (21) позволили предположить, что разница в результатах, полученных в исследовании, проведенном ими в 2001 г и предыдущей работой (2) может быть связала с различными методами образования цист. Однако в исследовании, проведенном в 2001 г., (21) они заявили, что метод производства цист, используемый в данном исследовании не оказал эффекта на эффективности испытуемых растворов для линз; только стадия зрелости цист изменяла эффективность.

В настоящем исследовании в результате инкубации трофозоитов в установленной среде образования цист при постоянных значениях рН, проведенная Неффом (Neff) и соавторами (35) было получено множество круглых трофозоитов и незрелых цист, но не были получены зрелые цисты с двойной стенкой, даже после длительных периодов инкубации (4 или более недель). Чтобы решить данную проблему, мы вернулись к производству цист с использованием 10 - 14-дневной инкубации чашек NNA. Использование организмов, выросших в аксеничных условиях, в исследованиях эффективности позволило опустить проблему нежелательного органического содержимого, например, мертвых или живых бактерий, в исходном инокуляте. Данное преимущество было бы потеряно, если бы бактерии были помещены на этапе образования цисты, поэтому в чашки NNA бактерии не добавлялись. Таким образом, цисты были получены путем роста трофозоитов в аксеничных условиях в PPG в течение 4 дней до переноса организмов на чашки NNA на 10 - 14 дней инкубации. При исследовании цист после этого времени были выявлены зрелые цисты с четно видимыми внутренними и внешними стенками цисты.

Ван Дузи (Van Duzee) и Шлех (Schlech) (53) сообщали, что на активность различных компонентов растворов для контактных линз может повлиять контейнер, в котором проводятся испытаия. Один из активных ингредиентов в растворе Optifree Express, Альдокс, приклеивается к определенным типам пластика и PHMB, активные ингредиенты в остальных растворах приклеиваются к стеклу. Таким образом, перед началом проведения основного исследования, два испытуемых МЦР, Optifree Express (который содержит Альдокс) и All-in- One (который содержит PHMB), были испытаны как в пластиковых, так и в стеклянных флаконах. Раствор Optifree Express также был испытан в пластиковом флаконе, который был вымочен в растворе Optifree Express в течение ночи, а раствор ReNu Multiplus был испытан в стеклянном флаконе, который был вымочен в растворе ReNu Multiplus в течение ночи. Не отмечалось достоверных различий между различными испытуемыми флаконами с двумя растворами. Поскольку было показано, что ни пластиковый, ни стеклянный флаконы не оказывают влияния на испытание эффективности, оставшаяся часть испытания была проведена с использованием универсальных стеклянных флаконов.

Чтобы дезинфектант наподобие PHMB оказывал цистицидное действие, он должен получить доступ к внутренней части трофозоита внутри цисты. Наиболее очевидный способ такого действия - проникновение через остиолы или поры в двойной стенке клетки, которая связывает внешнюю экзоцисту в внетренней экзоцистой, таким образом, позволяя находящейся внутри амебе взаимодействовать с окружающей средой. Считается, что остиолы закрыты мукополисахаридом, который необходимо дестабилизировать, чтобы позволить проникновение дезинфектанта. Считается, что эффективность более высоких концентраций PHMB (5 ppm), выявленным в растворе All-in-One, объясняется связыванием данной высоко положительно заряженной молекулы с мукополисахаридом, что приводит к проникновению и необратимому повреждению клеточной мембраны и содержимого клетки. Повреждение клетки, вызываемое PHMB, связано, во-первых, с проникновением ионом кальция из плазматической мембраны. Данный фактор может усиливаться под воздействием хелирующего средства гидраната в растворе ReNu Multiplus, что может объяснить усиленные трофозоитицидное и цистицидное действия данного МЦР в сравнении с таковыми других растворов, содержащих 1 ppm PHMB. Быстрое хелирование ионов кальция за пределами клетки ускоряет дальнейшее вытекание из клетки, что приводит к разрыву белка и, наконец, к необратимому повреждению клетки. Альтернативной гипотезой является включение натрия бората и борной кислоты в состав раствора ReNu Multiplus, которые, как было показано, усиливают активность PHMB в два раза, несмотря на то, что было показано, что EDTA а концентрации 0,1% (м/об), которая также присутствует в составе раствора ReNu Multiplus, ингибирует активность в четыре раза (19). Поскольку используемая концентрация PHMB (1 ppm [1 г/мл]) находится на минимальном эффективном уровне (MTAC), эффекты состава могут быть ключевыми и могут объяснить разницу в активности различных коммерческих МЦР с одинаковой концентрацией PHMB (1 ppm).

Было установлено, что контактные линзы могут служить механическим вектором переноса *Acanthamoeba*, присутствующих в футляре для хранения, на поверхность роговицы, где впоследствии может возникнуть размножение и инвазия ткани роговицы, что в итоге приводит к развитию кератита (27). В настоящее время еще не известно, подвергают ли *Acanthamoeba*,попавшие в глаз с контактными линзами, пользователя повышенному риску развития других акантамебных инфекций. *Acanthamoeba*,попавшие в глаз с контактными линзами, наиболее вероятно, могут достигать носовой полости через слезный дренаж. У здоровых пациентов это не будет вызывать проблем, поскольку *Acanthamoeba* могут существовать как симбиотический организм в носоглотке очевидно здоровых людей (41). Однако еще необходимо повышает ли наличие *Acanthamoeba* в носоглотке лиц с нарушенным иммунитетом риск развития гранулематозного амебного энцефалита, заболевания центральной нервной системы (ЦНС), сопровождающегося, как смертельным исходом, которое, как считается, вызывается распространением *Acanthamoeba* с кровотоком из изначального очага в нижние дыхательные пути, кожу или открытые раны (28). Калбертсон (Culbertson) с коллегами, используя мышей, подтвердили, что *Acanthamoeba* могут достигать ЦНС напрямую через нейроэпителий органов обоняния подобно *Naegleria fowleri*, этиологическому агенту фульминантного первичного амебного менингоэнцефалита, инфекции ЦНС, подобной инфекции, вызываемой *Acanthamoeba*. Джонс (Jones ) и соавт. (18) зарегистрировали случай вызванного *Acanthamoeba* увеита , связанного с менингоэнцефалитом со смертельным исходом. Ввиду все более увеличивающейся популяции пациентов с нарушением иммунитета, вызванным инфекцией вируса иммунодефицита человека и СПИДа, трансплантацией, раком и лечением кортикостероидами, было бы разумно производить растворы для контактных линз, которые защищают пользователя от риска инфицирования *Acanthamoeba* не зависимо от состояния его иммунитета.

Было подтверждено, что основанное на ПНВК испытание эффективности МЦР, проведенное с использованием культированных в аксеничных условиях трофозоитов и зрелых цист, произведенных на чашках с НПА *A. castellanii* при отсутствии бактерий, является простой, надежной и воспроизводимой техникой, которую мы считаем пригодной на основании стандартного испытания эффективности, которому должны подлежать универсальные растворы для контактных линз. ПКЛ должны быть уверены, что рекомендованные им МЦР защищают от возможных серьезных инфекций.

**БЛАГОДАРНОСТЬ**

Мы благодарны компании Sauflon Pharmaceuticals, которая частично профинансировала разработку метода ПНВК.

**ССЫЛКИ**

1. **Американская Ассоциация Здравоохранения.** 1971. Стандартные методы исследования воды и сточных вод, 13ое изд., стр. 657. Американская Ассоциация Здравоохранения, Вашингтон, D.C.
2. **Бак, С. Л., и Р. A. Розенталь.** 1996. Количественный метод оценки нейтрализатора токсичности в отношении *Acanthamoeba castellanii*. Аппл. Энвайрон. Майкробайол. **62:**3521–3526.
3. **Бак, С.Л., Р. A. Розенталь и Р.Л. Абшир.** 1998. Амебоцидная активность консервированного универсального дезинфицирующего раствора для контактных линз по сравнению с дезинфицирующей/нейтрализующей пероксидной системой. Контакт Ленс Антериор Ай **21:**81–84.
4. **Бак, С.Л., Р. A. Розенталь, и Б. A. Шлех.** 2000. Методы, используемые для оценки эффективности растворов по уходу за контактными линзами и других соединений против *Акантамебы*: обзор литературы. СЛАО Дж. **26:**72–84.
5. **Ченг, K. Х., С. Л. Льюнг, С. Л., Х. У. Хокман, У. Х. Бикхез П. Дж. Х. Малдер, и A. Дж. M. Гирардс.** 1999. Заболеваемость микробным кератитом, связанным с ношением контактных линз и его клинические проявления. Лансет **354:**181–185.
6. **Коннор, C. Г., С. Л. Хопкинс, и Р. Д. Салисбэри.** 1991. Эффективность дезинфицирующих систем для контактных линз против *Acanthamoeba culbertsoni*. Оптом. Вис. Сай. **68:**138–141.
7. **Кульбертсон, C. Г., Дж. У. Смит, Х. K. Коэн, и Дж. Р. Миннер.** 1959. Экспериментальное заражение мышей и обезьян *Acanthamoeba*. Ам. Дж. Патол. **35:**185–197.
8. **Кульбертсон, C. Г.** 1971. Патогенность почвенной амебы. Анну. Рев. Майкробайол. **25:**231–254.
9. **Дэвис, П. Г., Д. A. Карон, и Дж. M. Сибурт.** 1978. Океанические амебы Северной Атлантики: культура, распространение и биосистематика. Транс. Ам. Майкроск. Soc. **97:**73–88.
10. **Девоншир, П., Ф. A. Манро, C. Абернети, и Б. Дж. Кларк.** 1993. Микробное загрязнение контейнеров для контактных линз на западе Шотландии. Бр. Дж. Офтальмол. **77:**41–45.
11. **Экелунд, Ф.** 1998. Перечень и численность простейших микофагов в почве, с особым акцентом на гетеротрофные жгутиковые. Соил Байол. Байохем. **30:**1343–1347.
12. **Элдер, M. Дж., С. Килвингтон, и Дж. K. Г. Дарт.** 1994. Клинико-патологическое исследование испытания in vitro на чувствительность и акантамебный кератит. Инвестиг. Офтальмол. Вис. Сай. **35:**1059–1064.
13. **Харрис, A. С. Д., K. Дж. Джонс, и Дж. Льюис.** 1998. Оценка точности и метода воспроизводимости наиболее вероятного количества (MNP) при оценке количества питательных напряженных диатомов в пробах донных наносов. Дж. Эксп. Мар. Байол. Экол. **231:**21–30.
14. **Хэй, Дж., C. M. Киркнесс, Д. В. Сил, и П. Райт.** 1994. Лекарственная резистентность и *Акантамебный кератит*: поиск альтернативной антипротозойный химиотерапии. Ай **8:**555–563.
15. **Хоуанг, E., Д. Лам, Д. Фан, и Д. Сил.** 2001. Микробный кератит в Гонконге: взаимосвязь с климатом, окружающей средой и дезинфекцией контактных линз. Транс. Р. Сок. Троп. Мед. Хайдж. **95:**361–367.
16. **Хуго, E. Р., У. Р. МакЛогхлин, K. Х. Ох, и O. Х. Туовинен.** 1991. Количественный подсчет *Акантамебы* для оценки инактивации кисты в растворах по уходу за контактными линзами. Инвестиг. офтальмол. Вис. Сай. **32:**655–657.
17. **Международная организация по стандартизации.** 2001. Офтальмологи—продукты по уходу за контактным линзами—микробиологические требования и методы испытаний для производства и схем гигиенического обращения с контактными линзами. ISO 14729.Международная организация по стандартизации, Женева, Швейцария.
18. **Джонс, Д. В., Г. С. Висвесъяра, и Н. M. Робинсон.** 1975. Кератит *Acanthamoeba polyphaga* и увеит *Acanthamoeba,* связанные с смертельным менингоэнцефалитом. Транс. Офтальмол. Сок. Ю. K. **95:**221–232.
19. **Ханкитти, У., Д. Ллойд, Дж. Р. Фурр, и A. Д. Расселл.** 1996. Смертельное действие бигуанидов на кисты и трофозоиты *Acanthamoeba castellanii*. Дж. Аппл. Бактериол. **81:**73–77.
20. **Килвингтон, С.** 1998. Амебоцидная активность нового дезинфицирующего раствора для контактных линз. Дж. Ам. Акад. офтальмол. **75:**277.
21. **Килвингтон, С., и C. Ангер.** 2001. Сравнение возраста кисты и методики определения эффективности дезинфицирующих веществ для контактных линз против *Acanthamoeba*. Бр. Дж. Офтальмол **85:**336–340.
22. **Кингстон, Д., и Д. C. Вархурст.** 1969. Выделение амеб из воздуха. Дж. Мед. Майкробайол. **2:**27–36.
23. **Кайле, Д. E., и Г. П. Ноблет.** 1986. Сезонное распространение термотолерантных свободноживущих амеб. И. Уиллард’с Понд. Дж. Протозоол. **33:**422–434.
24. **Лам, Д., E. Хоуанг, Д. Фан, Д. Лион, Д. В. Сил, E. Уонг, и Исследовательская группа по изучению микробного кератита Гонконга.** 2002. Случаи и факторы риска заражения микробным кератитом в Гонконге: сравнение с Европой и Северной Америкой. Ай **16:**608–618.
25. **Ларкин, Д. Ф. П., С. Килвингтон, и Д. Л. Эсти.** 1990. Заражение контейнеров для хранения контактных линз Акантамебой и бактериями. Бр. Дж. Офтальмол. **74:**133–135.
26. **Ларкин, Д. Ф. П., С. Килвингтон, и Дж. K. Г. Дарт.** 1992. Лечение Акантамебного кератита с помощью полигексаметилен-бигуанида. Офтальмолоджи **99:**185–191.
27. **Леди, Д. Р., Дж. Хэй, T. Дж. Баерс, Д. В. Сил, и C. M. Киркнесс.** 1996. *Acanthamoeba griffini*: молекулярная характеристика нового патогена роговицы. Инвестиг. Офтальмол. Вис. Сай. **37:**544–549.
28. **Мартинез, A. Дж., и Г. С. Висвесъяра.** 1997. Свободноживущие, амфизойные и оппортунистические амебы. Брэйн Патол. **7:**583–598.
29. **Матерс, У. Д., Дж. E. Сатфин, Р. Фольберг, П. A. Мейер, Р. П. Венцел, и Р. Г. Элджин.** 1996. Вспышка кератита предположительно вызванная Акантамебой. Ам. Дж. Офтальмол. **121:**129–142.
30. **МакКради, M. Х.** 1915. Численная интерпретация результатов бродильной трубки. Дж. Инфект. Диз. **17:**183–212.
31. **МакКради, M. Х.** 1918. Таблицы быстрой интерпретации результатов бродильной трубки. Паблик Хэлс J. **9:**201–220.
32. **Мергериан, Х.** 1991. Распространенность Акантамебы в окружающей среде человека. Рев. Инфект. Диз. **13:**410–412.
33. **Мур, M. Б., Дж. П. макКуллей, M. Лакенбах, Х. Гелендер, C. Ньютон, M. Б. МакДоналд, и Г. С. Висвесъяра.** 1985. *Акантамебный* кератит, связанный с ношением мягких контактных линз. Ам. Дж. Офтальмол. **100:**396–403.
34. **Наджингтон, Дж., П. Г. Ватсон, T. Дж. Плэйфэир, Дж. МакДжилл, Б. Р. Джонс, и A. Д. Штиле.** 1974. Амебные инфекции глаз. Лансет **ii:**1537–1540.
35. **Нефф, Р. Дж., С. A. Рэй, У. Ф. Бентон, и M. Уилборн.** 1964. Индукция синхронного инцистирования (дифференциация) в споры Акантамебы. Методс Селл Физиол. **1:**55–83.
36. **Пэйдж, Ф. C.** 1988. Иллюстрации пресноводных и почвенных амеб. Научная публикация № 34 Ассоциации специалистов по пресноводной флоре и фауне, Эмблсайд, Англия.
37. **Пенланд, Р. Л., и K. Р. Вильгельмус.** 1999. Микробиологический анализ бутилированной воды: безопасна ли она для использования с контактными линзами? Офтальмолоджи **106:**1500–1503.
38. **Перрин, Д., Дж. П. Чену, П. Джрджес, Дж. C. Ланселот, C. Сатурнино, И M. Робба.** 1995. Амебоцидная эффективность диамидинов против двух штаммов *Acanthamoeba polyphaga*. Антимикроб. Аджентс Хемотер. **39:**339–342.
39. **Радфорд, C. Ф., O. Дж. Леманн, и Дж. K. Г. Дарт.** 1998. *Акантамебный* кератит: многоцентровое исследование в Англии 1992–6. Бр. Дж. Офтальмол. **82:**1387–1392.
40. **Радфорд, C. Ф., Д. C. Майнэссиан, и Дж. K. Г. Дарт.** 2002. *Акантамебный* кератит в Англии и Уэльсе: заражение, исход, и факторы риска. Бр. Дж. Офтальмол. **86:**536–542.
41. **Ривера, Ф., Ф. Медина, П. Рамирез, Дж. Алкосер, Г. Вилаклара, и E. Роблес.** 1984. Патогенные и свободноживущие простейшие культивируются в носоглотке и ротовой области стоматологических больных. Эвайрон. Рес. **33:**428–440.
42. **Розенталь, Р. A., С. Л. Бак, C. МакАналли, Р. Абшир, и Б. Шлех.** 1999. ТОМ. 41, 2003 АМЕБОЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ УНИВЕРСАЛЬНЫХ РАСТВОРОВ 2999 Антимикробное сравнение нового универсального дезинфицирующего раствора с 3% системой перекиси водорода. СЛАО Дж. **25:**213–217.
43. **Розенталь, Р. A., C. Л. МакАналли, Л. С. МакНамии, С. Л. Бак, Р. Л. Шитцер, и Р. П. Стоун.** 2000. Широкий спектр антимикробной активности нового универсального дезинфицирующего раствора. СЛАО Дж. **26:**120–126.
44. **Сил, Д. В., Ф. Стэплтон, и Дж. Дарт.** 1992. Возможные источники *Акантамебной* споры в окружающей среде пользователи контактных линз. Бр. Дж. Офтальмол. **76:**424–427.
45. **Сил, Д. В., C. M. Киркнесс, Х. Г. Б. Беннетт, M. Петерсон, и Исследовательская группа по изучению кератита** 1999. Популяционное исследование когорты микробного кератита в Шотландии: заболеваемость и особенности. Контакт Ленс Антериор Ай **22:**49–57.
46. **Сил, Д. В., C. M. Киркнесс, Х. Г. Б. Беннетт, M. Петерсон, и Исследовательская группа по изучению кератита.** 1999. *Акантамебный* кератит в Шотландии: факторы риска для пользователей контактных линз. Контакт Ленс Антериор Ай **22:**58–68.
47. **Силвани, Р. E., Дж. M. Дугерти, Дж. П. МакКуллей, T. С. Вуд, Р. У. Боуман, и M. Б. Мур.** 1990. Воздействие существующих дезинфицирующих систем для контактных линз на *Acanthamoeba castellanii* и *Acanthamoeba polyphaga*. Офтальмолоджи **97:**286–290.
48. **Штер-Грин, Дж. K., T. M. Бэйли, и Г. С. Висвесъяра.** 1989. Эпидемиология *Акантамебного* кератита в Соединенных Штатах. Ам. Дж. Офтальмол. **107:**331–336.
49. **Стивенсон, Р., и Д. В. Сил.** 1998. Способствовало ли снижению заболеваемости *Акантамебным* кератитом среди пользователей контактных линз внедрение универсальных растворов? Контакт Ленс Антериор Ай **21:**89–92.
50. **Стевик, K., Дж. Ф. Ханссен, и П. Д. Йенссен.** 1998. Сравнение между методом прямого подсчета DAPI (DDC) и наиболее вероятным количеством (MPN) для определения количества простейших в инфильтрационных системах. Дж. Майкробайол. Методс **33:**13–21.
51. **Тиллетт, Х. E., и Р. Колеман.** 1985. Расчетное количество бактерий в образцах из неоднородных водоемов: как следует понимать результаты MPN и мембранной фильтрации? Дж. Аппл. Бактериол. **59:**381–388.
52. **Тиллетт, Х. E.** 1987. Наиболее вероятное количество организмов: пересмотренные таблицы для титрационного метода. Эпидемиол. Инфект. **99:**471–476.
53. **Ван Дуци, Б., и Б. Шлех.** 1999. Активность универсального раствора против *Акантамебы*. Оптишиан **217:**34–35. 3000 БИТТИ И ПР. Дж. КЛИН. МАЙКРОБАЙОЛ.

1. \* Автор для направления корреспонденции. Почтовый адрес: Department of Vision Sciences, City Campus, Glasgow Caledonian University, Cowcaddens Rd., Glasgow G4, Scotland. Телефон: 44 141 331 3695. Факс: 44 141 331 3387. E-mail: t.k.beattie@gcal.ac.uk. [↑](#footnote-ref-1)