

Kerentanan Sista *Acanthamoeba* Pencilan Klinikal Terhadap Chlorhexidine dan Tobramycin

Susceptibility of *Acanthamoeba* Cysts from Clinical Isolates against Chlorhexidine and Tobramycin

MOHAMED KAMEL ABD GHANI, NUR HAZIQAH OMAR, ANISAH NORDIN &
NORAINA AB RAHIM

ABSTRAK

Acanthamoeba spp. adalah ameba hidup bebas yang berpotensi menyebabkan kebutaan pada pesakit keratitis. Keratitis *Acanthamoeba* merupakan suatu jangkitan serius pada kornea yang disebabkan oleh *Acanthamoeba* spp. terutamanya dalam kalangan pemakai kanta sentuh. Kesukaran dalam menyediakan rawatan yang berkesan kepada pesakit berlaku apabila sista *Acanthamoeba* cenderung untuk menjadi rintang terhadap kebanyakan agen antimikrob. Oleh itu, kajian ini dijalankan untuk menilai kerentanan sista *Acanthamoeba* terhadap agen antimikrob pada dos terapeutik dan menentukan kepekatan sistisidal minimum (MCC); 0.02% chlorhexidine dan 0.3% tobramycin pada isolat klinikal (HUKM 74 dan HS 72) di Malaysia. Suspensi sista telah diuji terhadap agen antimikrob yang telah dicairkan secara serentak dalam plat mikrotiter. Selepas 24 jam inkubasi pada 30°C, suspensi sista dipindahkan ke dalam vial 1.5 ml dan diemparkan. Sedimen sista dikulturkan pada plat agar bukan nutrien (NNA) yang mengandungi *Escherichia coli*. Plat agar diinkubasi selama 48 jam dan pertumbuhan trofozoit dari sista diperhatikan secara mikroskopik selama 14 hari, nilai kepekatan sistisidal minimum (MCC) juga ditentukan. Kehadiran trofozoit menunjukkan bahawa agen antimikrob yang digunakan tidak berkesan terhadap sista *Acanthamoeba*. Chlorhexidine dan tobramycin telah menunjukkan keberkesanan terhadap kedua-dua pencilan yang diuji. Chlorhexidine menunjukkan MCC terendah iaitu 12.5 µg/ml manakala tobramycin di antara 750-1500 µg/ml. Kesimpulannya, chlorhexidine adalah agen sistisidal yang lebih baik untuk *Acanthamoeba* spp. dan masih sesuai digunakan untuk rawatan keratitis *Acanthamoeba*.

Kata kunci : Anti- *Acanthamoeba*, Tobramycin, Chlorhexidine

ABSTRACT

Acanthamoeba spp. are ubiquitous free-living amoeba causing potentially blinding infection of the cornea. *Acanthamoeba* keratitis is one of the serious ocular infections caused by *Acanthamoeba* spp. especially among contact lens wearer. The difficulties in providing effective treatment to the patients occur as *Acanthamoeba* cysts tend to be resistant towards most antimicrobial agents. Therefore, this study aimed to evaluate the susceptibility of *Acanthamoeba* cysts towards antimicrobial agents (0.02% chlorhexidine and 0.3% tobramycin) at therapeutic dose and to determine its minimum cysticidal concentration (MCC) on clinical isolates (HUKM 74 and HS 72) in Malaysia. The cyst suspension was tested against antimicrobial agents which had been serially diluted in the microtiter plate. After 24 hours of incubation at 30°C, the cyst suspension was transferred into 1.5 ml vials and then centrifuged. The cysts deposits were cultured on non-nutrient agar (NNA) plate containing *Escherichia coli*. The agar plates were incubated for 48 hours and the growth of trophozoites from cysts was observed microscopically for 14 days, and the value of minimum cysticidal concentration (MCC) was also determined. The presence of trophozoites indicates that the antimicrobial agents used are ineffective against the *Acanthamoeba* cysts. Chlorhexidine and tobramycin were effective against both isolates used. Chlorhexidine shows the lowest MCC value at 12.5 µg/ml while tobramycin varying from 750-1500 µg/ml. In conclusion, chlorhexidine is the better cysticidal agent for *Acanthamoeba* spp. and is still suitable for use in the treatment of *Acanthamoeba* keratitis.

Key words : Anti- *Acanthamoeba*, Tobramycin, Chlorhexidine

PENDAHULUAN

Acanthamoeba merupakan ameba hidup bebas yang berkebolehan untuk hidup di pelbagai jenis persekitaran termasuklah air, tanah dan juga udara.

Acanthamoeba sp. boleh dipencilkan dari air semula jadi dan terawat, air laut, kolam renang, kumbahan, sedimen, unit penghawa dingin, air paip domestik dan sebagainya (Lorenzo et al. 2005). Sejak tahun 1960, *Acanthamoeba* telah dikenali sebagai

organisma yang patogenik kepada manusia. Jangkitan parasit *Acanthamoeba* adalah sangat jarang berlaku namun sekiranya berlaku, manusia akan mengalami infeksi yang teruk (Perez-Santoja et al. 2003).

Acanthamoeba mempunyai dua peringkat hidup iaitu peringkat trofozoit yang aktif dan peringkat sista yang dorman (De Jonckheere 1991). Pada persekitaran yang tidak bersesuaian, trofozoit akan bertukar kepada bentuk sista dengan membentuk dua lapisan dinding yang sangat tebal (Khan 2003). Sista diketahui sebagai peringkat yang sangat rintang dan mempunyai saiz di antara 5 hingga 20 μm (Bowers et al. 1968). *Acanthamoeba* boleh dikelaskan kepada tiga kumpulan morfologi iaitu kumpulan I, II dan III berdasarkan saiz dan bentuk sista (Marciano-Cabral & Cabral 2003).

Kes keratitis *Acanthamoeba* yang pertama di Malaysia telah dilaporkan oleh Kamel dan Norazah pada tahun 1995. Kes ini melibatkan seorang wanita yang berusia 40 tahun yang juga merupakan seorang pengguna kanta sentuh (Kamel & Norazah 1995). Disebalik rawatan dengan agen antimikrob titisan mata seperti Zovirax®, gentamicin, miconazole, neosporin dan ketoconazole yang telah diberikan kepada pesakit, keadaannya tidak menunjukkan sebarang kemajuan dan akhirnya, pesakit telah mendapatkan rawatan di luar negara (Kamel & Norazah 1995). Selepas kes pertama keratitis *Acanthamoeba* dilaporkan, lebih banyak kes keratitis *Acanthamoeba* ditemui selepas itu (Kamel et al. 2000).

Diagnosis awal dan terapi yang bersesuaian adalah penting bagi merawat infeksi berkaitan *Acanthamoeba*. Sekiranya terapi berkesan ditangguhkan selama tiga minggu atau lebih, prognosis akan semakin merosot (Claerhout et al. 2004). Justeru, tahap kerentanan pencilan sista *Acanthamoeba* seharusnya dinilai terlebih dahulu bagi menentukan terapi terbaik dalam merawat pesakit (Narasimhan et al. 2002). Rawatan bagi infeksi keratitis *Acanthamoeba* adalah sangat sukar dan memerlukan tempoh rawatan yang lama. Kesukaran yang dihadapi ini disumbang oleh kehadiran sista *Acanthamoeba* yang sangat rintang terhadap agen antimikrob (Lorenzo et al. 2005). Kenyataan ini turut disokong oleh penyelidikan yang telah dijalankan oleh Kamel dan rakan-rakan (1995), bahawa sesetengah spesies sista *Acanthamoeba* adalah sangat rintang terhadap agen antimikrob. Oleh itu, kajian ini dilakukan

menggunakan dua jenis agen antimikrob iaitu chlorhexidine dan tobramycin bagi menilai keberkesanannya terhadap sista *Acanthamoeba* sp. pencilan klinikal.

BAHAN DAN KAEDAH

Sumber *Acanthamoeba* sp.

Pencilan *Acanthamoeba* spp. bagi kajian ini diperolehi daripada Makmal Kultur *Acanthamoeba*, Jabatan Parasitologi, Fakulti Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia. Strain *Acanthamoeba* spp. digunakan adalah strain klinikal yang dipencilkan daripada kes keratitis iaitu HS 72 dan HUKM 74.

Isolat *Acanthamoeba* disubkultur di atas agar bukan nutrien (NNA) dibiarkan selama 14 hari supaya semua peringkat trofozoit *Acanthamoeba* bertukar kepada peringkat sista bagi menetapkan umur sista yang digunakan dalam kajian ini.

Agen Antimikrob

Agen antimikrob yang digunakan dalam kajian ini adalah 0.02 % chlorhexidine dan 0.3% tobramycin yang diperolehi daripada farmasi.

Kaedah Pemprosesan Sampel

Suspensi sista divorteks selama satu minit sebelum digunakan supaya sista dapat ditaburkan secara rata di dalam larutan salin Page. Sejumlah 10 μl suspensi sista dipipet ke dalam 100 μl larutan antimikrob yang telah menjalani pencairan sebanyak dua kali di sepanjang plat mikrotiter. Suspensi sista ditambahkan ke dalam semua telaga mikrotiter kecuali telaga bagi kawalan negatif. Seterusnya, campuran tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C (Kilvington et al. 2002).

Setelah proses inkubasi selesai, campuran dalam telaga dibilas dengan 100 μl larutan salin Page ke dalam vial yang berisipadu 1.5 ml supaya tiada sista yang tertinggal di dalam plat mikrotiter dan juga bagi menyingkirkan agen antimikrob yang terdapat di sekeliling sista. Langkah ini diulang sebanyak tiga kali bagi tujuan yang sama. Vial kemudian diemparkan pada kelajuan 740 xg (2570 rpm) selama lima minit (Niszl et al. 1995). Seterusnya, sedimen sista di dalam vial dipindahkan ke atas agar bukan nutrien yang telah dititiskan dengan suspensi *E. coli* dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C. Selepas 48 jam tempoh inkubasi selesai, agar diperhatikan di bawah mikroskop kebalikan selama 14 hari untuk melihat

sebarang kehadiran trofozoit yang telah bertukar daripada sista. Kepekatan minimum sistisidal bagi sesuatu agen antimikrob pula ialah kepekatan minimum di mana tiada pertumbuhan trofozoit daripada sista berlaku selepas 14 hari inkubasi

dijalankan. Hasil yang diperoleh akan digunakan sebagai perbandingan dengan kawalan positif di mana kehadiran trofozoit dipastikan dalam tempoh 24 hingga 48 jam inkubasi dengan inokulasi *E. coli* di atas permukaan agar bukan nutrien.

KEPUTUSAN

JADUAL 1. Keputusan Ujian Kawalan Antimikrob Chlorhexidine dan Tobramycin

Isolat	Kawalan				
	Positif		Negatif		
	Larutan PAS + sista	3% H ₂ O ₂ + sista	Larutan PAS	0.02% chlorhexidine	0.3% tobramycin
HUKM 74	+	-	X	X	X
HS 72	+	-	X	X	X

Petunjuk:

+	Kehadiran sista dan trofozoit <i>Acanthamoeba</i>
-	Tiada trofozoit <i>Acanthamoeba</i>
X	Tiada sista dan trofozoit <i>Acanthamoeba</i>
H ₂ O ₂	Hidrogen peroksida
PAS	Page amebic saline

JADUAL 2. Keberkesanan Antimikrob pada Dos Terapeutik

Isolat	0.02% chlorhexidine	0.3% tobramycin
HUKM 74	√	√
HS 72	√	√

Petunjuk:

√	Antimikrob berkesan (Tiada trofozoit)
X	Antimikrob tidak berkesan (Terdapat kehadiran trofozoit)

JADUAL 3. MCC ($\mu\text{g/ml}$) Antimikrob terhadap isolat *Acanthamoeba* spp.

Isolat	0.02% chlorhexidine	0.3% tobramycin
HUKM 74	12.5	1500
HS 72	12.5	750

PERBINCANGAN

Tahap keberkesanan sesuatu agen antimikrob yang digunakan diukur dengan kebolehan untuk memusnahkan kedua-dua peringkat *Acanthamoeba* iaitu trofozoit dan sista (Gatti et al. 1998). Pemilihan ubat-ubatan yang digunakan bagi merawat keratitis *Acanthamoeba* perlu bersifat amebisidal dan sistisidal kerana terdapat kemungkinan serta risiko untuk ameba dari sista yang lebih rintang untuk kembali hidup semula (Schuster & Visvesvara, 2004). Antara rawatan perubatan yang telah dikenalpasti berjaya merawat keratitis *Acanthamoeba* termasuklah ubat titis mata yang poten. Dalam kajian ini, dos rawatan 0.02% larutan chlorhexidine dan 0.3 % tobramycin telah digunakan ke atas sista *Acanthamoeba*. Julat kepekatan chlorhexidine yang digunakan adalah daripada 200 $\mu\text{g/ml}$ hingga 0.0977 $\mu\text{g/ml}$ manakala tobramycin daripada 3000 $\mu\text{g/ml}$ sehingga 1.464 $\mu\text{g/ml}$.

Chlorhexidine merupakan sejenis antimikrob kumpulan biguanida yang telah menunjukkan potensi yang sangat baik dalam merawat infeksi keratitis *Acanthamoeba*. Kumpulan biguanida telah mempamerkan nilai kepekatan minimal sistisidal dan amebisidal paling rendah jika dibandingkan dengan agen antimikrob yang lain (Dart et al. 2009). Chlorhexidine diketahui bertindak secara aktif ke atas kulat, bakteria gram negatif serta positif. Pada kepekatan rendah, chlorhexidine sering kali digunakan dalam rawatan penyakit yang melibatkan telinga, kulit dan rongga mulut. Berdasarkan hasil kajian ini, chlorhexidine dan tobramycin telah menunjukkan keberkesanan terhadap kedua-dua penciran yang diuji. Melalui ujian kepekatan minimum sistisidal yang telah dijalankan, chlorhexidine telah menunjukkan nilai min yang jauh lebih rendah berbanding dengan tobramycin iaitu 12.5 $\mu\text{g/ml}$. Perolehan ini jelas membuktikan bahawa chlorhexidine mempunyai aktiviti sistisidal yang lebih baik berbanding

tobramycin. Kajian kami yang lepas juga menunjukkan chlorhexidine berkesan terhadap 5 isolat klinikal *Acanthamoeba* (Mohamed Kamel et al. 2019).

Mekanisma utama chlorhexidine sebagai agen antimikrob adalah dengan mengganggu mukopolisakarida sista pada peringkat ostiol dan juga pada bahagian dalam dwi lapisan membran (Lim et al. 2008). Ini akan mengakibatkan kerosakan membran sel dengan kehilangan elektrolit dan kalsium daripada sitoplasma sekaligus menyebabkan kematian sel (Seal 2003). Chlorhexidine telah menunjukkan kriteria pembunuhan amebik dan sistisidal yang kuat pada kepekatan 200 g per ml (0.02%) serta ia digunakan secara klinikal bagi merawat keratitis *Acanthamoeba* (Siddiqui et al. 2016). Kenyataan ini dibuktikan dengan kajian yang telah dilaksanakan oleh Khunkitti dan rakan-rakan (1998) bahawa pengecutan pada dinding sista berlaku sekiranya dikenakan dengan agen antimikrob chlorhexidine pada kepekatan lebih daripada 100 $\mu\text{g/ml}$.

Penggunaan antimikrob secara kombinasi terbukti meningkatkan lagi kadar penetrasi sesuatu antimikrob ke atas sista *Acanthamoeba*. Chlorhexidine telah dicadangkan untuk diberi secara kombinasi bagi hasil yang lebih baik (Hay et al. 1994). Kombinasi di antara chlorhexidine, propamidine isethionate (Brolene®) dan gentamicin (1.5%) telah terbukti berkesan dalam merawat infeksi keratitis *Acanthamoeba* di Malaysia (Kamel et al. 2000). Selain itu, beberapa pengkaji telah bersetuju mencadangkan chlorhexidine sebagai terapi pertama bagi keratitis *Acanthamoeba* disebabkan tiada tindak balas negatif atau kesan toksisiti berlaku pada pesakit sepanjang rawatan dijalankan (Hay et al. 1994). Kosirukvongs dan rakan-rakan (1999), telah menjalankan penyelidikan secara in vivo ke atas lima pesakit keratitis *Acanthamoeba* dengan menggunakan chlorhexidine. Kesan positif dapat

dilihat apabila gejala-gejala yang terdapat pada pesakit berkurangan setelah aplikasi chlorhexidine ke atas kornea dilakukan. Kesan aktiviti chlorhexidine terhadap pelbagai sel pada kepekatan 0.02% juga dilihat tidak toksik dan selamat digunakan bagi tujuan klinikal (Seal et al. 1996).

Selanjutnya, penggunaan antibiotik titisan mata juga begitu sinonim dalam kaedah rawatan keratitis *Acanthamoeba*. Kebiasaannya, antibiotik digunakan di dalam kes yang melibatkan jangkitan bakteria namun berdasarkan penemuan yang diperolehi, antibiotik juga dipercayai mampu membunuh sista *Acanthamoeba* sp. yang diketahui sangat rintang terhadap kebanyakan agen antimikrob. Tobramycin merupakan sejenis antibiotik titisan mata kumpulan aminoglikosida yang berasal daripada *Streptomyces tenebrarius*. Antibiotik kumpulan aminoglikosida dan derivatifnya telah disyorkan sejak tahun 2005 lagi bagi rawatan yang melibatkan keratitis *Acanthamoeba* (Alizadeh et al. 2005). Antibiotik titisan mata Tobramycin 3 mg/mL mengandungi 3 mg tobramycin sebagai bahan aktif manakala 0.01 % benzalkonium klorida ditambah sebagai bahan pengawet. Tobramycin sangat mudah didapati kerana antibiotik ini boleh dibeli di kebanyakan farmasi di Malaysia.

Tobramycin kerap kali digunakan bagi merawat jangkitan yang berpunca daripada bakteria terutamanya jangkitan gram negatif. Antibiotik ini diketahui mempunyai spektrum aktiviti yang luas dan amat berkesan terhadap spesies *Pseudomonas*. Mekanisma utama tobramycin sebagai agen antimikrob adalah dengan merencat proses penghasilan protein. Kebanyakan perencatan penghasilan protein adalah melibatkan gangguan pada fasa permulaan, pemanjangan dan penamatan sekaligus menghalang translasi daripada mRNA kepada protein (Alizadeh et al. 2005). Selain itu, tobramycin menghalang penghasilan protein dengan mengikat pada ribosom dan menyebabkan tiada translasi mRNA berlaku. Proses pengikatan kepada ribosom akan membawa kepada kematian sel. Berdasarkan kajian kami, tobramycin menunjukkan keberkesanan terhadap sista *Acanthamoeba* pencilan klinikal dengan nilai MCC yang agak tinggi iaitu di antara 750-1500 µg/ml. Sejenis lagi antibiotik titisan mata dari kumpulan aminoglikosida yang mudah didapati di pasaran ialah Gentamicin. Gentamicin pada kepekatan 3000 µg/ml berkesan membunuh 5 isolat sista pencilan

klinikal dalam kajian kami yang lepas walaupun purata nilai MCCnya agak tinggi iaitu 1453.1 µg/ml (Mohamed Kamel et al. 2018).

Umum mengetahui bahawa tobramycin belum pernah digunakan dalam penyelidikan mengenai kerentanan terhadap sista *Acanthamoeba* sp. di dalam negara mahupun di luar negara. Justeru, masih tidak ada rujukan yang tepat dapat dijalankan bagi menyatakan sejauh mana agen antibiotik ini berkesan ke atas sista *Acanthamoeba*. Namun, diharapkan penggunaan tobramycin ini dapat membantu dalam rawatan terutamanya untuk pesakit yang menderita dua infeksi kornea pada masa yang sama seperti *Acanthamoeba* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

KESIMPULAN

Chlorhexidine dengan dos rawatan 0.02% adalah sangat berkesan terhadap kedua-dua sista *Acanthamoeba* daripada pencilan klinikal begitu juga dengan 0.3% tobramycin. Bagaimanapun, Chlorhexidine telah terbukti sebagai agen antimikrob yang baik kerana mampu membunuh sista *Acanthamoeba* dengan hanya menggunakan kepekatan yang lebih rendah iaitu 0.02% jika dibandingkan dengan tobramycin. Dengan itu, chlorhexidine pada dos terapeutik 0.02% masih merupakan agen rawatan utama bagi kes keratitis *Acanthamoeba*.

REFERENCES

- Alizadeh, H., Clarke, D.W., Jerry, Y., Niederkorn 2005. Failure of *Acanthamoeba castellanii* to Produce Intraocular Infections. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46: 2472-2478.
- Bowers, B & Korn, E.D. 1968. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* I. The trophozoites. *The journal of Cell Biology* 39: 95-111.
- Claerhout, I., Goegebuer, A., Van Den Broecke, C. & Kestelyn, P. 2004. Delay in Diagnosis and Outcome of *Acanthamoeba* Keratitis. *Graefe's Archive for Clinical Experimental Ophthalmology* 242(8): 648-653.
- Dart, J. K., Saw, V. P. & Kilvington, S. 2009. *Acanthamoeba* Keratitis: Diagnosis and Treatment Update 2009. *American Journal of Ophthalmology* 148(4): 487-499. e482.
- De Jonckheere, J. F. 1991. Ecology of *Acanthamoeba*. *Reviews of Infectious Diseases* 13(5): S385-S387.

- Gatti, S., Cevini, C., Bruno, A., Penso, G., Rama, P. & Scaglia, M. 1998. In Vitro Effectiveness of Povidone-Iodine On *Acanthamoeba* Isolates from Human Cornea. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 42(9): 2232-2234.
- Hay, J., Kirkness, C. M., Seal, D. V. & Wright, P. 1994. Drug Resistance and *Acanthamoeba* Keratitis: The Quest for Alternative Antiprotozoal Chemotherapy. *Eye* 8(5): 555-563.
- Kamel, A. M. & Norazah, A. 1995. First Case of *Acanthamoeba* Keratitis in Malaysia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene* 89(6): 652-652.
- Kamel, A., Faridah, H., Norazah, A., Rain, A., John, H. & David, S. 2000. A Case of Waterborne Contact Lens Associated *Acanthamoeba* Keratitis from Malaysia: Successful Treatment with Chlorhexidine and Propamidine. *International Medical Journal* 7(1): 63-66.
- Khan, N. A. 2003. The pathogenesis of *Acanthamoeba* Infections. *Microbial pathogenesis* 34(6): 277-285.
- Khunkitti, W., Lloyd, D., Furr, J. & Russell, A. 1998. *Acanthamoeba castellanii*: Growth, Encystment, Excystment and Biocide Susceptibility. *Journal of Infection* 36(1): 43-48.
- Successful Treatment with Chlorhexidine and Propamidine. *International Medical Journal* 7(1): 63-66.
- Kilvington, S., Hughes, R., Byas, J. & Dart, J. 2002. Activities of Therapeutic Agents and Myristamidopropyl Dimethylamine against *Acanthamoeba* Isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46(6): 2007-2009.
- Kosrirkvongs, P., Wanachiwanawin, D. & Visvesvara, G. S. 1999. Treatment of *Acanthamoeba* Keratitis with Chlorhexidine. *Ophthalmology* 106(4): 798-802.
- Lim, N., Goh, D., Bunce, C., Xing, W., Fraenkel, G., Poole, T. R. & Ficker, L. 2008. Comparison of Polyhexamethylene Biguanide and Chlorhexidine as Monotherapy Agents in the Treatment of *Acanthamoeba* Keratitis. *American Journal of Ophthalmology* 145(1): 130-135.
- Lorenzo-Morales, J., Lindo, J., Martinez, E., Calder, D., Figueruelo, E., Valladares, B. & Ortega-Rivas, A. 2005. Pathogenic *Acanthamoeba* Strains from Water Sources in Jamaica, West Indies. *Annals of Tropical Medicine Parasitology* 99(8): 751-758.
- Marciano-Cabral, F. & Cabral, G. 2003. *Acanthamoeba* Spp. As Agents of Disease in Humans. *Clinical Microbiology Reviews* 16(2): 273-307.
- Mohamed Kamel Abd Ghani, Mardiyanna Mohd Adi, Anisah Nordin, Yusof Suboh, Noraina Abd Rahim & Norazah Ahmad. 2019. Effectiveness of Chlorhexidine and Povidone-iodine against *Acanthamoeba* spp. Isolated from Human Cornea. *Jurnal Sains Kesihatan Malaysia Isu Khas* 2019: 21-25 DOI : <http://dx.doi.org/10.17576/JSKM-2019-03>
- Mohamed Kamel Abd Ghani, Noramalina, Anisah Nordin, Yusof Suboh, Noraina Abd Rahim & Norazah Ahmad. 2018. Keberkesanan antibiotik titisan mata gentamicin terhadap sista *Acanthamoeba* spp. Isolat klinikal. *Journal of Science and Mathematics Letter*. Vol 6, 2018 (67-71)ISSN 2462-2052, eISSN 2600-8718.
- Narasimhan, S. & Madhavan, H. N. 2002. Development and Application of an in Vitro Susceptibility Test for *Acanthamoeba* Species Isolated from Keratitis to Polyhexamethylene Biguanide and Chlorhexidine. *Cornea* 21(2): 203-205.
- Niszl, I. A. & Markus, M. B. 1998. Anti-*Acanthamoeba* Activity of Contact Lens Solutions. *British Journal of Ophthalmology* 82(9): 1033-1038.
- Pérez-Santonja, J. J., Kilvington, S., Hughes, R., Tufail, A., Matheson, M. & Dart, J. K. 2003. Persistently Culture Positive *Acanthamoeba* Keratitis: In Vivo Resistance and in Vitro Sensitivity. *Ophthalmology* 110(8): 1593-1600.
- Schuster, F.L. & Visvesvara, G.S. 2004. Free-living Amoebae as Opportunistic and Non opportunistic Pathogens of Humans and Animals. *International Journal for Parasitology* 34: 1001-1027.
- Seal, D., Hay, J., Kirkness, C., Morrell, A., Booth, A., Ridgway, A. & Armstrong, M. 1996. Successful Medical Therapy of *Acanthamoeba* Keratitis with Topical Chlorhexidine and Propamidine. *Eye* 22(2): 49-57.
- Seal, D.V. 2003. *Acanthamoeba* keratitis update—incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye* 17: 893–905.
- Siddiqui, R., Aqeel, Y. & Khan, N. A. 2016. The Development of Drugs against *Acanthamoeba* Infections. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 60(11): 6441-6450.

Mohamed Kamel Abd Ghani*
Nur Haziqah Omar
Fakulti Sains Kesihatan, Universiti Kebangsaan Malaysia,
50300 Jalan Raja Muda Abdul Aziz, Kuala Lumpur

Anisah Nordin
Noraina Ab Rahim
Jabatan Parasitologi, Fakulti Perubatan,
Universiti Kebangsaan Malaysia

*Corresponding author: profkamel@ukm.edu.my; mohamedkamela@yahoo.com