



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra Klinických a informačních systémů

Bakalářská práce

Molekulární charakterizace vybraných
kmenů améb rodu *Acanthamoeba*,
potencionálních lidských patogenů

Vypracovala: Kamila Štauberová
Vedoucí práce: doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.

České Budějovice 2014

Abstrakt

Rod *Acanthamoeba* patří do skupiny organismů v češtině souhrnně označovaných jako měňavky. Pro člověka mohou mít tyto améby fatální následky, dostávají se do těla člověka např. přes kůži, následně jsou krevním řečištěm rozneseny po těle, kde dále parazitují a to pak především v mozku, kde způsobují málo známé onemocnění zvané granulomatózní amébová encefalitida. Toto onemocnění se nejvíce projevuje u lidí, kteří již prodělali nějaké onemocnění, jedná se například o systémový lupus erythematosus. Granulomatózní amébová encefalitida vyvolává především zánět mozku, který poté často způsobuje nekrózu mozkové tkáně. Mezi hlavní příznaky patří bolesti hlavy, nevolnost, zvracení, afázie a ataxie.

Do těla člověka se améby mohou dostat například vdechnutím, nebo přímým kontaktem s kontaminovaným materiálem. Dalším jimi způsobeným onemocněním je amébová keratitida, u které se za nejčastější příčinu považuje používání kontaktních čoček, které jsou infikované amébami. Akantamébová keratitida způsobuje zánět oka, který může mít za následek až úplnou ztrátu zraku.

Tato práce se zabývá i dalšími amébami jako jsou: *Neogleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia diploidea* a *Entamoeba histolytica*. *Neogleria fowleri* je známá jako původce onemocnění, které nazýváme primární amébová encefalitida. Tato améba je narušena od ostatních zástupců rodu patogenní a je velmi termorezistentní. Z toho vyplývá, že nejvíce postižených jedinců tímto onemocněním se nakazilo koupáním se v teplé vodě. Naproti tomu se člověk může nakazit i vypitím kontaminované vody. Cesty přenosu jsou tedy různé. *Balamuthia mandrillaris* není tolik známá, a to i přesto, že má na svém kontě také několik napadení. Kvůli neznámosti této améby, má její onemocnění velmi špatnou prognózu, a pro 98 % pacientů je onemocnění smrtelné. Asi nejméně známá je *Sappinia diploidea*. Tato améba zatím nemá moc případů, které by měly za

následek napadení člověka. Ovšem, pokud se tak stane, má pro člověka také fatální následky, které mohou skončit smrtí. Améba zvaná *Entamoeba histolytica* způsobuje onemocnění, které nazýváme amébová úplavice. Toto onemocnění je známé ve všech rozvojových zemích, způsobuje nepříjemný průjem, který může obsahovat i krev. Amébová úplavice se řadí mezi nejčastější parazitární infekce.

Cílem mého výzkumu byla analýza poskytnuté DNA akantaméb, které ve většině případů pocházely z environmentálních vzorků. Dva vzorky byly získány z lidské tkáně (oko). Zjišťovala jsem příbuzenské vztahy těchto améb. K mému výzkumu bylo přidáno i několik již dříve sekvenovaných, ale dosud neanalyzovaných vzorků DNA. Nejprve jsem izolovala DNA. Izolaci jsem prováděla pomocí Genomic Mini Kit. Pro izolaci DNA bylo vybráno pět kmenů améb. Jako další krok jsem prováděla amplifikaci metodou PCR, která využívá střídání nižších a vyšších teplot v přístroji zvaném termocykler. Poté následovala elektroforéza, která pomocí proužků v agarozovém gelu, který jsem si vždy sama připravovala, ukázala přítomnost nebo nepřítomnost fragmentu amébové DNA. V případě úspěšnosti, tedy přítomnosti fragmentu DNA, jsem daný fragment vyřezávala skalpelem a opatrně ho přenesla do zkumavky. Následně jsem prováděla extrakci, tedy přečištění. Extrakci jsem prováděla pomocí Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit, dle návodu výrobce. Jako mezikrok před sekvenováním jsem prováděla klonování, které, jak se poté ukázalo, nebylo příliš efektivní. Co se týče samotného sekvenování, to provádí firma Seqme.

Následné zpracování sekvencí jsem prováděla v programu BioEdit a alignování v ClustalX. Poté následovala tvorba fylogenetických stromů v programu PAUP a jejich vizualizace v TreeView. Na základě těchto výsledků jsem zjišťovala příbuznost améb, ukázalo se, že většina améb sice patří do hojně zastoupeného genotypu T4, ale jejich příbuznost v rámci něj nijak velká není. Co se týče klinických vzorků, které jsem měla k dispozici (oba dva z lidských očí), tak zde se vzorek O1 zařadil do genotypu T4, ale naproti tomu vzorek O2 se zařadil do genotypu T3. Dále byla vyhodnocena efektivnost používaných primerů: specifické

primery AcaJDP1 a AcaJDP2 byly o hodně účinnější, než původně použité „eukaryotické“ primery – ERIB1 a ERIB10.

Abstract

The genus *Acanthamoeba* belongs to a group of organisms generally called „amoebae“. These amoebae can cause fatal disease in humans, being able to enter e.g. through skin in bloodstream and then spreading through the body. In the body they further parasitize in various tissues including the brain – there they cause a little known disease called „granulomatous amoebic encephalitis“. The disease is most prevalent in people previously ill with, e.g., systemic lupus erythematosus. Granulomatous amoebic encephalitis leads especially to a brain inflammation, which evolves in brain tissue necrosis. Most prominent symptoms are headaches, nausea and vomiting, aphasia and ataxia.

The amoebae can enter human body also by inhalation or by direct contact with contaminated material. Another disease caused by them is amoebic keratitis, where the most common cause of the infection is believed to be usage of contact lenses infested with acanthamoebae. *Acanthamoeba* keratitis causes an eye inflammation, which can progress in total loss of sight.

This work mentions also some other amoebae as *Neogleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia diploidea* a *Entamoeba histolytica*. *Neogleria fowleri* is known as a causative agent of an illness called primary amoebic encephalitis. In contrast to remaining species of the genus, this amoeba is a pathogen and is very thermoresistant. Therefore, most affected people are infected when swimming in warm water. One can also be infected via drinking. The ways of transmission are thus variable. *Balamuthia mandrillaris* is much less known, although it is also described from several cases of infection. Also because of lack of awareness, the disease has very bad prognosis – up to 98 % of patients die. Even less known is probably *Sappinia diploidea*. There are not known much cases of human disease caused by this organism. Nonetheless, it is still able to infect people

and cause a potentially killing disease. Amoeba of the species, *Entamoeba histolytica* is an important cause of serious diarrhoeas, which can contain blood. It is one of the most common parasitic diseases in the world.

The objective of my work was an analysis of provided DNA of *Acanthamoeba* protists, which originated mostly from environmental samples. Two samples were obtained from human tissue (eyes). I was deciphering relationships of these amoebae. To my dataset were added several already sequenced, but not yet analysed sequences. First, I had isolated DNA using Genomic Mini Kit from five amoeba strains. The next step was PCR amplification – it is a method depending on alternation of high and lower temperatures in thermocycler. It was followed by electrophoresis, where the presence of bands in agarose gel, which I had prepared myself, showed the presence or absence of amoebic DNA fragments. In case of successful amplification (presence of PCR product) the fragment was excised from gel with scalpel and transferred in a test-tube. The DNA was then cleaned via extraction. The extraction was done with Gel/DNA Fragments Extraction Kit. An intermediate step before sequencing, we tried to clone the product – it became obvious that this way is not very effective. The sequencing was provided by the company Seqme.

Following work with sequences was conducted in programs BioEdit and alignment in ClustalX. Then, phylogenetic trees were computed in the program PAUP and viewed in TreeView. The results were interpreted in the terms of relationships between the amoebae – majority of them belonged to the most common genotype, T4, but their relations within the genotype were not so tight. Concerning the clinical samples available to me (both from human eyes), one of them (O1) belonged to T4 genotype, whereas the other one (O2) belonged to the genotype T3. Another result was evaluation of the effectivity of different primers: specific primers AcaJDP1 and AcaJDP2 were much more efficient than originally used „eukaryotic“ primers – ERIB1 and ERIB10.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

Kamila Štauberová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu práce doc. RNDr. Olegu Ditrichovi za odborné vedení mé práce. Velký dík patří Mgr. Martinovi Kostkovi PhD, který dohlížel na výzkumnou část mé práce. Poskytl mi cenné rady a připomínky. Poděkování také patří celému kolektivu laboratoře rybí protistologie BC AVČR.

Obsah

1 ÚVOD	10
2 SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ PROBLEMATIKY	11
2.1 Taxonomie a klasifikace volně žijících améb	11
2.2 Acanthamoeba	12
2.2.1 Životní cyklus.....	12
2.2.2 Rozdělení.....	14
2.2.3 Kultivace	14
2.2.4 Patofyziologie.....	15
2.2.5 Imunologie.....	16
2.3 Další améby, které způsobují lidské onemocnění	16
2.3.1 <i>Naegleria fowleri</i>	16
2.3.2 <i>Balamuthia mandrillaris</i>	17
2.3.3 <i>Sappinia diploidea</i>	19
2.3.4 <i>Entamoeba histolytica</i>	20
2.4 Onemocnění působená akantamébami	21
2.4.1 Granulomatózní amébová encefalitida (GAE).....	21
2.4.2 Akantamébová keratitida (AK)	22
3 HYPOTÉZY	25
4 MATERIÁL A METODY	26
4.1 Materiál	26

4.2 Metodika	29
5 VÝSLEDKY	35
5.1 Světelná mikroskopie	35
5.2 PCR a elektroforéza.....	35
5.3 Sekvence.....	36
5.4 Fylogenetické analýzy	37
6 DISKUZE.....	41
7 ZÁVĚR.....	44
8 POUŽITÁ LITERATURA.....	45
9 KLÍČOVÁ SLOVA.....	51
10 PŘÍLOHA – FOTOGRAFIE	52

1 Úvod

Ve světě si rod *Acanthamoeba* získává mnoho pozornosti, protože se jedná o patogenní druh prvoků, kteří způsobují velmi závažná onemocnění. V České republice není doposud známo tolik případů výskytu těchto onemocnění. Několika případy, které se vyskytovaly (vyskytují) na území České republiky se zabývá tato práce; pracovala jsem především se vzorky, které pocházely z environmentálních vzorků, ryb, ale také se vzorky z lidské tkáně, konkrétně z očí.

Některé améby, jako různé druhy rodu *Acanthamoeba*, dále *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia diploidea* (a také mnohem známější *Entamoeba histolytica*), jsou považovány za původce lidských onemocnění. Kromě průjmových onemocnění způsobovaných entamébou můžou jmenované améby způsobovat tato onemocnění: granulomatozní amébová encefalitida (GAE), primární amébová encefalitida (PAM) a akantamébová keratitida (AK).

Stručný postup výzkumu:

1. Izolace DNA
2. PCR
3. Elektroforéza
4. Extrakce PCR produktů
5. (Klonování)
6. Sekvence a analýza sekvencí

Cíle práce:

1. Získat sekvence z poskytnutých vzorků
2. Provedení fylogenetických analýz
3. Vyhodnocení a interpretace výsledných dendrogramů

2 Současný stav poznání problematiky

2.1 Taxonomie a klasifikace volně žijících améb

Klasická taxonomická klasifikace dělila prvky na čtyři základní skupiny. První skupina, do které byly řazeny všechny améby, se nazývala Sarcodina, druhá Mastigophora, třetí Sporozoa a poslední Infusoria (Visvesvara et al., 2007). Toto taxonomické členění bylo zcela opuštěno. Dnes hrají zásadní roli moderní morfologické přístupy, studium biochemických pochodů a molekulární fylogenetika. Starší klasifikace byla tedy nahrazena novou klasifikací, podle které jsou tyto jednobuněčné i mnohobuněčné organismy rozděleny do následujících pěti skupin, tzv. „super groups“ (Sina et al., 2012):

1. Amoebozoa
2. Opisthokonta
3. SAR
4. Archaeplastida
5. Excavata

Druhy rodu *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris* a *Sappinia diploidea* patří do skupiny Amoebozoa. *Naegleria fowleri* se řadí mezi Excavata, Heterolobosea (Visvesvara et al., 2007).

Skupina amoebozoa je charakteristická tím, že její zástupci vytvářejí panožky, které se označují jako lobopodie, vzácněji tvoří filopodie. Lobopodie jsou široké nesplývající panožky. Jako filopodie označujeme nitkovité panožky, které nemají schopnost splýnout. Panožek se většinou vytváří větší množství, z patogenů se pouze u améb rodu *Entamoeba* panožka vyskytuje pouze jedna. Amoebozoa můžeme dále ještě dělit na skupinu Lobosa a na skupinu Conosa. Do skupiny

Lobosa patří aerobní améby, které v žádném stádiu nemohou tvořit bičíky. Právě do této skupiny patří rod *Acanthamoeba*, která bývá snadno rozpoznatelná od jiných příbuzných améb. *Acanthamoeba* je charakteristická tím, že vytváří právě již zmiňované lobopodie, které se zde nazývají akantopodie, neboť vytvářejí charakteristické trnité výběžky (Volf, Horák, 2007).

2.2 *Acanthamoeba*

Do rodu *Acanthamoeba* patří potencionálně patogenní volně žijící améby, která se vyskytují po celém světě a mohou způsobit závažné infekce jak u lidí, tak i u zvířat (Martinez, Visvesvara, 1997). Tyto améby jsou „všudypřítomné“, ve stádiu cysty jsou odolné k dezinfekčním prostředkům, nevadí jim střídání nízkých a vysokých teplot. Tato améba se živí bakteriálními buňkami, jejich základní podmínkou na přežití je právě dostupnost těchto bakterií. U lidí způsobují infekci centrálního nervového systému. Toto onemocnění, které je i nejvíce smrtelné, se nazývá granulomatózní amébová encefalitida. Kromě tohoto onemocnění způsobuje *acanthamoeba* i další onemocnění, které je definováno jako zrak ohrožující a nazývá se akantamébová keratitida (Khan, Jarroll, Paget, 2001). *Acanthamoeba* si v poslední době získává mnoho pozornosti, protože je známo, že slouží jako hostitel některých patogenních bakteriálních kmenů, jako je například *Legionella* (Winiecka – Krusnell, Linder, 2001).

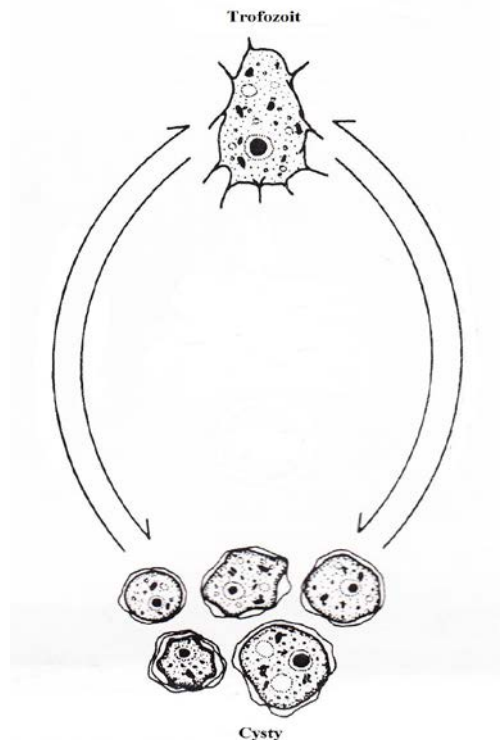
2.2.1 Životní cyklus

Životní cyklus (obr. 1) zahrnuje dvě stádia – trofozoity a cysty. Trofozoity dosahují velikosti 15 – 20 μm . Mají centrálně umístěno jádro s nápadným jadérkem. Cytoplasma je jemně zrnitá a obsahuje potravní vakuoly, mitochondrie a ribozomy. V buňce bývá nápadná pulzující vakuola. Cysty o velikosti 10 – 15 μm jsou chráněny dvojitou stěnou. Vnější vrstva, kterou nazýváme ektocysta, je vrásčitá, tvoří záhyby a obsahuje tuky a bílkoviny. Vnitřní stěna, která je

označována jako endocysta, obsahuje celulózu. Cysty mají centrálně umístěné jádro (Visvesvara et al., 2007). Cytoplasma obsahuje velké množství glykogenu, lipidů a myozinu. Právě myozin je odpovědný za pohyb améb. Díky použití plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie byla v cytoplasmě zjištěna vysoká koncentrace glykogenu, glukózy a malé množství manosy (Siddiqui, Khan, 2012).

Acanthamoeba byla izolována z nejrůznějších prostředí: nejčastěji z půdy a sladké vody, ale i z prachu ze vzduchu, balené minerální vody, chladících věží, jaderných elektráren, vytápění, větracích a klimatizačních systémů, dialyzačních strojů, kontaktních čoček, také z plicních sekretů, stěrů z nosohltanu, ústní dutiny a ze stolice zdravých lidí. Kromě toho bylo několik druhů izolováno z mozku, plic, kůže a rohovky infikovaných jedinců (Khan, 2006).

Obr.1 Dvě stádia akantamébového životního cyklu: cysta a trofozoit



Zdroj: Ma et al., 1990. Modifikováno.

2.2.2 Rozdělení

V roce 1930 zjistil Castellani přítomnost améb v kultuře houby *Cryptococcus pararoseus*. Améby byly kulaté nebo oválné. Tyto améby byly zařazeny do rodu *Hartmannella* a pojmenovány *Hartmannella castellani*. Až v roce 1966 byl definitivně rozpoznán rod *Acanthamoeba* (Khan, 2006). Bylo sice popsáno několik druhů akantaméb, ale jejich identifikace na základě morfologických kritérií (zejména cyst) je velmi obtížná a nespolehlivá, neboť nejen že akantaméby a *Balamuthia mandrillaris* mají podobnou strukturu, ale i variabilita ve stavbě cyst různých druhů akantaméb je značná a jsou vzájemně těžko rozpoznatelné. K určení se také používají imunologické testy, které využívají monoklonální a polyklonální protilátky (Marciano, 2009).

Při výrazném pokroku vědy a při objevení molekulárních technik se rod *Acanthamoeba* rozčleňuje na základě sekvence genu pro RNA malé ribozomální podjednotky. Tím pádem bylo vytvořeno nové rozdělení podle genotypů. Každý genotyp vykazuje oproti ostatním genotypům alespoň rozdíl 5% v sekvenci tohoto genu. Genotypy akantaméb se označují T1 – T17 (a stále přibývají), nejsilnější skupinu tvoří genotyp T4, kam se řadí největší počet izolátů, tvoří zhruba 90% lidských infekcí. Takovéto rozdělení se považuje za velmi přesné a spolehlivé (Kilvington, Lam, 2013).

2.2.3 Kultivace

V přírodním prostředí se améby živí různými kvasinkami, dalšími prvky nebo bakteriemi. Z toho tedy vyplývá, že kvasinky nebo bakterie jsou zdrojem živin pro améby. Akantaméby lze pěstovat v laboratoři na agaru bez živin potaženým bakteriemi. Vhodnou krmnou bakterií je například *Escherichia coli* nebo

Enterobacter pyogenes. Améby se živí těmito bakteriemi a během několika dní se rozmnoží natolik, že pokrývají celý povrch agaru. Bakteriální kořist může být rovněž naočkována přímo na améby, které jsou již narostlé na povrchu agaru (např. nakapáním). Cysty zůstávají životaschopné po delší dobu, a to zejména v případě, že agarová plotna je uložena tak, aby se zabránilo jejímu vysušení. Améby se mohou v laboratoři pěstovat neomezeně dlouho, nejčastěji pravidelným odříznutím kousku agaru, který obsahuje trofozoity nebo cysty. Takto vyříznutý kousek se přenese na čerstvou agarovou plotnu potaženou bakteriemi (Visvesvara et al., 2007).

Améby lze pěstovat i bez přítomnosti živých organismů. Takové pěstování se označuje jako axenická kultivace. V laboratorních podmínkách je tohoto pěstování dosaženo pomocí PYG media, které se skládá z peptonu, výtažku z kvasnic a glukózy. Použití agaru s bakteriemi je doporučováno jak pro izolaci améb, které pocházejí z klinických tkání, tak i pro améby, které pocházejí z environmentálních vzorků půdy a vody (Khan, 2006).

2.2.4 Patofyziologie

Protože většina onemocnění mozku způsobená těmito amébami je smrtelná, dochází k určení diagnózy až po pitvě. Vyšetření, které se poté provádí, odhalí otoky mozku v oblasti bazálních ganglií. Histologické vyšetření mozkové hemisféry, mozkového kmenu, středního mozku a mozečku ukáže přítomnost vícečetných obrovských buněk. Amébové trofozoity se nacházejí ve tkáni centrální nervové soustavy, plicním parenchymu, ale mohou se nacházet i v prostatě a kožních lézích (Visvesvara et al., 2007).

2.2.5 Imunologie

Mnohé studie již dokázaly, že člověk i zvíře si proti amébám dokáže vytvořit protilátky. Ukázalo se tak jak v séru zdravých lidí, tak i u pacientů s respiračními problémy. Studie in vitro prokázaly, že améby aktivují alternativní cestu komplementu, která je nezávislá na aktivaci protilátek. Alternativní cesta aktivace komplementu a tvorba protilátek jsou dva důležité obranné mechanismy, stimulují neutrofile, které uvolňují lysosomální enzymy a reaktivní kyslíkové meziprodukty, včetně chlornanu a peroxidu vodíku a tím dochází u zdravých lidí ke zničení améb. K tomuto procesu ještě přispívají aktivované makrofágy, které jsou schopny fagocytózy a tím také dochází ke zničení améb (Visvesvara et al., 2007).

2.3 Další améby, které způsobují lidská onemocnění

2.3.1 *Naegleria fowleri*

Rod *Naegleria* je rod volně žijících améb, je velmi rozšířen v půdě a ve sladkých vodách. Tyto améby tvoří bičíkatá stádia, na rozdíl od akantaméb tak mají tři stádia životního cyklu; zbývající dvě jsou stejná, jedná se o trofozoity a o cysty. Trofozoity měří v průměru 10 – 20 μm , obsahují jádro s velkým jadérkem. Cysty jsou kulaté, tvoří dvojitou stěnu, obsahující dva nebo tři póry, jež jsou někdy utěsněny mukózní zátkou. Cysty jsou zřídka nalezeny v klinických vzorcích. Je to tím, že pacienti umírají dříve, než trofozoity přecházejí v cysty. Jako lidský patogen je uváděna *Naegleria fowleri*, je velmi teplomilná, snáší i teploty od 40°C – 45°C. Je původcem primární amébové meningoencefalitidy. Jedná se o smrtelnou nemoc, která poškozuje centrální nervovou soustavu (Marciano, 1988). Zajímavé je, že jiné neglérie, například *Naegleria gruberi* jsou nepatogenní a jejich optimální teplota růstu se pohybuje v rozmezí od 22°C – 35°C. Jsou známé i další nepatogenní neglérie, jedná se např. o *Naegleria lovaniensis*, *Naegleria jadini* či *Naegleria*

australiensis. Ovšem, i zde je jedna zajímavost, právě *Naegleria australiensis italica* byla vysoce patogenní pro pokusná zvířata (Ma et al., 1990).

Jak již bylo řečeno, *Naegleria fowleri* je termotolerantní. Může se tedy nacházet v horkých pramenech nebo v tepelně znečištěných potocích a řekách. Také se může nacházet v jezerech, v bazénech, v akváriích a v kanalizaci (Trabelsi et al., 2012).

Neagleria fowleri je prvok, který způsobuje onemocnění zvané primární amébová meningoencefalitida (PAM). Pro člověka je to velmi závažná choroba. Inkubační doba se může lišit od 2 – 3 dní, nejdéle však 7 – 15 dní. Améby mohou do člověka vstoupit přes dutinu nosní, tedy inhalací. Ale také se mohou vyskytovat ve vodě, kterou člověk může vypít nebo se v ní koupat. Onemocnění má rychlý nástup, pacient obvykle trpí velkými bolestmi hlavy a horečkou (> 40°C). Většinou jsou tyto příznaky ještě doprovázeny zvracením nebo nauzeou. PAM se těžko rozpozná od akutní hnisavé bakteriální meningitidy, což má za následek špatné určení diagnózy a následně i špatné určení léčby (Ma et al., 1990).

Primární amébová encefalitida byla poprvé popsána v roce 1965, do toho roku byly améby považovány za nepatogenní. Onemocnění postihuje především imunologicky intaktní děti. K infekci většinou dochází při koupání se v teplé vodě (Barnett et al., 1996).

2.3.2 *Balamuthia mandrillaris*

Balamuthia mandrillaris je oportunní, patogenní volně žijící améba. Tato améba byla poprvé izolována v roce 1986 z fragmentů mozkové tkáně mandrila, který zemřel na neurologické onemocnění v ZOO v San Diegu. Na základě mikroskopických studií, antigenních analýz a srovnání sekvencí byl pro tuto amébu

vytvořen samostatný druh a rod. Později, v roce 1991 byla *Balamuthia mandrillaris* nalezena u člověka a od té doby bylo již zjištěno více než 100 případů (Matin et al., 2008). Infekce byly zaznamenány ve věku od 4 měsíců do 72 let (Schuster et al., 2003).

Balamuthia mandrillaris byla popsána jako volně žijící améba, existují zprávy o tom, že byla izolována z environmentálních vzorků půdy. *Balamuthia mandrillaris* byla zjištěna ve vzorcích odebraných z domácího prostředí (v domě, kde žilo infikované dítě), také byla izolována z venkovních květináčů (Dunnebacke et al., 2004). Právě v tomto se liší od akantaméby, která byla izolována jak z půdy, tak i z mnoha zařízení. Na rozdíl od akantaméb ji nelze kultivovat na agarových plotnách, které jsou potaženy bakteriemi. Důvod je ten, že doposud není znám jejich zdroj potravy v přírodě. In vitro se *Balamuthia mandrillaris* může živit menšími amébami a tak se předpokládá, že se jimi nebo jinými prvky živí i v přírodě. *Balamuthia mandrillaris* může být tedy izolována z lidských i zvířecích tkání a může být pěstována v laboratoři na savcích buněčných kulturách, odvozených např. z buněk opičích ledvin nebo lidských plic.

Životní cyklus těchto améb zahrnuje dvě stádia. První stádium je trofozoit. Ve druhém stádiu se tvoří cysty. Trofozoity v průměru měří 15 – 60 μm . Je pro ně charakteristická nepravidelná struktura. Stejně jako jiné eukaryotické buňky obsahují jádro, ale mohou mít více než jedno jádro. Cysty bývají menší, v průměru měří 13 – 30 μm . Na rozdíl od trofozoitů mají pravidelnou kulatou strukturu. Pomocí transmisní elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že stěna cysty se skládá ze tří vrstev. Vnější stěna je známá jako ektocysta, fibrilární střední vrstva je označována jako mezocysta a vnitřní stěna se nazývá endocysta.

Je známo, že způsobuje závažné kožní onemocnění a fatální smrtelnou encefalitidu, která zahrnuje poškození centrálního nervového systému. Zhruba pro

98% pacientů je toto onemocnění smrtelné. Z toho vyplývá, že prognóza je velmi špatná. Patogeneze a patofyziologie není zcela pochopitelná. Současnou metodou léčby je kombinovaný přístup, kdy se podává směs léků, ale i přes tuto léčbu jsou výsledky velmi špatné. Snahou je zlepšit antimikrobiální chemoterapii nebo alternativní strategie pro rozvoj terapie (Matin et al., 2008).

V České republice byla tato améba nalezena u malého chlapce. Diagnóza byla stanovena pomocí biopsie a imunofluorescence. Biopsie prokázala přítomnost trofozoitů i cyst. Tento chlapec po několika dnech zemřel. Následné vyšetření mozku (vyšetření post-mortem) ukázalo oblasti s masivní nekrózou. Nejvíce postižené oblasti nekrózou byla bazální ganglia, dále thalamus a mozkové hemisféry. Brána vstupu infekce nebyla doposud objasněna (Kodet et al., 1998).

Ne však všechny případy způsobené touto amébou končí smrtí. Jak uvádí Schuster, existuje i několik pacientů, kteří byli vyléčeni (Schuster et al., 2009).

2.3.3 *Sappinia diploidea*

Další amébou popisovanou jako potenciální lidský patogen je *Sappinia diploidea*. Jako ostatní zmíněné améby je volně žijící. Poprvé byla izolována ze stolice ještěrek a z environmentálních půdních vzorků. Poté byla popsána také jako původce granulomatózní amébové encefalidity (Khan, 2009).

V roce 2001 byl ohlášen první případ amébové encefalidity způsobené právě touto amébou. Pro tento druh améb je charakteristické, že buňky obsahují dvě jádra. Obě stádia, tedy jak trofozoity, tak cysty, jsou dvoujaderná. Trofozoity měří 40 – 80 µm jsou oválného nebo polodlouhého tvaru. Zralé cysty jsou kulaté, měří 15 – 30 µm. Cytoplasma obsahuje kontraktilní a potravinovou vakuolu (Visvesvara et al., 2007).

Améby mohou být kultivovány za pokojové teploty, za použití agaru bez živin, potaženým bakteriemi, např. *Enterobacter cloacae*. Obvyklá doba kultivace se pohybuje v rozmezí od 3 – 10 dnů. U tohoto rodu se přepokládá, že améby se rozmnožují nepohlavně, protože fúze jader nebyla nikdy dokonale doložena (Walochnik et al., 2009).

2.3.4 *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica je původcem amébové úplavice. Ale také může způsobit infekci dýchacích cest nebo mozkovou a urogenitální úplavici. Poprvé byla popsána v Rusku v roce 1875. Amébová úplavice se projevuje závažnými průjmy s příměsí krve. Zhruba 50 milionů lidí má invazivní onemocnění, nejčastěji v podobě jaterních abscesů, což má za následek 100 000 úmrtí za rok. Morfologicky shodné druhy *Entamoeba dispar* a *Entamoeba moshkovskii* se považují za nepatogenní. Onemocnění je hlášeno z různých rozvojových zemí, kde největší riziko tvoří přistěhovalci z oblastí, které jsou známy výskytem tohoto onemocnění. Rizikovou skupinou jsou i homosexuálové (Fotedar et al., 2007). Pro identifikaci améby rodu *Entamoeba* se používá mikroskopické vyšetření stolice. Toto vyšetření odhalí přítomnost cyst. Amébová úplavice patří k nejčastějším parazitárním infekcím lidstva a právě proto je v endemických oblastech velmi důležitá prevence, která spočívá v dodržování osobní hygieny nebo konzumaci jídla, které je zabaleno v originálním balení (Podstatová, 2001).

2.4 Onemocnění působená akantamébami

2.4.1 Granulomatózní amébová encefalitida (GAE)

Toto onemocnění je velmi vzácné, avšak velmi závažné. Pomocí sérologické laboratorní diagnostiky došlo ke zjištění, že za toto onemocnění je zodpovědný rod *Acanthamoeba*. GAE je spojována s jedinci, kteří již trpí nějakým z následujících onemocnění: diabetes mellitus, systémový lupus erythematodes, cirhóza, tuberkulóza, kožní vředy nebo Hodgkinova choroba. Za predisponující faktory se považují alkoholismus, užívání drog, léčba steroidy, chemoterapie nebo transplantace orgánů. GAE tedy zejména postihuje imunosuprimované osoby včetně jedinců s nádorovým onemocněním nebo po transplantaci (Volf, Horák, 2007). Mezi patologické nálezy obecně patří závažné hemoragické nekrózy. Typickým příznakem je zánět. Mozkové hemisféry vykazují středně těžký až těžký edém mozku. Exsudát je převážně složen z polymorfonukleárních leukocytů a mononukleárních buněk (Marciano-Cabral, Cabral G., 2003). Neuropatologické změny vedou k rozvoji granulomatózní encefalitidy s výskytem vícejaderných buněk. Tyto buňky se hlavně vyskytují v oblasti posterior fossa (součást nitrolební dutiny), bazálních ganglií, mozkových hemisfér a v mozečku. Trofozoity a cysty se nacházejí v lézích centrální nervové soustavy. Inkubační doba tohoto onemocnění není zcela zřejmá, ale většinou se odhaduje na několik týdnů až měsíců. Klinické a patologické údaje nejsou použitelné k tomu, aby se dalo podle nich rozpoznat, jak dlouho žily améby v centrální nervové soustavě nebo jiných tkání u člověka. Příznaky jsou podobné jako u jiných infekcí centrální nervové soustavy, včetně virových, bakteriálních a plísňových. GAE se tedy projevuje nevolností, bolestmi hlavy, horečkami, zvracením, afázií, ataxií, obrnou hlavových nervů, různými záchvaty a v těžších případech může vést až ke komatu. Onemocnění dokáže odhalit magnetická rezonance nebo počítačová tomografie. Pomocí magnetické rezonance se nám zobrazí shluk lézí, které zabírají prostor v mozkové kůře. Tyto

léze se však nemusí vyskytovat u imunokompromitovaných pacientů (Ma et al., 1990).

Mezi laboratorní vyšetření k diagnostice GAE patří mikroskopické vyšetření mozkomíšního moku. Odběr moku se provádí pomocí lumbální punkce. Poté se mozkomíšní mok centrifuguje při velmi malých otáčkách, aby se zabránilo případnému prasknutí trofozoitů. Při tomto vyšetření hrozí špatná identifikace trofozoitů, které se velmi podobají makrofágům. Přiměřené množství makrofágů je v mozkomíšním moku považováno za fyziologické. Mozkomíšní mok se může obarvit Giemsovým roztokem, kde se pak snadněji rozpozná, zda jde opravdu o trofozoitní stádium améb. Jadérko, kontraktilní vakuola a cytoplazmatická vakuola se snáze rozpoznají při použití trichromu nebo hematoxylinu a eosinu. Pro zjištění diagnózy GAE se také mohou použít testy in vitro, kde se mozková tkáň nebo materiál z kožních lézí naočkuje na agar, který je potažen bakteriemi (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*). Ovšem, zde je problém u izolace améb z mozkové tkáně, protože améby mohou encystovat a pak se nemnoží. Dále se k určení tohoto onemocnění používá i klasické histologické vyšetření, kde se mozková tkáň zalévá do parafinu, následně se barví a poté prohlíží mikroskopem (Marciano – Cabral, Cabral G., 2003).

2.4.2 Akantamébová keratitida (AK)

AK je vážná choroba, která způsobuje infekci rohovky. K rizikovým faktorům především patří nošení kontaktních čoček, dále pak koupání v teplé vodě s kontaktními čočkami a nesprávná hygiena při používání kontaktních čoček. Mezi rizikové faktory patří i různá traumata rohovky nebo chronické onemocnění očí (Rudell et al., 2013).

Lidé trpící tímto onemocněním jsou většinou imunokompetentní. Je doloženo, že onemocněním trpí více muži, než ženy. AK může mít lepší prognózu v případě, že améby napadnou pouze epitel rohovky. V horším případě, kdy napadnou stroma oční rohovky, dojde k rozsáhlému zánětu, který může mít za následek až ztrátu zraku (Nieder Korn et al., 1999).

První případy byly popsány již v roce 1973, ale za velmi vážné začalo být toto onemocnění považováno až v 80. letech minulého století, kdy došlo k výraznému nárůstu počtu uživatelů kontaktních čoček. Pacienty s AK můžeme rozdělit do dvou skupin. První skupinu tvoří uživatelé kontaktních čoček, druhou skupinu tvoří ti, kteří kontaktní čočky nenosí, a přesto onemocněli (Illingworth, Cook, 1998).

AK u nositelů kontaktních čoček

Nositelé kontaktních čoček jsou rizikovou skupinou. Až 88% případů AK se vyskytuje právě u lidí, kteří nosí kontaktní čočky. Je prokázáno, že měkké čočky představují vyšší riziko z hlediska výskytu AK, než pevné kontaktní čočky. Měkké čočky je třeba každý den vyměňovat, oplachovat a přes noc se musí nechat uložené ve sterilním roztoku. Naproti tomu pevné čočky se nevyměňují tak často a nosí se i přes noc, tudíž tam nedochází k tak velké manipulaci s čočkami (Dart et al., 2009).

Při určování diagnózy je nutno zvážit všechny rizikové faktory. Jak je uvedeno výše, tak mezi nejčastější rizikové faktory patří nošení kontaktních čoček. V první fázi tohoto onemocnění může dojít k špatnému určení diagnózy, neboť se objevují příznaky, které jsou velmi podobné onemocnění, které způsobuje *Pseudomonas aeruginosa* nebo i jiné bakterie, či houby (Gray, 1995).

Amébová keratitida je velmi bolestivé onemocnění. Je charakterizováno zánětem rohovky nebo opakujícími se poruchami rohovky. Pro toto onemocnění je typické, že je postiženo jen jedno oko, ale bilaterální výskyt není výjimkou. AK může být zaměňována s virovou nebo houbovou keratitidou. Ve většině případů je to diagnostikováno jako keratitida způsobená virem herpes simplex. Při AK se po jisté době vytváří vřed rohovky, což může být příznak amébové keratitidy (Visvesvara et al., 2007).

Jako u každého onemocnění, tak i tady je nutná znalost klinických příznaků. Mezi klinické příznaky patří fotofobie, slzení a bolest. Někteří pacienti žádnou bolest necítí, to ale neznamená, že se nemůže jednat o AK. V prvních fázích onemocnění se objevuje tečkovitá keratopatie. V pozdějších fázích se vyskytují perinukleární infiltráty, které se vyskytují v okolí zrakových nervů. K takovému zjištění se provádí vyšetření pomocí štěrbinové lampy (Dart et al., 2009).

AK u lidí bez kontaktních čoček

AK u pacienta, který není uživatelem kontaktních čoček je často přehlížena a diagnostikována pozdě. Zdrojem infekce je zde kontaminovaná voda nebo půda, často k infekci onemocnění dochází u zemědělských pracovníků. Jsou zde ale i další rizikové faktory, jako je teplejší počasí a špatné socioekonomické podmínky. Několik případů bylo také nahlášeno po chirurgických zákrocích oka (Dart et al., 2009).

3 Hypotézy

H₁: Akantaméby získané z environmentálních vzorků budou reprezentovat široké spektrum genotypů s převahou nejhojnějšího genotypu (T4)

H₂: v České republice se v infekcích očí budou uplatňovat zejména akantaméby nejhojnějšího genotypu – T4

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

Pro svoji práci jsem měla k dispozici vzorky DNA, případně akantamébové kultury, které jsou uloženy na Parasitologickém ústavu v Českých Budějovicích. DNA je uložena v malých zkumavkách, které se uchovávají v hlubokomrazícím boxu (-80°C). Několik použitých kmenů améb byla izolována z ryb (tab. 1). Dva kmeny (O1, O2) pochází z lidských očí (tab. 2). Ostatní kmeny byly izolovány z různých stanovišť (tab. 3).

Tab. 1 Kmeny izolované z ryb. Sekvence označené hvězdičkou mi byly poskytnuty již hotové.

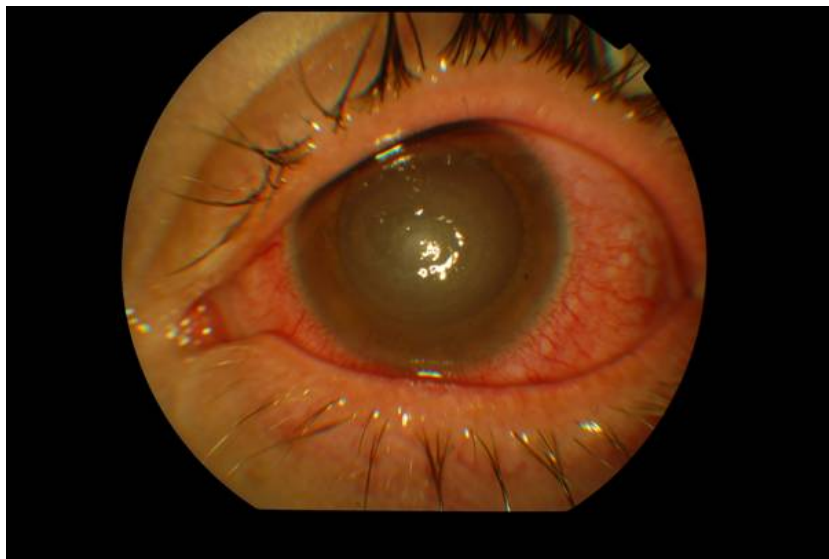
Číslo vzorku	Původ vzorku	Lokalizace v orgánech	Lokalita
P128V	Křížovec (<i>Bagre</i>)	žábry	Peru-Iquitos
1308	Okoun říční (<i>Perca fluviatilis</i>)	mozek	Dvořiště
1327	Okoun říční (<i>Perca fluviatilis</i>)	mozek	řeka Vltava
CANZ*	Candát obecný (<i>Stizostedion lucioperca</i>)	žábry	Hluboká
4482SL*	Kapr obecný (<i>Cyprinus carpio</i>)	slezina	Vodňany

Tab. 2 Vzorky z lidské tkáně

Číslo vzorku	Lokalita	Informace o pacientech
O1	Brno	Žena (1988), trpící DM
O2	Ostrava	Muž (1987), uživatel kontaktních čoček

Vzorek O2 pochází od mladého muže, který byl dva měsíce léčen na herpetickou keratouveitidu. Léčba byla neúspěšná, a proto byla pro tohoto muže doporučena návštěva očního oddělení v Městské nemocnici v Ostravě. Právě zde padlo podezření na infekci způsobenou akantamébou (obr. 2). Pacient uvedl, že je nositelem kontaktních čoček, ale již je nemá k dispozici. Z napadeného oka byl pořízen stěr, který byl poslán na kultivaci. Nález trofozoitů améb se objevil osmý den kultivace. (Bílková Franková et al., 2013, připraveno do tisku). V této době byla kultura předána pracovišti, kde jsem zpracovávala svou práci. Vzorek O1 byl izolován z mladé pacientky, diabetičky v invalidním důchodu, která prodělala mnoho operací oka. Její zrak je vážně postižen: na pravé oko nevidí, na levé částečně.

Obr. 2 – Foto napadeného oka u muže (O2). Převzato z Bílková Franková, 2013, připraveno do tisku.



Tab. 3 Environmentální vzorky. Sekvence označené hvězdičkou mi byly poskytnuty již hotové.

Číslo vzorku	Lokalita
KAL	Řecko
AMB	Francie
DE116	Shetlandské ostrovy (moře)
DE129	Antarktida (moře)
ACANT*	Kontaminant neznámého původu
ALC10*	Tenerife
ALC2A*	Tenerife

4.2 Metodika

Mikroskopie

Použité přístroje:

- mikroskop Olympus BX51 vybavený Nomarského kontrastem
- kamera Olympus DP70

Améby ve formě cyst byly pozorovány na krycích sklíčkách potažených tenkou vrstvou 2% agaru. Trofozoity byly pozorovány ve visuté kapce. Pozorované améby byly dokumentovány fotografováním pomocí vestavěné kamery.

Izolace DNA

Použité pomůcky a chemikálie:

- Pinzety, laboratorní lžičky, pipety, laboratorní sklo
- Centrifuga UNIVERSAL 32R, RCF 440

Izolaci DNA z pěti kmenů améb jsem prováděla pomocí Genomic DNA mini Kit, dle návodu výrobce (Geneaid). Před vlastní izolací byly trofozoity pomocí skleněné hokejky setřeny z agarové plotny zvlhčené několika ml Pageova média (Kalinina a Page, 1992), stočeny na centrifuze při nízkých otáčkách a tímtež médiem byly propláchnuty.

Amplifikace SSU rRNA

Amplifikaci jsem prováděla pomocí metody PCR, kterou objevil Kary Mullis a to v roce 1983 (Bartlett et al., 2003).

Použité pomůcky:

- Pipety, zkumavky
- Termocykler T-personal, Biometra

Použité chemikálie:

- Pufr
- dNTP
- F primer erib 1 (Bárta et al., 1997)
- R primer erib 10 (Bárta et al., 1997)
- Polymeráza

Později jsem používala primery Aca JDP1 a Aca JDP2 (Stothard et al., 1998). Tyto primery se ukázaly, jako velmi efektivní, neboť následná elektroforéza ukázala přítomnost fragmentů očekávané délky u všech vzorkovaných DNA améb.

Tab 4. Složení směsi k PCR

Deionizovaná voda	16,5
Pufr	2,5
dNTP	2
F Primer	1
R Primer	1
Polymeráza	1
DNA	1

Tab 5. Nastavení termocykleru

	Teplota °C	Čas
1. krok	95	4 minuty
2. krok	95	50 sekund
3. krok	55	50 sekund
4. krok	72	2 minuty
5. krok	10	10 minut

Termocykler jsem nastavila na 34 cyklů, to znamená, že po čtvrtém kroku se přístroj vrátí na krok dvě. Takovým způsobem se bude vracet 34 – krát.

Elektroforéza

Použité pomůcky:

- pipety

Použité chemikálie:

- Agaróza
- TAE pufr
- Ethydium bromid

Příprava gelu:

1. Pro 1% roztok jsem navázila 0,45g agarózy
2. K agaróze jsem přidala 45 ml pufru
3. Následně jsem roztok zahřála v mikrovlnné troubě
4. Přidala jsem 2,5 μ l ethydium bromidu
5. Rozmíchala jsem roztok a nalila ho do připravené elektroforézy
6. Po utužení gelu jsem spustila elektroforézu, zdroj jsem nastavila na 80 V

Pomocí elektroforézy jsem získala separované fragmenty DNA améb. Fragmenty jsem prohlédla pod UV lampou. Fragmenty odpovídající délky jsem opatrně vyřezávala skalpelem a připravila jsem je k extrakci.

Extrakce

Tento krok jsem prováděla pomocí Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit, Geneaid dle návodu výrobce.

Během extrakce dojde k rozpuštění fragmentu gelu s DNA z elektroforézy a následnému promytí a získání DNA, která se již posílá na sekvenaci.

Klonování

Klonování jsem u několika produktů prováděla pokusně jako mezikrok před sekvenací. Používala jsem PCR - Cloning Kit. (QIAGEN).

Příprava reakční směsi:

1. Do zkumavky jsem napipetovala 0,5 µl klonovacího vektoru
2. Přidala jsem 2,0 µl PCR produktu
3. Nakonec jsem přidala 2,5 µl Ligation Master Mix

Transformace kompetentních buněk

Po proběhnutí ligační reakce přes noc v lednici bylo přidáno 50 µl kompetentních buněk. Ty nejprve stály 10 minut na ledu. Zkumavky jsem poté dala do teplé vodní lázně (42°C) a pak jsem zkumavky chladila opět 2 minuty na ledu. Následovně jsem přidala 200 µl SOC media a zkumavky jsem dala třepat při 37°C na 1 hodinu. Na připravené agarové plotny s LB mediem a potřené ampicilinem jsem přidala 40 µl sloučeniny X-gal. Vyndala jsem zkumavky ze třepačky a jejich obsah jsem přepipetovala na připravené plotny. Plotny jsem nechala přes noc inkubovat při 37°C.

PCR screening

Do 1,5 ml zkumavek jsem napipetovala 30 µl vody. Špičkou jsem vypíchlá bílé kolonie, které narostly na plotnách, a přendala jsem je do zkumavky s vodou.

Tab. 6 Příprava reakční směsi

Název	Množství (μl)
Taq Buffer complete	1,25
dNTP	1
M13 Forward primer	0,5
M13 Revers primer	0,5
Polymeráza A	0,5
Voda	7,25

Tuto směs jsem rozplnila po 11 μl do tenkostěnných zkumavek a přidala jsem 2 μl buněčné suspenze.

Tab. 7 Amplifikace (program SCREEN)

	Teplota °C	Čas
1. krok	95	10 minut
2. krok	95	30 sekund
3. krok	54	1 minuta
4. krok	72	1 minuta
5. krok	72	10 minut

V tomto případě je program SCREEN nastaven pouze na 20 cyklů.

Namnožení plasmidu

Pokud se během screeningu ukázalo, že bakteriální buňky z dané kolonie obsahují produkt očekávané délky, byly bakterie namnoženy ve zkumavce se 3 ml LB média, do něhož jsem přidala 12 μl ampicilinu.

Z pomnožených bakterií byl pak plasmid izolován pomocí komerčního kitu High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) dle návodu výrobce.

Sekvenace

V laboratoři rybí protistologie jsou vzorky k sekvenaci zasílány firmě Seqme. Odesílají se ve formě PCR produktu s vhodným sekvenačním primerem, případně se zasílá izolovaný plasmid. Hotová sekvence je doručena elektronicky.

Zpracování sekvenčních dat

Po získání sekvencí jsem nejprve ověřila, zda se skutečně jedná o fragment genu SSU rDNA akantaméby. K tomuto účelu posloužila služba BLAST poskytovaná serverem NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Dalším krokem byla tvorba datasetu, do něhož byly kromě mnou získaných sekvencí zařazeny ještě referenční zveřejněné sekvence stažené z databáze GenBank opět prostřednictvím NCBI. Výsledný dataset byl alignován programem ClustalX (Larkin et al., 2007) a následně ořezán a zkontrolován v programu BioEdit (Hall, 1999). Následovala fylogenetická analýza v programu PAUP (Swofford, 2003). Vzhledem k charakteru dat byla zvolena relativně jednoduchá metoda rekonstrukce evoluce akantaméb, metoda neighbor joining. Analýzy byly provedeny dvě, jednou byl analyzován dataset obsahující kompletní sekvence SSU rDNA, následně bohatší dataset, který však obsahoval kratší sekvence. Výsledné stromy byly prohlíženy a zpracovány v programu TreeView (Page, 1996).

5 Výsledky

5.1 Světelná mikroskopie

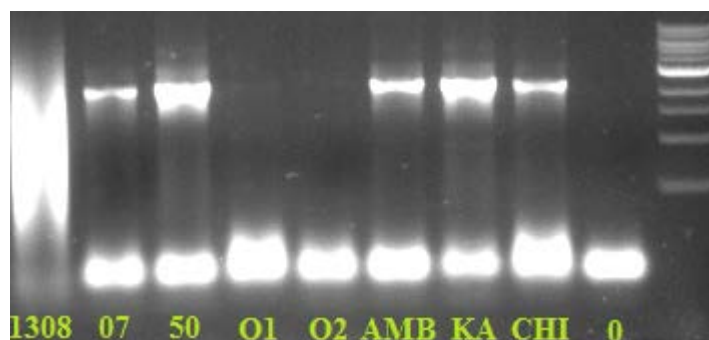
Trofozoity a zejména cysty jednotlivých kmenů améb byly pozorovány a nafoceny pomocí mikroskopu s kamerou. Fotografie jsou uvedeny v příloze. Morfologie cyst kmene O2 byla zřetelně odlišná od morfologie ostatních kmenů.

5.2 PCR a elektroforéza

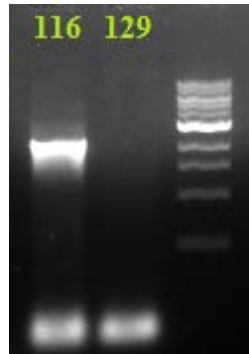
Obrázek 3 a 4 ukazuje výsledek elektroforézy po amplifikaci pomocí primerů ERIB1 a ERIB10. Tyto se neosvědčily zcela, neboť některé ze vzorků (1308, O1, O2 a DE129) nevyšly. Vzorky, které se podařilo amplifikovat, jsem se pokusila zaklonovat, ale úspěšné bylo klonování jedině kmene 1308, jehož kompletní sekvenci se mi podařilo získat.

Obr. 3 Vizualizace fragmentů DNA améb, za použití primerů ERIB 1 a ERIB 10.

Symbolem „0“ je označena negativní kontrola.

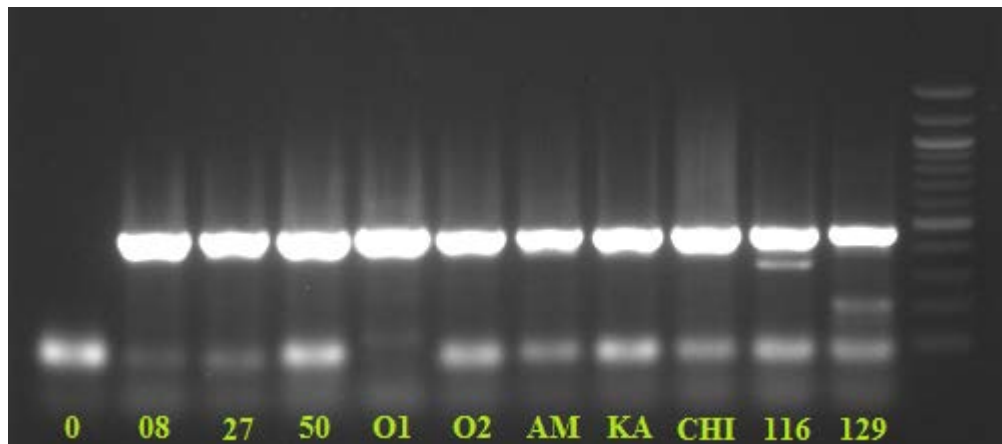


Obr. 4 Vizualizace vzorků DE116 a DE129



Po přechodu k primerům AcaJDP1 a AcaJDP2 byla elektroforéza úspěšná. Jak je vidět na příkladu na obrázku 5, všechny vzorky poskytly PCR produkt.

Obr. 5 Vizualizace fragmentů DNA améb, použití primerů AcaJDP1 a AcaJDP2. Symbolem „0“ je označena negativní kontrola.



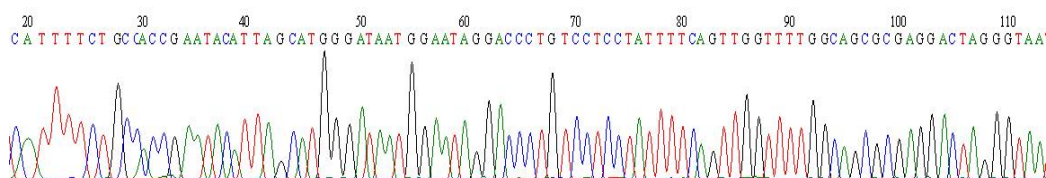
5.3 Sekvence

Sekvence byly získány z následujících kmenů izolovaných z ryb: 1308 a 1327. Dále byly získány sekvence environmentálních kmenů AMB a KAL. Povedlo se mi získat i sekvence ze dvou tzv. mořských vzorků, což byly vzorky

DE116 a DE119. Významné jsou dvě získané sekvence z obou izolátů z oka, O1 a O2. Obrázek 6 ilustruje na příkladu podobu surových sekvenčních dat.

Byla získána i sekvence z kmene P128V, který byl již v minulosti předběžně klasifikován jako akantaméba, a to na základě morfologických dat. Jak se však ukázalo po otestování příslušnosti získané sekvence pomocí programu BLAST, nejde v tomto případě o akantamébu, ale o mylně určeného zástupce rodu *Vannella*.

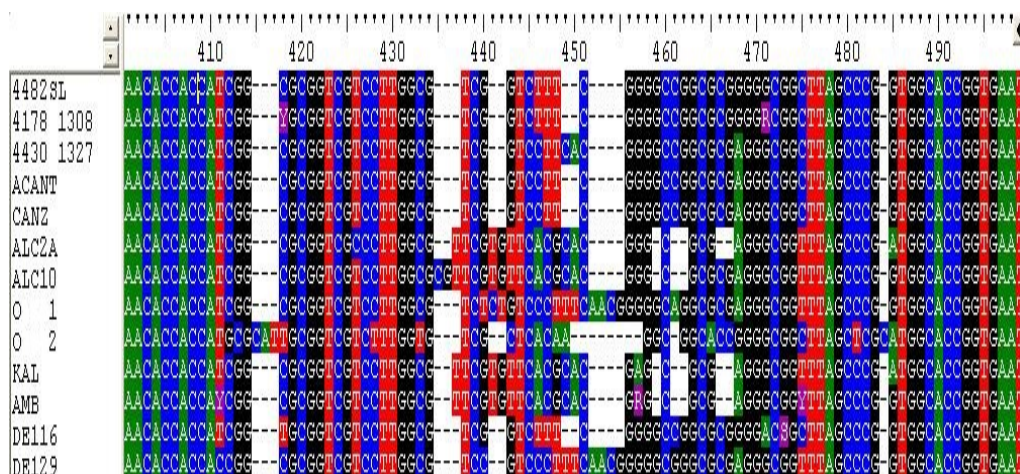
Obr.6 Výstup ze sekvenátoru



5.4 Fylogenetické analýzy

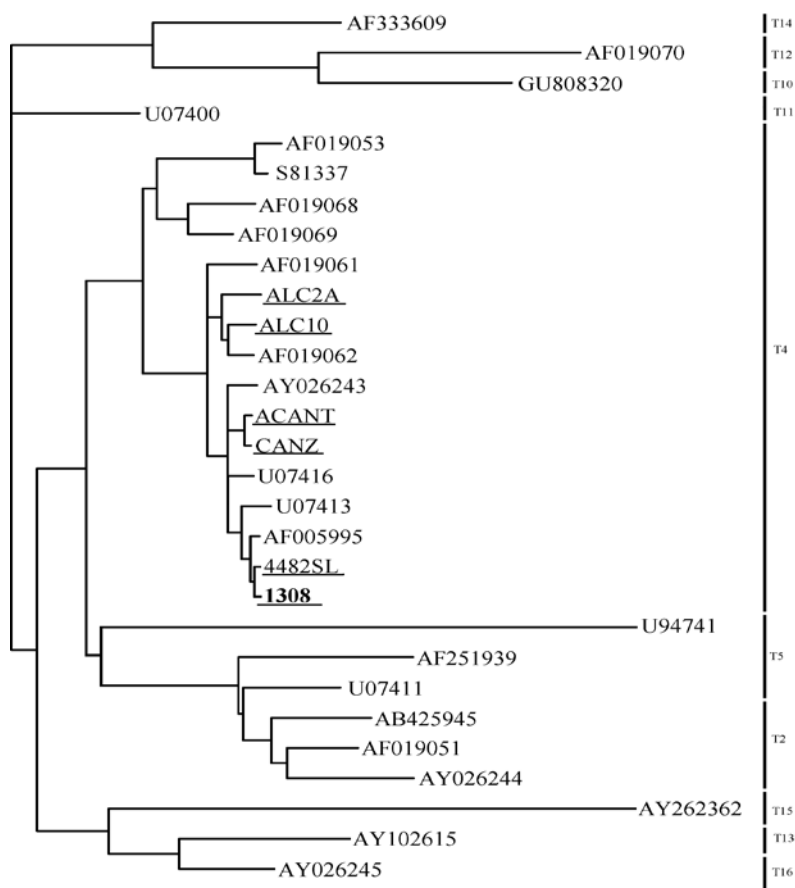
Na obrázku 7 je pro ilustraci výřez z okna programu BioEdit znázorňující část analyzovaných dat v alignmentu.

Obr. 7 Ukázka alignmentu



Na obrázku č. 8 je ukázán výsledný fylogenetický strom získaný fylogenetickou analýzou celkem 29 kompletních sekvencí SSU rDNA. Jak je vidět, všechny sekvence získané v laboratoři rybí parazitologie analyzované v tomto datasetu patří do subtypu T4. Následující obrázek 9 ukazuje výsledný strom získaný analýzou celkem 45 částečných sekvencí SSU rDNA (zahrnující náš cílový fragment amplifikovaný primery AcaJDP1 a 2). Ve stromě je zajímavé postavení kmene O2 – narozdíl od ostatních náleží ke genotypu T3.

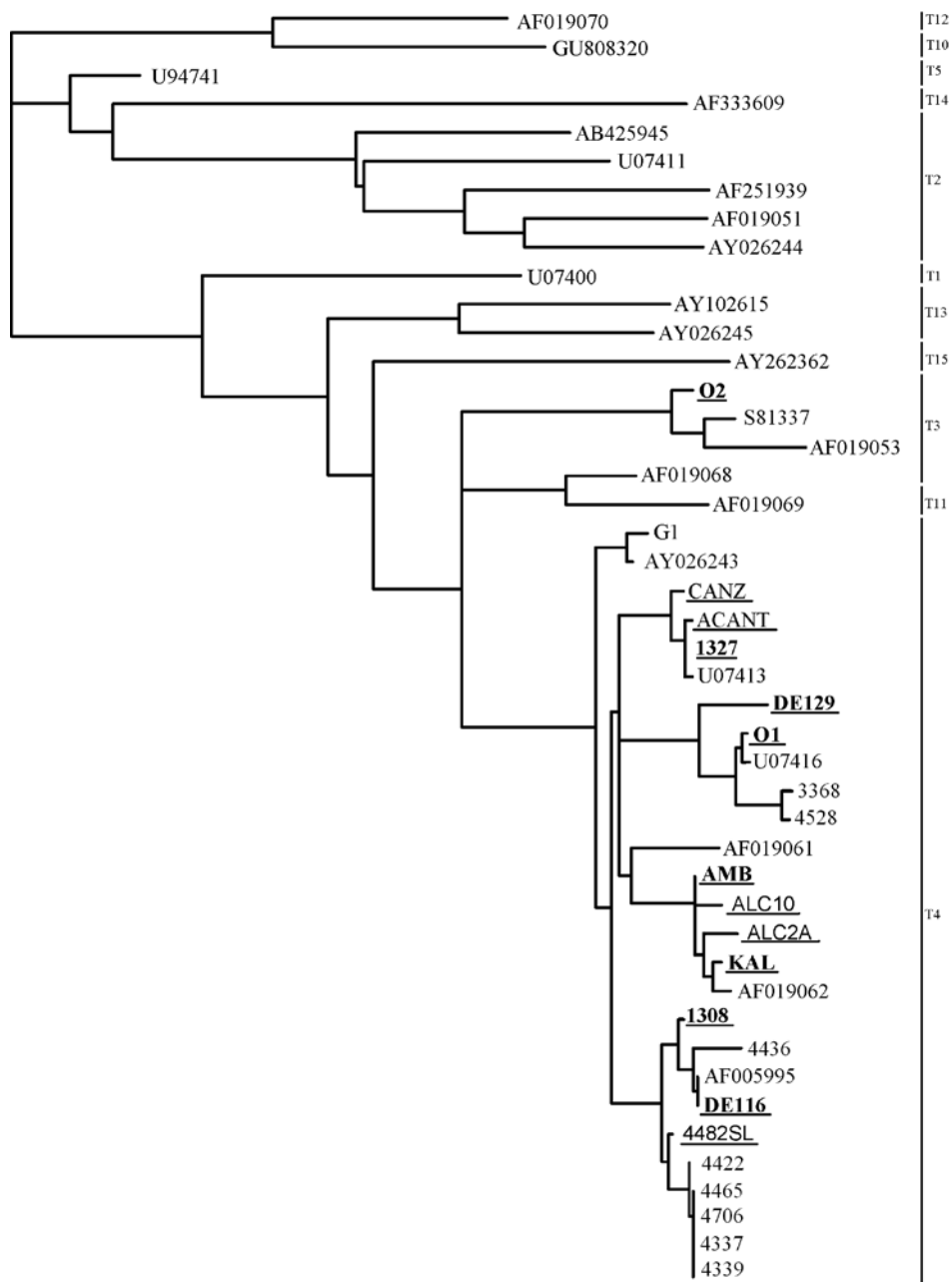
Obr. 8 Fylogenetický strom 1



Pro tvorbu fylogenetických stromů jsem měla k dispozici tři druhy sekvencí. První jsou ty, které jsem sekvenovala já (zvýrazněny tučně a podtržené), druhé jsou sekvence pocházející z Laboratoře rybí parazitologie, které však doposud nebyly

analyzovány, ty jsou pouze podtrženy. Ostatní sekvence jsou již zveřejněné sekvence nejčastěji používané v jiných publikacích. Ve stromě jsou označeny přístupovým kódem databáze GenBank.

Obr. 9 Fylogenetický strom 2



Stejně jako v prvním fylogenetickém stromu, tak i zde jsou moje osekvenované vzorky označeny tučně a podtržené. Ty, které jsou jen podtržené pocházejí z laboratoře rybí protistologie a zatím nebyly analyzovány, ale nebyly získány mnou osobně. Zbylé jsou již k dispozici v databázi GenBank a jsou označeny přístupovým kódem, nebo (v případě sekvencí získaných v minulosti v laboratoři rybí protistologie) názvem kmene.

6 Diskuze

V této kapitole bych chtěla prodiskutovat několik otázek, které vyplývají z mých výsledků. Nejprve se jedná o vhodnost primerů, které jsem používala. Měla jsem k dispozici primery ERIB1, ERIB10 a primery Aca JDP1, Aca JDP2. Primery ERIB sice poskytly delší sekvenci, ale nejsou tolik spolehlivé a efektivní (bylo třeba klonovat, což je zdržení a prodražení, a navíc je třeba vzhledem k délce produktu sekvenovat naněkolikrát). Navíc elektroforéza po provedení některých klonování neukázala přítomnost ani jednoho fragmentu DNA. Zároveň se potvrdilo, že i kratší úsek poskytnutý primery AcaJDP bohatě stačí ke spolehlivému zařazení do subtypu – tentýž úsek byl úspěšně využit již v minulosti (Dyková et al. 1999, Schroeder et al., 2001), i když pro popis nových genotypů je vhodná kompletnější sekvence (Corsaro et al., 2011). I já jsem ověřila, že celá sekvence SSU rDNA poskytuje z hlediska zařazení kmenů do genotypu podobný fylogenetický signál jako námi využitý fragment.

Dále bych se chtěla věnovat samotným genotypům. Ukázalo se, že mezi našimi vzorky je nejvíce zastoupen genotyp T4, což odpovídá výsledkům dalších pracovišť (viz např. Risler et al., 2013 a další). Zčásti to také potvrzuje výše specifikovanou hypotézu H_1 – T4 je skutečně nejhojnější z námi nalezených genotypů v environmentálních vzorcích, zároveň ale také jediný, což je s touto hypotézou v rozporu. V rámci tohoto genotypu reprezentují námi zkoumané organismy celou řadu různých sublinií – T4 je nejen hojný, ale i geneticky variabilní. Zajímavostí je, že i akantaméby izolované z mořského prostředí spadají do tohoto genotypu – zdá se, že i jeho ekologická valence je široká. Nejedná se přitom nejspíš jen o případ cyst přežívajících v místě izolace – améby byly schopny v laboratorních podmínkách na médiu pro mořské améby růst. Zároveň se trochu překvapivě ukázalo, že také genotyp T3 je zastoupen v jednom ze dvou našich

klinických vzorků. Oba genotypy jsou rozlišitelné i na základě morfologie pozorované ve světelném mikroskopu (viz příloha).

V návaznosti na genotypy bych chtěla prodiskutovat kazuistiky dvou klinických vzorků. První vzorek (O1) pochází z Brna, pacientkou je žena (r. 1988). Tato žena trpí diabetem 1. typu, celkově se neobejde bez dopomoci. Prodělala mnoha operací oka, na pravé oko nevidí vůbec, na levé částečně. V druhém případě (O2) je pacientem muž (r. 1987). Muž je nositelem kontaktních čoček, dva měsíce před stanovením *Acanthamoeba* byl léčen na herpetickou keratouveitidu levého oka. Žena i muž prodělali onemocnění, které snížilo jejich celkovou imunitu a na základě tohoto aspektu došlo k napadení amébou. Vzhledem k tomu, že oba pacienti jsou relativně mladí, tak se jedná o případy napadení v mladistvém věku. Zajímavé je, že po výsledné sekvenci vyšel vzorek O1 jako genotyp T4 a vzorek O2 jako genotyp T3. To je v rozporu s naším původním očekáváním vyjádřeným druhou z hypotéz (H₂), kdy jsme očekávali uplatnění pouze genotypu T4. Genotyp T4, který je nejhojnější se tedy potvrdil i v tomto případě. U vzorku O2 se předpokládá, že k infekci došlo právě nošením kontaktních čoček, avšak muž uvádí, že již roztok ani kontaktní čočky nemá. Postižená žena také uvádí, že je nositelkou kontaktní čočky, ale stěr z této čočky zřejmě nebyl pořízen. Z toho vyplývá, že ani u jednoho z případů nejsme schopni s jistotou určit přesně příčinu infekce, můžeme pouze předpokládat, že k napadení došlo právě skrze kontaktní čočky.

Na konec bych chtěla poukázat na nové zjištění, na které jsem narazila při vyhodnocování sekvencí. Jde o důležitost zevrubného ověřování rodové příslušnosti améb – příklad kmene P128V ukazuje, že záměny mezi rody améb nejsou výjimkou, ověření pomocí sekvenace spolehlivě ukáže, o jakou amébu se jedná. Důvod záměny mi není známý (měla jsem k dispozici jen DNA vyizolovanou již před lety). *Vannella* narozdíl od akantaméb cysty netvoří, nicméně

ve stádiu trofozoita je záměna mnohem snazší. V rámci améb nejsou špatně určené druhy výjimkou ani u zkušených odborníků (viz např. Smirnov et al., 2007).

7 Závěr

1. Za cíl své práce jsem měla získat sekvence poskytnutých vzorků DNA, což se povedlo v devíti případech.
2. Sekvence jsem vyhodnotila a připravila ke zpracování pomocí služby BLAST a programů CLUSTALx a BioEdit.
3. Fylogenetické analýzy a jejich interpretaci jsem provedla pomocí programu PAUP a TreeView. Většina vzorků, ze kterých byla vyhodnocena sekvence, byla pomocí fylogenetického stromu vyhodnocena jako genotyp T4. Další zastoupený genotyp byl T3.
4. Na základě provedení metody elektroforézy se ukázalo, že nejefektivnější bylo použití primerů Aca JDP1 a Aca JDP2, což má svůj význam i v pokračování dalšího výzkumu, který bude dále probíhat v provedení Laboratoře rybí protistologie. Primery, které jsem používala ze začátku (ERIB1, ERIB10) mohou posloužit k získání fragmentů sekvencí jiných améb.

8 Použitá literatura

- Barnett NDP, Kaplan AM, Hopkin RJ, Saubolle MA, Rudinsky MF, 1996. Primary amoebic meningoencephalitis with *Neogleria fowleri*: Clinical review. 15: 230-234.
- Barta JR, Martin DS, Liberator PA, Dashkevicz M, Anderson JW, Feighner SD, Elbrecht A, Perkins-Barrow A, Jenkins MC, Danforth HD, Ruff MD, Profous-Juchelka H. 1997. Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. J. Parasitol. 83: 268–271.
- Bartlett JMS, Stirling D, 2003. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *PCR Protocols*. 226: 3–6.
- Corsaro D, Venditti D. 2011. More *Acanthamoeba* Genotypes: Limits to the Use rDNA Fragments to Describe New Genotypes. *Acta protozoologica* 50: 49-54.
- Dart JKG, Saw VPJ, Kilvington S. 2009. *Acanthamoeba* Keratitis: Diagnosis and Treatment. *Am J Ophthalmol*. 148: 487–499.
- Dunnebacke TH, Schuster FL, Yagi S, Booton GC. 2004. *Balamuthia mandrillaris* from soil samples. *Microbiology*. 150: 2837–2842.
- Dyková I, Lom J, Schroeder-Diedrich JM, Booton GC, Byers TJ. 1999. *Acanthamoeba* Strains Isolated from Organs of Freshwater Fishes. *The Journal of Parasitology* 6: 1106-1113

- Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriot D, Ellis J., Harkness J. 2007. Laboratory Diagnostic Techniques for *Entamoeba* Species. *Clin. Microbiol. Rev.* 20: 511.
- Gray TB, Cursons RTM, Sherwan JF, Rose PR. 1995. Acanthamoeba, bacterial, and fungal contamination of contact lens storage cases. *British Journal of Ophthalmology.* 79: 601-605.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Illingworth ChD, Cook SD. 1998. Acanthamoeba Keratitis. *Surv Ophthalmol.* 42: 493–508.
- Kalinina LV, Page FC, 1992. Culture and preservation of naked amoebae. *Acta Protozool.* 31: 115-126.
- Khan NA. 2006. Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. School of Biological and Chemical Sciences. *FEMS Microbiol Rev.* 30: 564-95.
- Khan NA. Acanthamoeba: Biology and Pathogenesis. Norfolk UK: Caister Academic Press, 2009. ISBN: 978-1-904455-43-1
- Khan NA, Jaroll EL, Paget TA, 2001. Molecular and Physiological Differentiation Between Pathogenic and Nonpathogenic *Acanthamoeba*. *Current microbiology* 45: 197–202.
- Kilvington S, Lam A. 2013. Development of Standardized Methods for Assessing Biocidal Efficacy of Contact Lens Care Solutions Against Acanthamoeba Trophozoites and Cysts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54: 4527–4537

- Kodet R, Nohýnková E, Tichý M, Soukup J, Visvesvara GS. 1998. Amebic Encephalitis Caused by *Balamuthia mandrillaris* in a Czech Child: Description of the First Case from Europe. *Pathol. Res. Pract.* 194: 423-430.
- Larkin M.A, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin ., Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.
- Ma P, Visvesvara GS, Martinez AJ, Theodore FH, Daggett PM, Sawyer K. 1990. Naegleria and Acanthamoeba Infections: Review. *Reviews of Infectious Diseases.* 3: 490-513.
- Marciano – Cabral F, Cabral G, 2003. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 273.
- Marciano – Cabral F, 2009. Free-Living Amoebae as Agents of Human Infection. Editorial Commentary. Report by Qvarnstrom et al. 1139–42.
- Marciano – Cabral F, 1988. Biology of Naegleria spp. *American Society for Microbiology.* p. 114-133.
- Martinez AJ, Visvesvara GS, 1997. Free-living, Amphizoic and Opportunistic Amebas. *Brain Pathology* 7: 583-598.
- Matin A, Siddiqui R, Jayasekera S, Khan NA. 2008. Increasing Importance of *Balamuthia mandrillaris*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2: 435.

- Nieder Korn JY, Alizadeh H, Leher H, McCulley JP. 1999. The pathogenesis of *Acanthamoeba keratitis*. *Microbes and Infection*. 1: 437–443.
- Page RDM. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357-358.
- Podstatová H. Mikrobiologie, epidemiologie, hygiena. Olomouc: Epava, 2001.
- Risler A, Goutaland BC, Pélandakis M, 2013. Genotyping and phylogenetic analysis of *Acanthamoeba* isolates associated with keratitis. *Parasitol Res* 112: 3807–3816.
- Rudell JCH, Gao J, Sun Y, Sun Y, Chodosh J, Schwab I, Zhao M. 2013. *Acanthamoeba* Migration in an Electric Field. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 54:4225–4233.
- Schuster FL, Dunnebacke TH, Booton GC, Yagi S, Kohlmeier K, Glaser C, Vugia D, Bakardjiev A, Azimi P, Madduz-Gonzalez M, Martinez AJ, Visvesvara GS. 2003. Environmental Isolation of *Balamuthia mandrillaris* Associated with a Case of Amebic Encephalitis. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3175.
- Schuster FL, Yagi S, Gavali S, Michaelson D, Raghovan R, Blomquist I, Glastonburry C, Bollen AW, Scharnhorst D, Reed SL, Kurigana S, Visvesvara GS, Glaser GA. 2009. *Balamuthia* amebic encephalitis. *Clin Infect Dis*. 48: 879-887.
- Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, Fuerst PA, Byers TJ. 2001. Use of Subgenomic 18S Ribosomal DNA PCR and Sequencing for Genus and Genotype Identification of *Acanthamoebae* from Humans with Keratitis and from Sewage Sludge. *J. Clin. Microbiol.* 39: 1903.

- Siddqui R, Khan NA. 2012. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & Vectors*. 5: 6.
- Sina M, Simpson AGB, Lane ChEL, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Gall LL, Lynn DH, McManus H, Mitchell EAD, Mozley-Stanridge S, Parfrey W, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW. 2012. The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 59: 429-493.
- Smirnov AV, Nasonova ES, Cavalier-Smith T. 2007. Correct identification of species makes the amoebozoan rRNA tree congruent with morphology for the order Leptomyxida Page 1987; with description of *Acramoeba dendroidea* n. g., n. sp., originally misidentified as '*Gephyramoeba* sp.' *European Journal of Protistology* 44: 35-44.
- Stothard DR, Schroeder-Diedrichm JM, Awwad H, Gast RJ, Ledee DR, Rodriguez-zaragoca S, Dean ChL, Fuerst PA, Byers TJ. 1998. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 45: 45-54.
- Swofford DL. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Trabelsi H, Dendana F, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, Makni F, Ayadi A. 2012. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Pathologie Biologie* 60: 399-405.

- Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL, 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50: 1–26.
- Volf P, Horák P. Paraziti a jejich biologie. 1.vydání. Praha: Triton, 2007. ISBN: 978-80-7387-008-9
- Walochnik J, Wylezich C, Michel R, 2010. The genus *Sappinia*: History, phylogeny and medical relevance. *Experimental Parasitology* 126: 4–13.
- Winięcka – Krusnell J, Linder E, 2001. Bacterial infections of free-living amoebae. *Res. Microbiol.* 152: 613–619.

9 Klíčová slova

Acanthamoeba

fylogeneze

keratitida

granulomatózní amébová encefalitida

Acanthamoeba

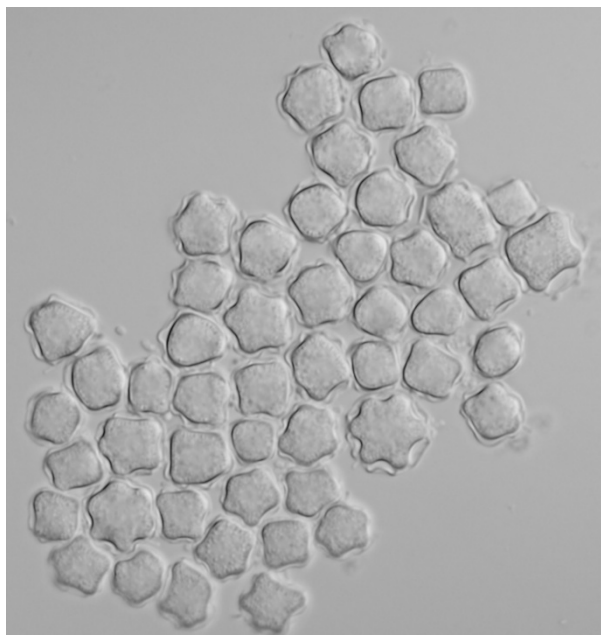
phylogeny

keratitis

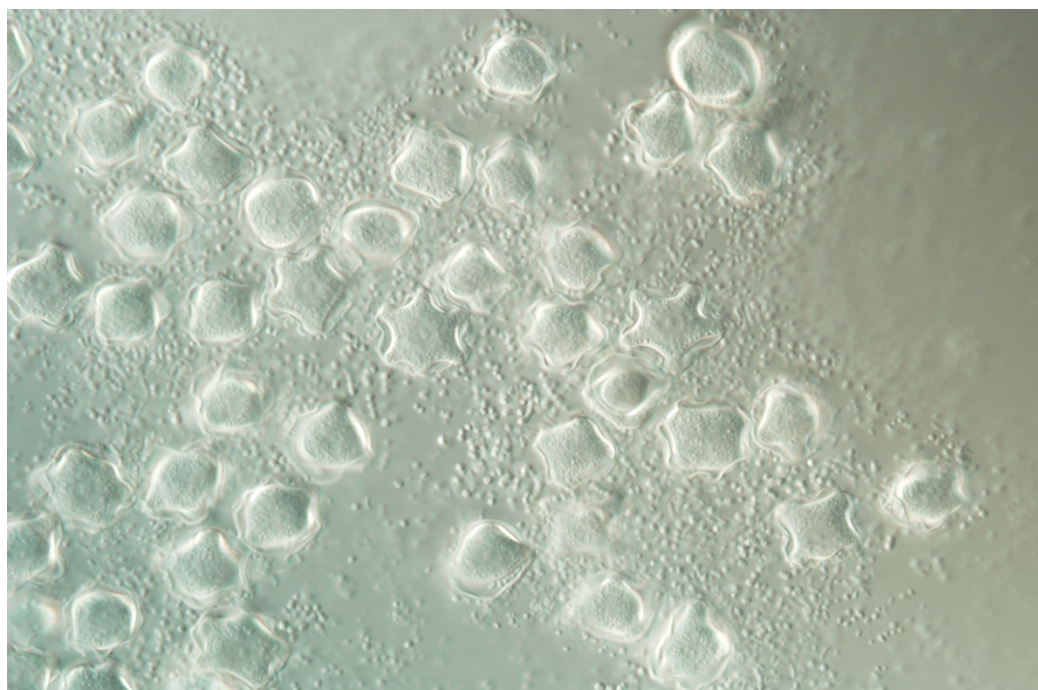
granulomatous amoebic encephalitis

10 Příloha – fotografie

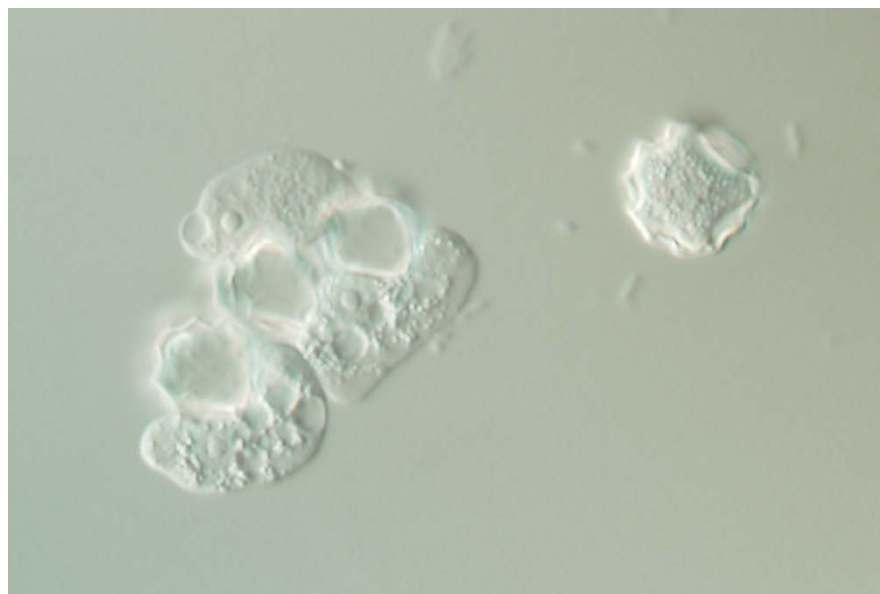
Cysty améb kmene KAL (environmentální izolát)



Kmen AMB (environmentální izolát), cysty obklopené bakteriemi.



Kmen O1 (izolát z oční rohovky)– cysty (nahore) a čerstvě excystované trofozoity (dole)



Vzorek O2 (izolát z oční rohovky) – cysty

