



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 laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

# Molekulární charakterizace vybraných kmenů améb rodu *Naegleria*, potenciálních lidských patogenů

Vypracoval: Klára Zítková  
Vedoucí práce: Doc. RNDr. Oleg Ditrich CSc.

České Budějovice 2014

## Abstrakt

Rod *Naegleria* patří mezi eukaryotické organizmy, které obecně označujeme jako améby (měňavky). Pojmenování je odvozené od způsobu jejich pohybu, při kterém mění svůj tvar.

Améby neboli měňavky, zahrnují velké množství rozdílných a rozmanitých rodů se zástupci, kteří mohou být pro člověka patogenní stejně jako druh *Naegleria fowleri*. Např. rod *Acanthamoeba* a *Entamoeba*, původci akantamébové keratitidy resp. měňavkové úplavice a dalších závažných potíží. Přes povrchní podobnost nejsou negleriím příbuzné: patří mezi Amoebozoa, *Naegleria* mezi Heterolobosea.

Nejvýznamnějším druhem tohoto početného rodu je améba *Naegleria fowleri*. Jako jediná je patogenní pro člověka a po nakažení způsobuje onemocnění, které se nazývá primární amébová meningoencefalitida.

Invazivním stádiem je v případě neglerie měňavkový trofozoit. Přechodnou formou jejího životního cyklu je flagelát, nebo také bičíkovec; jejich charakteristickým znakem je přítomnost bičíků. Za nepříznivých podmínek se mění v rámci svého životního cyklu do stádia cysty.

Velkou část práce zahrnují informace o druhu *Naegleria fowleri* a primární amébové meningoencefalitidě, kterou u člověka způsobuje (PAM). Objasňují se zde zdroje infekce a rizikové faktory napadení. Délka inkubační doby a objevení se prvních příznaků. Další kapitola se týká mechanismu vniknutí do organismu, jak lze tuto infekci správně diagnostikovat a detekovat a také možnost léčby, při včasném rozpoznání vzniklých příznaků. Možnosti případné prevence a epidemiologie, zahrnující zmínku o největší epidemii, která proběhla v rámci České republiky.

V praktické části této práce je popsána vlastní studie s metodickým postupem, výsledky a vyhodnocením stanovených hypotéz. Cílem experimentální části byla analýza poskytnuté DNA neglerií. Na základě stanovených cílů a hypotéz jsem zjišťovala, o jaké druhy neglerií se konkrétně jedná. Výsledná fylogenetická analýza byla obohacena o vzorky, které již byly dříve sekvenované, ale nebyly dosud zahrnuty do žádné z analýz. První fáze studie zahrnovala izolaci DNA. Následujícím krokem bylo za pomoci PCR amplifikace a sekvenace ITS zjistit, zdali se opravdu jedná o améby rodu *Naegleria*, a poté zařazením do fylogenetické analýzy určit druhy tohoto rodu. Ke zpracování výsledných sekvencí jsem využila programu BioEdit a program ClustalX jsem použila pro alignování. Výsledné fylogenetické stromy byly vytvořeny za pomoci programu PAUP a jejich následná vizualizace proběhla díky programu TreeView. K samotnému sekvenování bylo využito služeb firmy Seqme.

Za pomoci fylogenetických stromů se mi podařilo zjistit, kterým druhům zkoumané vzorky odpovídají a tím částečně potvrdit první z hypotéz, že bude možné zkoumané sekvence přiřadit k identickým druhům. Mezi výsledné druhy patří: *N. americana* zahrnující dva zástupce, s *N. canariensis* je celkem identických dvanáct vzorků, *N. dobsoni* dle fylogenetické analýzy odpovídají tři sekvence ITS a s *N. pagei* a *N. tihangensis* je shodný vždy jeden zástupce. Několik vzorků (GERK, MSED4, ALM1A, 62K4 a GG1BV) nebylo možné pomocí molekulárních metod identifikovat s žádným popsaným druhem a lze je považovat za druhy nové. Na základě tohoto zjištění bylo možné potvrdit druhou hypotézu, týkající se nedostatečného prozkoumání nových druhů a tedy potvrdit následné objevení pravděpodobně druhů nových. Data spíše potvrzují hypotézu č. 3 říkající, že na jedné lokalitě převládne vždy jeden (dominantní) druh rodu. A na základě tohoto částečně potvrdit hypotézu č. 4, která oponuje hypotéze č. 3.

## Abstrakt

The genus *Naegleria* is a eukaryotic organism, one of those we can call “amoeba” – a general name of creatures changing their shape during their locomotion.

Amoebae comprise a huge number of various different genera some of which contain species able to infect humans similar to *Naegleria fowleri*. Two important examples are the genera *Acanthamoeba* and *Entamoeba*, causative agents of acanthamoeba keratitis or diarrhoea, respectively, and other serious symptoms. Although superficially similar, they are not close relatives of *Naegleria*: they belong to Amoebozoa, whereas *Naegleria* is a Heterolobosea.

The most important species of this speciose genus is the amoeba *Naegleria fowleri*. It is the only *Naegleria* which is a human pathogen. After infection, it causes primary amoebic meningoencephalitis.

The invasive stage of *Naegleria* is an amoebic trophozoite. Under certain circumstances, it can transform in another form, the flagellate bearing undullipodia. When the conditions worsen, it changes in the resistant cyst stage.

Major part of my work is related to *Naegleria fowleri* and primary amoebic meningoencephalitis, which causes human (PAM). They clarify here the source of infection and risk factors for assault. The length of incubation period and the first appearance of symptoms. The next chapter concerns the mechanism of intrusion into the body, how can this infection properly diagnose and detect and also a treatment option, resulting in early detection of symptoms. Possibilities prevention and epidemiology, including presentation of biggest epidemic, that happened in the Czech Republic.

In the practical part of this thesis summarize my own study and methods used, as well as the results and their interpretation. The aim of the experimental part was the analysis of *Naegleria* DNA maintained in the collection of the laboratory of fish pathogens. To reach my goal and test the hypotheses of this thesis, I identified the *Naegleria* isolates. The final phylogenetic analysis was enriched with samples sequenced earlier, but so far not analyzed in any previous work. The first step in the workflow was the DNA isolation. The next one was to PCR amplify and sequence the ITS sequences to confirm they belong to *Naegleria* species, and to analyze the sequences phylogenetically and identify the species. The obtained sequences were edited in BioEdit software, program ClustalX was used to align them. The phylogenetic trees were computed in PAUP. Sequencing was provided by Seqme company.

During the interpretation of the phylogenetic trees, I found which species were present in studied samples. They were as follows: two samples were *N. americana*, twelve others *N. canariensis*, three were *N. dobsoni* and there were also *N. pagei* and *N. tihangensis* – one sample each. Several samples (GERK, MSED4, ALM1A, 62K4 and GG1BV) were different from any known species and it is therefore possible to consider them new, undescribed species. On the basis of this fact we can confirm the hypothesis nr. two: the species diversity is understudied and the recognition of new species probable. The data seem to support hypothesis 3: in a given locality, a single dominant species becomes dominant. In some localities, however, we could not fully exclude the opposing hypothesis 4.

## **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 11.8.2014

.....

(jméno a příjmení)

## **Poděkování**

V první řadě bych na tomto místě chtěla poděkovat svému vedoucímu práce doc. RNDr. Olegu Ditrichovi, CSs. za odborné vedení práce a jeho cenné rady. Velké poděkování patří mému školiteli Mgr. Martinovi Kostkovi, Ph.D., který vedl výzkumnou část mé práce. Jeho rady a připomínky byly pro vznik této práce nezbytnou součástí. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celému kolektivu laboratoře rybí protistologie BC AVČR.

# Obsah

Seznam použitých zkratk.....	10
Úvod .....	11
1 Současný stav.....	12
1.1 Systematické zařazení patogenních améb.....	12
1.1.1 Systematické zařazení rodu <i>Naegleria</i> dle Horáka a Volfa .....	12
1.1.1.1 říše: Excavata.....	13
1.1.1.2 kmen: Heterolobosea .....	13
1.1.1.3 řád: Schizopyrenida .....	13
1.1.1.4 rod: <i>Naegleria</i> .....	14
1.1.2 Nepříbuznost rodů <i>Acanthamoeba</i> a <i>Entamoeba</i> .....	14
1.2 Životní cyklus ( <i>N. fowleri</i> ) a teplotní preference jeho stádií .....	15
1.2.1 Trofozoity (měňavka).....	16
1.2.2 Bičíkovec (flagelát).....	17
1.2.3 Cysta .....	18
1.2.4 Teplotní preference .....	19
1.3 Druhy rodu <i>Naegleria</i> .....	20
1.3.1 <i>Naegleria fowleri</i> a jiné patogenní druhy.....	20
1.4 Primární amébová meningoencefalitida (PAM) .....	23
1.4.1 Zdroje infekce a rizikové faktory .....	24
1.4.2 Inkubační doba a příznaky .....	24
1.4.3 Mechanismus vniknutí .....	25
1.4.4 Diagnóza a detekce .....	28
1.4.5 Léčba.....	32
1.4.6 Prevence.....	32
1.4.7 Epidemiologie .....	33
2 Cíle práce a hypotézy .....	34
2.1 Cíle práce .....	34
2.2 Hypotézy .....	34
3 Metodika.....	35



3.1	Charakteristika sledovaného souboru .....	35
3.2	Metodika .....	37
3.2.1	Mikroskopické pozorování .....	37
3.2.2	Izolace mol. DNA .....	37
3.2.3	Amplifikace SSU rDNA .....	38
3.2.4	Sekvence ITS .....	39
3.2.5	ELFO.....	40
3.2.6	Extrakce DNA z gelu .....	41
3.2.7	Sekvenace .....	42
3.2.8	Sekvenční data a jejich zpracování .....	42
4	Výsledky.....	44
4.1	Mikroskopická pozorování .....	44
4.2	Metody PCR a ELFO.....	44
4.3	ITS sekvence.....	45
4.4	Fylogenetické analýzy .....	46
5	Diskuze .....	51
6	Závěr.....	54
7	Seznam informačních zdrojů.....	55
8	Klíčová slova .....	60
9	Příloha – fotografie.....	61

## **Seznam použitých zkratk**

AV ČR - Akademie věd České republiky

CNS - centrální nervová soustava

CSF - cerebrospinal-fluid (mozkomíšní mok, likvor)

DNA - deoxyribonukleová kyselina

ELFO - elektroforéza

ITS - internal transcribed spacer

NK - nukleová kyselina

PAM - primární amébová meningoencefalitida

PCR - Polymerase Chain Reaction (řetězová polymerázová reakce)

SSU rRNA - 18S ribosomální ribonukleová kyselina

UV – ultraviolet (ultrafialový)

## Úvod

Volně žijící améby jsou prvoci; ve svém výčtu zahrnují m.j. zástupce rodu *Naegleria*. Rod těchto améb je tvořen druhy, které mají patogenní či nepatogenní charakter. Jsou rozšířeny po celém světě a žijí volně ve sladkých vodách. Patogenní druhy rodu *Naegleria* způsobují systémové onemocnění různých živočichů, mají na svědomí např. úhyny ryb.

Nejvýznamnějším patogenním druhem rodu je bezpochyby *Naegleria fowleri*, která jako jediná vyvolává svým působením infekci u člověka. Z tohoto důvodu je označována jako nejdůležitější z druhů svého rodu. Onemocnění, které způsobuje, se nazývá primární amébová meningoencefalitida. Nemoc se vyskytuje jen výjimečně a ve většině známých případů končí smrtí infikovaného jedince. Zdrojem nákazy je teplá voda v jezerech, rybnících, plaveckých bazénech a jiných místech jejího výskytu. Vstupní bránou infekce je nosní dutina. Nejčastěji tato nemoc postihuje zdravé děti a mladé dospělé.

Cílem mé práce bylo získat sekvence genů ITS z molekul DNA, které byly izolovány z vybraných kmenů améb rodu *Naegleria*. Za pomoci těchto získaných sekvencí provést fylogenetickou analýzu a potvrdit či vyvrátit hypotézy, stanovené na základě očekávaných výsledků studie.

# 1 Současný stav

## 1.1 Systematické zařazení patogenních améb

Zástupci rodu *Naegleria* jsou volně žijící améby, patogenního a oportunního charakteru. Tyto améby patří mezi aerobní, eukaryotní a mitochondriální prvky. Společně s rodem *Naegleria* k těmto volně žijícím amébám, schopným napadat člověka, řadíme také rod *Acanthamoeba* a druhy *Balamuthia mandrillaris* a *Sappinia diploidea*. Vyskytují se po celém světě a jsou potenciálním zdrojem infekce u lidí a jiných savců. Onemocnění, která vyvolávají, se objevují poměrně vzácně, protože k parazitickému způsobu života se uchylují výjimečně. Výskyt onemocnění souvisí s faktem, že se jedná o améby, označované jako volně žijící. To znamená, že na svém potenciálním hostiteli nejsou životně závislé (Visvesvara et al., 2007).

Škála míst, kde se vyskytují, je pestrá a specifická pro každý rod či druh. Do výčtu těchto lokalit a oblastí patří půda, prach a vzduch. Dále pitná voda, voda v plaveckých bazénech a voda, která je součástí kanalizace. Jejich nalezení ve zdravotnických pomůckách a přístrojích je také možné. Některé z nich, zejména akantaméby, lze objevit v očních kapkách, na nevhodně ošetřovaných kontaktních čočkách, v rámci dialyzačních jednotek a zubního lékařství (Trabelsi et al., 2012).

Jejich identifikace je primárně založena na morfologii, vzhledu jádra (jader), teplotních tolerancích, patogenitě, dále na biochemických a genetických metodách. (Ma et al., 1990).

### 1.1.1 Systematické zařazení rodu *Naegleria* dle Horáka a Volfa (Volf, Horák, 2007):

- nadříše: Eukaryota
- říše: Excavata
- kmen: Heterolobosea (Percolozoa)

- řád: Schizopyrenida
- rod: *Naegleria*

#### 1.1.1.1 říše: Excavata

Tato říše zahrnuje řadu parazitologicky významných zástupců (např. *Giardia*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Trichomonas* aj.). Převažují prvoci charakteru bičíkovce, v menší míře tvoří tito bičíkovci měňavkovitá stádia či jde přímo o drobné měňavky. Většina z těchto organismů má nějakým způsobem modifikované mitochondrie, což však pro neglerie neplatí (Volf, Horák, 2007). Typickým znakem měňavkovitých stádií améb je přítomnost erupčních pseudopodií, umožňující jejich pohyb (Adl et al., 2012).

#### 1.1.1.2 kmen: Heterolobosea

Zástupci tohoto kmene jsou většinou tzv. améboflageláti. Tento jejich název říká, že v jejich životním cyklu se v typickém případě střídá stádium měňavky a bičíkovce. Měňavkovité stádium ve většině případů převažuje, naopak bičíkaté stádium může i úplně chybět. Forma měňavky připomíná zástupce skupiny Amoebozoa (pravé měňavky). Znaky, které Heterolobosea odlišují, se týkají mitochondrií, které mají diskovité krysty a jejich pohyb je zajištěn pomocí jedné lobopodie. Bičíkovec, jak už označení říká, se pohybuje za pomoci bičíků, kterých může mít dva až čtyři. Též je pro ně charakteristická tvorba odolných cyst (Volf, Horák, 2007).

#### 1.1.1.3 řád: Schizopyrenida

Některé druhy řádu jsou schopny parazitického života ve tkáních živočichů. Označují se jako amfizoické améby (Volf, Horák, 2007).

#### 1.1.1.4 rod: *Naegleria*

Rod *Naegleria* zahrnuje řadu druhů žijících volně ve sladké vodě. Některé z nich mohou způsobovat systémové infekce a úhyny ryb, jeden druh je potenciálním patogenem savců včetně lidí (Volf, Horák, 2007).

#### 1.1.2 Taxonomické postavení rodů *Acanthamoeba* a *Entamoeba*

Mezi zástupci rodu *Acanthamoeba* jsou améby, které parazitují na člověku a vyvolávají různá infekční onemocnění. Od rodu *Naegleria* se odlišuje svým systematickým zařazením, morfologicky, životním cyklem a nemocemi, které způsobuje (Volf, Horák, 2007).

Říše, ve které jsou acanthamoebí zařazeny, se nazývá Amoebozoa a jedná se o tzv. „pravé měňavky“. Charakteristickým znakem těchto měňavek je vytváření lobopodií nebo filopodií, čímž se označují panožky, sloužící amébám k pohybu. Panožek se většinou vytváří větší počet. Mitochondrie mají oproti negleriím trubicovité kristy. (Volf, Horák, 2007)

Rod *Acanthamoeba* patří mezi nejvýznamnější rody améb v rámci této říše. Vytváří charakteristické panožky nazývané akantopodie. Jedná se o široké lobopodie s trnitými výběžky. Tyto měňavky žijí ve sladké, vzácněji i slané vodě, v bahně, půdě a na rostlinách. U lidí mohou být zdrojem dvou různých nemocí. První z nich se nazývá granulomatozní amébová encefalitida (GAE) (Volf, Horák, 2007). Jedná se o ložiskový zánět mozku a postihuje imunosuprimované osoby, jako jsou například lidé po transplantacích, osoby s onemocněním nádorového charakteru, dále diabetiky či zchátralé jedince. Cysta améby se do organismu dostane pomocí vdechnutí nebo oděrkou na kůži. Do vnitřních orgánů jsou trofozoity následně zaneseny krví, nejčastěji putují do centrální nervové soustavy (CNS). Zde vytváří rozsáhlá zánětlivá ložiska. Jedná se o chronické a dlouhotrvající onemocnění. Účinná terapie této nemoci není známa a úmrtnost je téměř vždy stoprocentní (Trabelsi et al., 2012). Kromě GAE

způsobuje i jiné onemocnění. Nazývá se akantamébová keratitida a jedná se o zrak ohrožující infekci (Khan et al., 2001). Zejména se vyskytuje u osob nosících kontaktní čočky, které nedodržují hygienická pravidla sterilizace a dobu jejich nošení (Trabelsi et al., 2012). Vzácně může způsobit onemocnění systémového nebo kožního charakteru (Volf, Horák, 2007).

Kmen Amoebozoa zahrnuje rod *Entamoeba* s nejvýznamnějším druhem *E. histolytica*. U lidí způsobuje tento druh měňavkovou úplavici (dysenterii) a mimostřevní nákazy, které se nejčastěji objevují ve formě jaterního amébového abscesu. K nákaze druhem *Entamoeba histolytica* dochází pozřením jejích čtyřjaderných cyst, které jsou odolné a jsou schopné přežít za nehty, ve vodě a ve výkalech. Akutní fáze je charakteristická krvavým průjmem bez horeček. Mohou se také dostat do jiných orgánů, nejčastěji do jater, kde následně tvoří abscesy. Tato forma nemoci končí nejčastěji smrtí infikovaného. Diagnostika je založena na nálezů cyst (trofozoitů) ve stolici. Také ji lze odhalit pomocí serologických testů nebo sonografie. K léčbě symptomatické i asymptomatické se využívá široké škály medikamentů (Volf, Horák, 2007). Onemocnění úplavice svým výskytem patří mezi nejčastější parazitární infekce. Proto by se měl v endemických oblastech klást důraz na prevenci (Podstatová, 2001). Ročně onemocní desítky milionů lidí a desítky tisíc jich na tuto infekci zemře (Volf, Horák, 2007).

## 1.2 Životní cyklus neglerií

Rod *Naegleria* zahrnuje spektrum různých druhů, z nichž nejprozkoumanější jsou *N. gruberi* a *N. fowleri*. Společným znakem je pro ně životní cyklus (obr. 1), ve kterém se dle okolních podmínek prostředí střídají tři stádia. Měňavkový trofozoit, flagelát, neboli bičíkovec, a cysta (Volf, Horák, 2007).

### 1.2.1 Měňavkový trofozoit

Stádium trofozoita je charakteristické tím, že se jedná o invazivní (v případě patogenních druhů), reprodukční (Maaty, Hamza, 2012) a zároveň růstovou formu améby (Cabral, 1988). Velikost měňavky se pohybuje v rozmezí 10 až 20 mikrometrů (Ma et al., 1990). Ultrastrukturní rysy řadí tuto formu životního cyklu mezi eukaryotní typ buněk (Cabral, 1988).

Améba je ohraničena standardní dvouvrstevnou buněčnou membránou. Vnitřní cytoplazma obsahuje ve velkém množství mitochondrie, ribosomy, potravní a kontraktilní vakuoly. S přítomností ribosomů souvisí také výskyt endoplasmatického retikula a Golgiho aparátu, který se zde nachází v primitivní formě (Cabral, 1988). Stádium má jedno jádro vezikulárního charakteru, s prominentním a centrálně uloženým jadérkem (Visvesvara et al., 2007).

Potravní vakuoly, které trofozoit využívá k příjmu potravy, se liší velikostí a počtem a to v závislosti na druhu naeglerie i nabízené potravy (Cabral, 1988). Ve svém volně žijícím stádiu se pomocí těchto vakuol živí bakteriemi a kvasinkami. Proto se za příznivých podmínek, jako např. na agaru naočkovaném bakterií *E. coli*, nebo obohacené půdě obsahující extrakt z kvasnic, rychle množí. (Ma et al., 1990) Ve tkáních fagocytují také červené a bílé krvinky a svým působením poškozují samotnou tkáň (Maaty, Hamza, 2012).

Pohyb trofozoitů je velmi specifický a probíhá za pomoci pseudopodií, což jsou výběžky cytoplazmy, které se vymršťují v rychlém sledu za sebou na různých místech na povrchu buňky, takže tvar améb se neustále mění. Do těchto výstupků se přelévá cytoplazma a tím dochází k jejich pohybu.

Kontraktilní vakuoly slouží k vylučování odpadních látek, otevírají se a stahují v rámci sekund. Tento proces lze sledovat v cytoplazmě a slouží jako hodnotná



pomůcka v diagnostice. Díky těmto vakuolám lze rozpoznat přítomnost trofozoitů ve tkáni a zamezit tak chybnému určení tkáňových elementů (Ma et al., 1990).

### 1.2.2 Bičíkovec (flagelát)

Stádium bičíkovce je přechodná forma v životním cyklu naeglerií. Flagelát je typický svým hruškovitým tvarem (Maaty, Hamza, 2012) a dosahuje velikosti pohybující se mezi 10-16  $\mu\text{m}$  (Trabelsi et al., 2012) Jádrem bičíkovce je vezikulární, má velký endosom a obsahuje v sobě periferní granula (Schmidt, Roberts, 1996). V tomto stádiu nedochází k rozmnožování ani k přijímání potravy (Visvesvara et al., 2007). Charakteristickým rysem této formy améby je přítomnost dlouhých bičíků. Obvykle se jejich počet pohybuje mezi dvěma až čtyřmi (Cabral, 1988) a nacházejí se na jednom z konců buňky. Bičík využívá améba ke svému pohybu a z toho důvodu v této přechodné fázi nevytváří pseudopodia jako trofozoity. Transformace améboidní formy do stádia bičíkovce je poměrně rychlá. Jakmile dojde k úplnému vyvinutí samotného bičíku, může se takto změněný organismus rychle pohybovat (Schmidt, Roberts, 1996).

Diferenciace z trofozoita do stádia bičíkovce zahrnuje změny, které se týkají tvaru buněk a samotné syntézy všech organel. Např. u druhu *Naegleria fowleri* tento proces trvá několik hodin, na rozdíl od *Naegleria gruberi*, která tuto transformaci dokončí přibližně po hodině a půl. Ultrastrukturní změny, které probíhají v rámci této přeměny, není možné během prvních minut rozpoznat (Cabral, 1988). Z formy bičíkovce se zpět do stádia trofozoita vrací po uplynutí cca 24 hodin (Ma et al., 1990).

Transformace je zapříčiněna změnou koncentrace iontů. Laboratorně lze této přeměny docílit tak, že se z kultivačního média nebo z infikované mozkové tkáně umístí jejich vzorek do neionizované destilované vody, nebo do slabého solného roztoku, čímž dojde ke změně koncentrace iontů a stadium trofozoita se přetransformuje v bičíkovce (Ma et al., 1990).

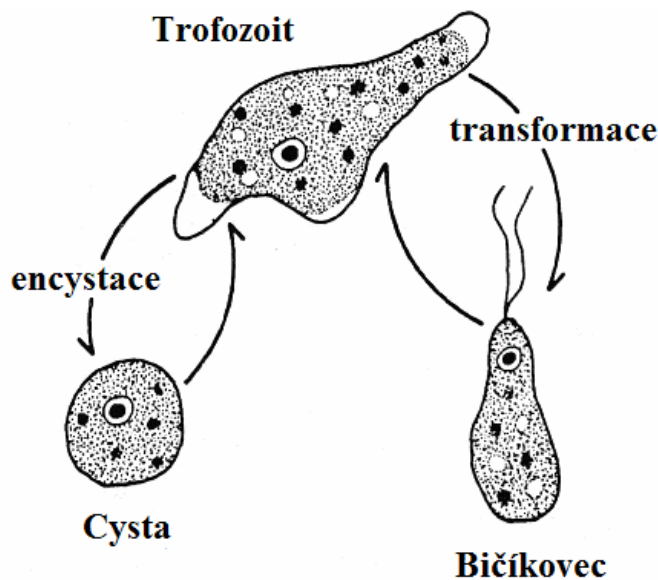
### 1.2.3 Cysta

Do této formy životního cyklu se trofozoity transformují v případě, že nastanou nepříznivé podmínky v jejich okolním prostředí (Visvesvara et al., 2007). Cysty amébám poskytují ochranu před vysoušením a potravní deprivací (Cabral, 1988). Jejich velikost dosahuje obvykle 8 až 20  $\mu\text{m}$  (Trabelsi et al., 2012). Mezi další nepříznivé podmínky, kvůli kterým trofozoity encystují, je stísněnost v prostoru, hromadění odpadních produktů a nízká teplota (Maaty, Hamza, 2012).

Cysty se vyznačují svým kulatým tvarem a jsou ohraničené dvojitou hladkou stěnou. Ta obsahuje dva až tři póry (Ma et al., 1990), které jsou ovšem pod světelným mikroskopem špatně viditelné, protože se nacházejí ve stejné rovině jako stěna cysty (Visvesvara et al., 2007).

Přítomnost cyst v klinickém materiálu není běžná. Je to dáno tím, že infekce probíhá a usmrcuje tak rychle, že infikovaný pacient zemře dříve, než trofozoit stihne encystovat (Ma et al., 1990).

**Obr. 1** Životní cyklus *Naeglerie fowleri*: trofozoit, bičíkovec a cysta



Zdroj: Ma et al., 1990. Modifikováno

#### 1.2.4 Teplotní preference

Mezi základní parametry, které ovlivňují život améb, jako jsou neglerie, patří teplota okolního prostředí. Hodnota příznivých teplot se liší jak mezi druhy nelgerií, tak v rámci stádií životního cyklu.

*Naegleria gruberi* je zástupcem nepatogenních améb tohoto rodu a její optimální teplota růstu se pohybuje mezi 22-35°C. Jiné preference jsou charakteristické pro jediného zástupce neglerií patogenních pro člověka, kterým je *Naegleria fowleri*. Tato améba je teplomilná a její teplotní optimum se pohybuje v rozmezí 40-45 °C. Proto k množení této améby dochází během teplejších měsíců, v rámci kterých dochází k oteplování vod (Ma et al., 1990).

I v rámci samotných stádií životního cyklu existují jiná teplotní optima, charakteristická pro každou z forem. Trofozoit *N. fowleri* je nejvíce termofilní. Pro přechodné stádium bičíkovce je optimální rozmezí teplot mezi 27 až 37 °C. Cysty, které slouží jako ochranná forma, omezující možné poškození způsobené nepříznivými podmínkami, chrání amébu před teplotou klesající pod 10°C (Maaty, Hamza, 2012).

### 1.3 Druhy rodu *Naegleria*

Doposud bylo popsáno více než 30 druhů (tab. 1) rodu *Naegleria* (Visvesvara et al., 2007). Tyto druhy můžeme zařadit do dvou základních skupin. Ty, které jsou patogenní a ty, které jsou charakteru nepatogenního. Všechny druhy, které se řadí mezi patogenní neglerie, jsou teplomilné. Ale ne všechny teplomilné druhy jsou zároveň patogenní. (De Jonckheere, 2002).

K identifikaci nových druhů améboflagelátů rodu *Naegleria* slouží (dle De Jonckheera, viz citované práce u tab. 1) metoda založená na osekvenování části operonu pro ribosomální RNA zahrnující 5,8S molekulu rDNA ohraničenou ITS mezerníky ITS1 a ITS2. O změnách, které se objevují v rámci tohoto úseku u různých druhů neglerií je známo jen málo informací, s výjimkou patogenního druhu jako je *Naegleria fowleri*. I přesto, že tato metoda odhalila jen nepatrné změny sekvence v rámci tohoto patogenního druhu, byl zde prokázán vysoký stupeň polymorfismu délky rDNA. Mezerník ITS2 je u všech kmenů *Naegleria fowleri* totožný. Rozdíly se objevují u mezerníku typu ITS1 (De Jonckheere, 2004).

#### 1.3.1 *Naegleria fowleri* a jiné patogenní druhy

Jediným patogenním druhem, který má schopnost svým působením infikovat člověka, je *Naegleria fowleri*.

V roce 1968 byly poprvé zveřejněny zprávy o izolaci nového, patogenního druhu neglerií odlišného od jiného doposud známého druhu, *N. gruberi*. Izolace byla provedena z mozkomíšního moku v USA a v Austrálii. Tímto novým druhem byla právě dříve zmiňovaná *N. fowleri* a byla pojmenována podle M. Fowlera, který jako první popsal onemocnění, které způsobuje. Toto zařazení a pojmenování druhu se uskutečnilo v roce 1970 v Austrálii a bylo založeno na morfologických rozdílech a patogenitě. Dříve byla označována jako *N. aerobica*, či *N. invadens* (De Jonckheere, 2002).

Studie tohoto druhu prokázaly, že existuje několik typů *N. fowleri*. Rozdíly mezi nimi spočívají především v rozdílné délce ITS1 (De Jonckheere, 2011).

Společně s *N. fowleri* se k patogenním druhům řadí také *N. australiensis* a *N. italica*, které způsobují úmrtí u experimentálních zvířat. Tyto dva druhy nebyly dosud nikdy spojeny s diagnostikovanou infekcí u člověka. Původně se předpokládalo, že patogenních druhů je více, jako např. *N. lovaniensis*, *N. jadini* nebo *N. clarki*. Po provedení testování byly tyto druhy označeny za nepatogenní pro teplokrevné obratlovce (De Jonckheere, 2002).

**Tab 1.** Druhy rodu *Naegleria*

<b>Druh</b>	<b>Izolace</b>	<b>Lokalita</b>	<b>růst (°C)</b>
<i>N. americana</i>	sladká voda	USA, Evropa	není k disp.
<i>N. andersoni</i>	dovoz s rybami	Austrálie, Belgie	40 - 41
<i>N. angularis</i>	voda	Peru	40
<i>N. antarctica</i>	sediment	Antarktida	28
<i>N. arctica</i>	sladká voda	Antarktida	<30
<i>N. australiensis</i>	rybí mozek	Austrálie, celosvětově	42
<i>N. canariensis</i>	vodní nádrž	ostrov Tenerife	37
<i>N. carteri</i>	dovoz s rybami	Austrálie, Srí Lanka	45
<i>N. chilensis</i>	neuveдено	Chile	30
<i>N. clarki</i>	sladká voda	Austrálie	37
<i>N. dobsoni</i>	sladká voda	Austrálie	<35
<i>N. dunnebackei</i>	voda	USA - Kalifornie	<37
<i>N. endoi</i>	sladká voda	Francie	45
<i>N. fowleri1</i>	env. původ	USA	
<i>N. fowleri2</i>	člověk	USA	37
<i>N. fultoni</i>	vodní nádrž	jižní Austrálie	35
<i>N. galecystics</i>	mrtvá tkáň - plaz	jižní Austrálie	35
<i>N. gallica</i>	sladká voda	Francie	37
<i>N. gruberi1</i>	env. původ	Francie	22 - 35
<i>N. indonesiensis</i>	jezero	Mexiko, Bali, Indonézie	38
<i>N. italica</i>	Itálie, Austrálie	lázně, vodní nádrž	42
<i>N. jadini</i>	plavecké bazény	Belgie - Antverpy	35
<i>N. jamiesoni</i>	Belgie, Austrálie	chladící vody (Belgie)	42
<i>N. laresi</i>	sladká voda	Francie	42
<i>N. lovaniensis</i>	holub	celosvětově	45
<i>N. mexicana</i>	sladká voda	Mexiko	není k disp.
<i>N. minor</i>	Austrálie	Austrálie	38
<i>N. neoantarctica</i>	sediment	Antarktida	20 – 24
<i>N. neochilensis</i>	sediment	Antarktida	20 – 24

<i>N. neodobsoni</i>	sediment	Grónsko	30
<i>N. neopolaris</i>	sediment	Norsko - Špicberky	20 - 24
<i>N. pagei</i>	řeka Nil	USA, Egypt, Belgie	37
<i>N. paradobsoni</i>	sediment	Antarktida	20 – 24, 30
<i>N. peruana</i>	voda	Peru	není k disp.
<i>N. philippiensis</i>	CSF pacienta	Filipíny	40
<i>N. polaris</i>	sediment	Norsko - Špicberky	20 – 24
<i>N. pringsheimi</i>	sladká voda	Velká Británie, NZ	37
<i>N. pussardi</i>	říční voda	Francie	41
<i>N. robinsoni</i>	sladká voda	Klokaní ostrov	38
<i>N. schusteri</i>	sladká voda	Japonsko	44
<i>N. spitzbergeniensis</i>	sediment	Norsko - Špicberky	20 – 24, 30
<i>N. tenerifensis</i>	vodní nádrž	ostrov Tenerife	42
<i>N. tihangensis</i>	sladká voda	Belgie, Mexiko	42

---

Zdroje pro vytvoření Tab. 1: databáze GenBank; de Jonckheere, 1993; de Jonckheere, 2002; de Jonckheere, 2004; de Jonckheere, 2006(a); de Jonckheere, 2006(b); Visvesvara et al., 2005.

#### 1.4 Primární amébová meningoencefalitida (PAM)

Nejvýznamnějším druhem améby z celého početného rodu neglerií je již dříve zmiňovaná *Naeglerii fowleri*. Její význam je spjat s její patogenitou, tedy schopností vyvolat u lidí vzácné, ale téměř vždy smrtelné onemocnění mozku a mozkových blan. (Volf, Horák, 2007) Proto je možné jí v literatuře také objevit pod názvem „brain-eating ameba“, v překladu – mozek pojidající améba. Onemocnění, které způsobuje, se nazývá primární amébová meningoencefalitida a jedná se o akutní, rychle probíhající a ve většině případů usmrcující infekci (Burri et al., 2012).

#### **1.4.1 Zdroje infekce a rizikové faktory**

*N. fowleri* řadíme mezi tzv. volně žijící améby, jejichž výskyt v přírodě je hojný, je však vázaný na teplé vody ohřáté jak přirozeně tak uměle. Mezi nejčastější lokality *Naegleria fowleri* patří v tropech a subtropích zejména jezera a rybníky, venkovní koupaliště či zavlažovací kanály, v chladnějších oblastech pak vyhřívané plavecké bazény, akvária, kanalizace, horké prameny nebo chladicí voda elektráren a průmyslových provozů. Různorodost jejího výskytu je však omezena některými podmínkami okolního prostředí, ke kterým vykazuje určitou citlivost. Jedná se především o sucho, extrémní hodnoty pH a slanou vodu, ve které není schopna života (Trabelsi et al., 2012).

Podle statistik z celého světa touto nemocí trpí převážně zdravé děti a mladí dospělí. Rizikovým faktorem pro tuto věkovou skupinu jsou vodní aktivity, které provozují v horkých letních měsících. V rámci těchto aktivit tráví ve vodě poměrně dlouhou dobu a často se do ní ponořují. Zvyšuje se tak pravděpodobnost, kdy může dojít ke kontaktu s amébami (Visvesvara et al., 2007).

#### **1.4.2 Inkubační doba a příznaky**

Období, které počíná kontaktem, v tomto případě s patogenním prvokem, a končí projevem klinických příznaků onemocnění, se nazývá inkubační doba (Ma et al., 1990). U primární amébové meningoencefalitidy je rozpětí této doby individuální. Její délka se průměrně pohybuje mezi 5-7 dny. Některé případy poukazují na to, že se první příznaky nemoci mohou objevit i v rozmezí do 24 hod. od prvotního kontaktu s amébou. Překážkou pro přesné určení inkubační doby a správnou diagnostiku této nemoci je fakt, že klinické projevy nelze primárně jednoznačně odlišit od akutní hnisavé nebo bakteriální meningitidy. Proto je nesmírně důležité, aby ošetřující lékař získal od pacienta informace o jeho kontaktu s potenciálním zdrojem infekce a určil tak přibližnou dobu, kdy k nákaze mohlo dojít (Visvesvara et al., 2007).



Mezi prvotní příznaky nemoci patří náhlé propuknutí bolesti, a to ve spánkové a čelní oblasti hlavy.

Následně dochází ke zvýšení teploty až k hodnotám charakterizujícím vysokou horečku. Projevem napadení infekcí u pacientů je i ztuhnutí šíje. Posléze se začne objevovat nevolnost, zvracení, podráždění a neklid (Maaty, Hamza, 2012). Všechny tyto zmíněné příznaky jsou spojeny se zvýšením nitrolebního tlaku. U pacientů v již nevyléčitelné fázi nemoci je nárůst tlaku velmi výrazný (Ma et al., 1990). Na počátku nemoci může také nastat změna ve vnímání chuti a čichu, která může být zapříčiněna zapojením a poškozením čichového nervu. V pozdější fázi se může objevit světloplachost, po které následují neurologické abnormality zahrnující letargii, křeče, zmatenost, dvojité vidění až po bizarní chování či kóma. Zvýšení hodnot nitrolebního tlaku, dvojité vidění, (Maaty, Hamza, 2012) v některých případech i bolest, která se objevuje při pohybu očí (Ma et al., 1990), souvisí s otokem mozku či jeho herniací. V závislosti na těchto změnách dochází k paralýze (těžký stupeň ochrnutí) hlavových nervů. Konkrétně se jedná o III., IV. a VI nerv (Maaty, Hamza, 2012).

V poslední fázi nemoci dochází u pacientů k abnormálnímu držení těla, přičemž se jedná o špatné znamení, které poukazuje na velmi vážné poškození mozku (Ma et al., 1990). V některých případech se objevují i takové příznaky, které jsou spojené s poškozením srdeční tkáně a poruchou srdečního rytmu (Maaty, Hamza, 2012).

Primární amébová meningoencefalitida končí ve většině případů smrtí nakaženého. Dochází k ní nejčastěji týden po projevení prvních příznaků. Příčinou smrti je obvykle kardiopulmonální zástava a plicní edém (Ma et al., 1990).

### **1.4.3 Mechanismus vniknutí**

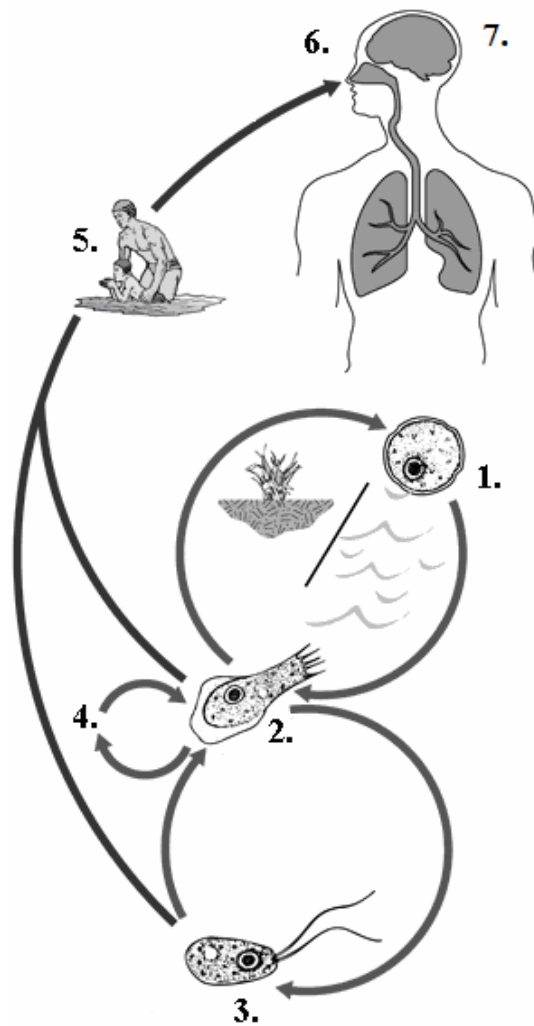
Zdrojem infekce je voda různého charakteru, jak již bylo zmíněno v podkapitole týkající se zdrojů infekce a rizikových faktorů. Dlouhým pobytem a potápěním se

v těchto vodách, se zvyšuje pravděpodobnost nákazy. Jelikož *N. fowleri* vstupuje do těla, konkrétně do CNS, přes dutinu nosní.

Měňavkovitá stádia, tedy trofozoity, pronikají do čichové sliznice, následně migrují podél čichového nervu přes lebeční kost a dostávají se tak přímo do mozku (Volf, Horák, 2007). Čichová sliznice je tvořena tzv. neuroepitelem, který je tvořen specializovanými buňkami schopnými přijímat čichové podněty z vnějšího okolí (Visvervasa et al., 2007). Tento epitel je považován za cestu invaze neglérií (Ma et al., 1990).

Počátečními cíly amébové infekce jsou laloky čelní a čichové, je tomu tak proto, že se nacházejí nejbližší oblasti vstupu trofozoitů do CNS. Mozkovou tkáň poškozují mechanismem fagocytózy a lyzováním, při kterém dochází ke vzniku lézí. Léze se nejčastěji objevují v čelním laloku, hypotalamu, středním mozku, na bázi lebeční, v okolí Warollova mostu, dále také v prodloužené míše a v horní části míchy samotné. V těchto oblastech dochází k intenzivní zánětlivé reakci, která je spojená s nekrotickým krvácejícím poškozením mozkové tkáně, kolem které se vytváří a usazuje hnisavý exudát. Ke krvácení dochází také v povrchové části kůry mozkové (Trabelsi et al., 2012).

**Obr. 2** Mechanismus vniknutí *N. fowleri* do lidského organismu.



1. cysta
2. trofozoit
3. bičíkovec
4. promitóza
5. nákaza přes nosní dutinu probíhající při vodních aktivitách
6. améba procházející sliznicí nosu
7. améba prochází do mozku přes čichový nerv a způsobuje onemocnění PAM

Zdroj: CDC <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

#### 1.4.4 Diagnóza a detekce

Mezi prvotní a základní laboratorní vyšetření při podezření na PAM patří rozbor mozkomíšního moku (CSF) potenciálních pacientů (Trabelsi et al., 2012). Lékařský zákrok, při kterém dochází k jeho odběru, se nazývá lumbální punkce. Mok se získává pomocí duté jehly z páteřního kanálu v oblasti bederní míchy (Kala, Mareš, 2008). K vyšetření čerstvě získaného moku by mělo dojít co nejrychleji po jeho odebrání (Trabelsi et al., 2012). Pro uchování kvality vzorku je důležité, aby byl chráněn před případným chladem či mrazem (Ma et al., 1990).

Prvním parametrem, který se u CSF hodnotí, je vzhled. Ten je podobný jako u akutních bakteriálních meningitid. Barva se pohybuje od šedavé k nažloutlé, v pokročilých stádiích nemoci je zbarvení až červené, to je způsobené přítomností erytrocytů. Přítomnost a koncentrace červených krvinek odpovídá stupni nekrózy a zánětu probíhajícím v mozkové tkáni (Maaty, Hamza, 2012).

Jiné vyšetření, které pacient s podezřením na toto onemocnění podstupuje, je počítačová tomografie, neboli CT. Při snímání se objevuje nespecifický otok mozku, se současným zvýšením intrakraniálního tlaku či mozkovou hernií (Maaty, Hamza, 2012). CT též může ukázat vyhlazení v prostorách okolo středního mozku a v subarachnodiálním prostoru, který se nachází okolo mozkových hemisfér. Ke zvýraznění těchto oblastí se intravenózně aplikuje kontrastní látka (Trabelsi et al., 2012).

I přes pozitivní nálezy u obou výše zmiňovaných vyšetření nemůže dojít k uzavření této diagnózy. Aby došlo k jejímu potvrzení a následnému podání léků, musí být trofozoity izolovány z SCF nebo z mozkové tkáně.

Nejdůležitějším parametrem k potvrzení diagnózy, je prokázat přítomnost aktivně se pohybujících améb, konkrétně trofozoitů. K tomu se využívá mikroskopického vyšetření (Maaty, Hamza, 2012.)

K rychlému potvrzení či vyvrácení diagnózy se používá tzv. nativní preparát. Mozkomíšní mok se centrifuguje při nízké rychlosti, aby nedošlo k poničení trofozoitů. Vzniklá usazenina se přenese na sklíčko a přikryje sklíčkem krycím. K tomuto vyšetření je nejlépe využít mikroskopu, který má v sobě zabudovanou optiku pro zobrazování pomocí fázového kontrastu. Možné je i využít optického mikroskopu se sníženým osvětlením. Při této mikroskopické metodě je možné pozorovat pohybující se trofozoity (Ma et al., 1990).

Jinou metodou, pomocí které lze trofozoity detekovat v mozkomíšním moku, je postup, ve kterém se preparát barví dle Giemsky, nebo jeho modifikace dle Wrighta. Trichrom dle Massona patří mezi tzv. diferenciální barvení, při kterém cysty zůstanou zelené, cytoplazma se barví do fialova až zelena, karyosom je po obarvení označen červenou barvou. Jedná se o velmi rychlou metodu, která trvá přibližně čtvrt hodiny (Ma et al., 1990). Tyto metody barvení a vyšetření CSF se využívají u diagnostiky žijících pacientů, u kterých vyvstalo podezření na PAM. Ve většině případů se však tato infekce detekuje až po smrti infikovaných pomocí biopsie nebo pitvy (Maaty, Hamza, 2012). Při pitvě se ukazuje u všech případů stejný obraz purulentní meningoencefalitidy. Mozkové pleny jsou masivně infiltrovány leukocyty a lymfocyty. Mozek a mícha jsou oteklé, tvrdé pleny jsou napjaté a měkké pleny mozku a zároveň i míchy jsou prosáklé zelenavým hnisem. CSF nacházející se v komorách mozku je lehce zakalený. V mozkové kůře, do které pronikají améby perivaskulárními prostory vytváří větší či menší granulomy a abscesy, které jsou vyplněné samotnými amébami (Jírovec, 1977).

Postupy využívané k barvení histologických řezů mozkové tkáně nejsou k diagnostice tohoto onemocnění vhodné. Řezy tkáně se barví pomocí hematoxylinu a

eosinu. V rámci této infekce však barvení neumožňuje rozlišení neglerií od makrofágů. K potvrzení nálezu améb objevených při pitvě je nutná jejich kultivace nebo zvláštní barvení, u kterého se využívá nepřímé fluorescence. Ke kultivaci améb jsou k dispozici dva typy kultur. Monoxenická kultura, která obsahuje jeden známý druh bakterie. V tomto případě se jedná o bakterii *Escherichia. coli* nebo *Enterobacter*. Tyto kultury se využívají v klinických laboratořích. Druhým typem je tzv. beznutriční agar. Toto médium, je potažené předpěstovanými bakteriemi (Ma et al., 1990).

Imunodiagnóza též patří mezi typ metod, které lze využít k prokázání PAM. V rámci vyšetření se stanovují protilátky, které jsou detekovatelné v séru pacienta. (Ma et al., 1990). Konkrétně se jedná o imunologickou metodu ELISA, která pracuje na principu monoklonální protilátky. Ta je schopná rozpoznat glykosylovaný epitop přítomný na proteinech *N. fowleri* (Maaty, Hamza, 2012). Užitečnost těchto testů je ovšem minimální, protože ve většině případů dojde dříve ke smrti infikovaného, než k samotné produkci protilátek (Ma et al., 1990).

V posledních letech došlo k vyvinutí molekulárních technik, mezi které patří polymerázová řetězová reakce (PCR) a její varianty. Tyto metody se využívají pro detekci *N. fowleri* v oblasti životního prostředí a pro stanovení diagnózy z klinických vzorků. Nově vyvinutá real-time multiplex PCR umožňuje detekci DNA *N. fowleri* v mozkomíšním moku a v mozkové tkáni (Maaty, Hamza, 2012).

PCR je molekulární metoda, kterou v roce 1983 objevil Kary Mullis (Bartlett et al., 2003). Je založená na replikaci nukleových kyselin, přičemž se jedná o základní proces, který probíhá ve všech živých organismech. V rámci této reakce dochází k cyklicky se opakující enzymatické syntéze, při které vznikají nové řetězce.

Při použití této metody dochází v závislosti na teplotě reakční směsi ke střídání tří kroků, během kterých probíhají tři odlišné děje. První krok cyklu zahrnuje denaturaci (rozpojení) dvouřetězových molekul DNA a to při teplotě 94 °C. V druhém kroku, který

probíhá za teploty, pohybující se v rozpětí mezi 30-65°C dochází k připojení primerů k odděleným řetězcům. V třetím, tedy konečném kroku cyklu nastává samotná syntéza nových řetězců DNA, prostřednictvím DNA-polymerázy. Teplotní rozpětí této fáze činí 65-75°C. Přístroj, který metodu PCR uskutečňuje, se nazývá termocykler. Automaticky mění teplotu v naprogramovaných časových intervalech. Opakováním tohoto procesu se exponenciálně vytváří až miliarda kopií vybraného úseku cílové molekuly. Metodu lze označit za způsob, při kterém dochází ke klonování DNA.

Na PCR navazuje metoda, která se nazývá gelová elektroforéza (ELFO). Neuskutečňuje se přímo v roztoku, ale ve vhodném nosiči. Jak už název říká, nosičem pro nejčastější typ ELFO je gel různého charakteru. Pro izolaci a následnou analýzu NK se nejčastěji používá gel tvořený polyakrylamidem nebo agarózou. Velikost molekuly DNA (jejího fragmentu) o neznámé velikosti lze stanovit srovnáním elektroforetické pohyblivosti a pohyblivostí u molekul nebo fragmentů DNA o známé velikosti. Tyto molekuly nebo fragmenty o známé velikosti se nazývají hmotnostní standardy. Molekuly DNA se zviditelňují obarvením, nejčastěji se používá ethidiumbromid. Barvivo se vmezeřuje mezi sousední páry bazí v DNA a vytváří s ní komplex, který po osvětlení UV světlem červeně fluoreskuje. Molekuly DNA o stejné velikosti jsou následně na gelu patrné jako proužky. Intenzita těchto výsledných proužků je přímo úměrná koncentraci nukleové kyseliny.

Poslední fází, která nastává po PCR a ELFO, je samotné stanovení sekvence DNA. Cílem této metody je stanovení primární struktury – tedy pořadí nukleotidů v molekulách DNA. Získání této informace o určitém úseku molekuly DNA má klíčovou roli v analýze genomů. V současné době se využívají pro osekvenování dvě rozdílné metody, jedna pracuje na chemickém a druhá na enzymatickém principu. V druhém případě se k získání sekvence využívá DNA, která má být osekvenována jako matrice pro syntézu komplementárních řetězců různé délky prostřednictvím DNA-polymerázy. (Šmarda, 2005)

#### 1.4.5 Léčba

Po potvrzení diagnózy PAM se musí v co nejkratším časovém úseku zahájit léčba. Zatím se za nejúčinnější léčivo považuje amfotericin B (Trabelsi et al., 2012), přičemž jiné ze studií poukazují na jeho závažné nežádoucí účinky (Debnath et al., 2012) Jedná se o polyenové antimykotické antibiotikum (Trabelsi et al., 2012). Aplikace amfotericinu B se provádí intravenózně (do žíly) a zároveň intratekálně (do páteřního kanálu) (Visvesvara et al., 2007). Intravenózně se do žíly podává 1 mg na 1 kg váhy pacienta denně (Jírovec, 1977). Zároveň se tato léčba doplňuje podáváním Miconazalu, který se aplikuje stejným způsobem jako amfotericin B. Celá tato léčba je doplněna o orální podání Rifampicinu (Visvesvara et al., 2007).

#### 1.4.6 Prevence

Stanovení a správné udržování preventivních nároků je velmi obtížné, protože *N. fowleri* je schopná odolávat desinfekčním prostředkům. Běžné prostředky určené k desinfekci usmrcují v experimentálních podmínkách spolehlivě pouze vegetativní stádia améb. Co se týče plaveckých bazénů, jsou předepsané koncentrace chloru a jiných činidel, které by měly améby zlikvidovat, málo účinné. Je to dáno tím, že se améby pomnožují v místech, kam desinfekce špatně proniká, jako v nárostech na stěnách, na dně bazénu a v rámci celého recirkulačního systému, zvláště k růstu dochází v pískových filtrech. Prevencí pro tato veřejná zařízení je odstraňování vzniklých nánosů a vypírání filtrů. V rámci prevence, která se týká přírodních koupališť a potencionálních zdrojů infekce, je v horkých letních měsících, ve kterých dochází k ohřívání vody, se vyvarovat dlouhodobému pobytu ve vodě a omezit, či úplně zamezit potápění se (Jírovec, 1977).



### 1.4.7 Epidemiologie

Na základě dřívějších studií byla nákaza PAM považována za vzácnou, ale počet hlášených případů se každým rokem zvyšuje (Heggie, 2010)

Dle údajů a zaznamenaných případů z celého světa bylo prokázáno, že touto infekcí bylo doposud nakaženo přibližně 310 lidí. Úmrtnost v rámci těchto hlášených případů činila 95%. V posledních letech došlo k nárůstu počtu případů. Příčinou může být fakt, že došlo k vzrůstu povědomí o tomto onemocnění a také z důvodu toho, že neustále dochází k vývinu rychlejších, více citlivých a specifických diagnostických testů jako např. PCR (Maaty, Hamza, 2012).

Doposud největší epidemie se odehrála v rámci České Republiky. Objevené případy pocházely z jednoho zdroje – uměle přehřívajícího plaveckého bazénu (Ryšavý a kol., 1989) v Ústí nad Labem. Epidemie proběhla od roku 1963-1965 a zemřelo při ní celkem 16 dětí a mladých lidí (Volf, Horák, 2007).

## 2 Cíle práce a hypotézy

### 2.1 Cíle práce

1. Izolace DNA z vybraných kmenů améb rodu *Naegleria*.
2. Použití metody PCR reakcí pro amplifikaci a následnou sekvenci ITS oblasti rDNA operonu a dalších molekulárních márků.
3. Provedení závěrečné fylogenetické analýzy získaných výsledků a jejich následná interpretace.

### 2.2 Hypotézy

**H1:** diverzita neglerií je již dobře prozkoumaná a sbírkové neglerie izolované z různých prostředí lze tudíž pomocí molekulární analýzy zařadit do již známých druhů

**H2:** diverzita neglerií je dosud podchycená nedostatečně a molekulární analýzy proto odhalí mezi sbírkovými negleriemi izoláty patřící do dosud nepopsaných druhů

**H3:** na jedné lokalitě převládne vždy dominantní druh neglerií a izoláty ze stejné lokality tak mají stejné druhové zařazení

**H4:** na jedné lokalitě žijí vedle sebe různé druhy neglerií

## 3 Materiál a metodika

### 3.1 Charakteristika sledovaného souboru

Materiál a vzorky pro vytvoření experimentální části této práce byly poskytnuty Parazitologickým ústavem AV ČR v Českých Budějovicích.

Soubor použitých vzorků lze rozdělit do dvou skupin. První skupinu zahrnují ty vzorky, které doposud nebyly identifikovány ani molekulárně charakterizovány a byly uloženy v prostorách Parazitologického ústavu AV ČR (tab. 1). Tato první skupina se skládá z 10 vzorků. Kultury těchto neglerií byly zamraženy ve speciálních nádobách obsahujících tekutý dusík. Po zahájení mé práce byly vymraženy a sklizeny pro izolaci DNA.

Druhou část materiálu tvoří vzorky, které již byly pracovníky ústavu částečně zpracovány (včetně získání molekulárních dat), nebyly však zatím zahrnuty do podrobnější fylogenetické analýzy (tab. 2). Skupina tohoto charakteru je zastoupena 16 vzorky.

Během fylogenetických analýz byly využity další, již publikované sekvence získané jinými autory. Tyto sekvence pocházejí z databáze GenBank, která obsahuje také informace o tom, kde byl daný druh izolován, v jakém roce, kdo ho izoloval atd. Dále obsahuje informace o sekvencích, které jsou rozdílné a charakteristické pro každý druh rodu *Naegleria*. Celkem byly použity z databáze informace o 43 druzích rodu *Naegleria* včetně jejich molekulárních dat.

**Tab 2.** Skupina č. 1 zahrnující mnou zpracované vzorky.

Název	Voda	Původ	Lokalizace	Lokalita	Prim. izolace
PD53	sladká	pstruh duhový	žábry	B. nad Č.*	16. 4. 1998
PD55	sladká	pstruh duhový	žábry	B. nad Č.	16. 4. 1998
PD56	sladká	pstruh duhový	žábry	B. nad Č.	16. 4. 1998
PD57	sladká	pstruh duhový	žábry	B. nad Č.	16. 4. 1998
PD61	sladká	pstruh duhový	žábry	B. nad Č.	23. 4. 1998
PD62	sladká	pstruh duhový	žábry	B. nad Č.	23. 4. 1998
SIV83Z	sladká	siven americký	žábry	B. nad Č.	24. 4. 1998
1385	sladká	škeble		Horusický r.	20. 11. 2011
HORRA	sladká	rybník, mělká voda		Nové Vráto	20. 9. 2013
HORRB	sladká	rybník, mělká voda		Nové Vráto	20. 9. 2013

\*B. nad Č – Benešov nad Černou

**Tab 3.** Skupina č. 2 zahrnující vzorky částečně zpracované AV ČR.

Název	Voda	Původ	Lokalizace	Lokalita	Prim. izol.
2HZ	sladká	hořavka duhová	žábry	Lanžhotské tůně	14. 5. 1998
3HZ	sladká	hořavka duhová	žábry	Lanžhotské tůně	15. 5. 1998
4HZ	sladká	hořavka duhová	žábry	Lanžhotské tůně	16. 5. 1998
4542	sladká	okoun říční	játra	Černovický potok	20. 2. 1991
62K4	sladká	kapr obecný	žábry	Spolský potok	1991
6HFKL	sladká	pakeříčkovec dvoupásý	ledviny	import	2004
6HZV	sladká	hořavka duhová	žábry	Lanžhotské tůně	14. 5. 1998
ALM1A	sladká	sediment ve stružce		Tenerife	2010
BCHV5	sladká	širokohlavec nautský	játra	Amazonka	5. 2. 1999
GERK	sladká	pstruh duhový	žábry	Německo	18. 6. 2008
GG1BV	sladká	karas obecný	mozek	místní chov	6. 6. 2009
GG4BV	sladká	karas obecný	mozek	místní chov	5. 6. 2009
J14Z	sladká	ježdík obecný	žábry	Novohakl. r.	13. 2. 2000
K4482J	sladká	kapr obecný	játra	Vodňany	1990
MSED4	sladká	sediment z akvária		ČB (zverimex)	17. 10. 2010
TMR	sladká	plotice obecná	žábry	Lužnice	23. 6. 2010

## **3.2 Metodika**

### **3.2.1 Mikroskopické pozorování**

Za pomoci mikroskopu s označením Olympus BX51, vybaveného Normanského kontrastem a kamery Olympus DP70 bylo možné pozorovat a následně zdokumentovat améby ve všech třech stádiích jejich životního cyklu.

K pozorování stádia trofozoita, bylo zapotřebí stejné přípravy a pomůcek jako při následné izolaci mol. DNA. Tedy za pomoci sterilní skleněné „hokejky“ byly namnožené trofozoity setřeny z povrchu agarové plotny, zvlhčené Pageovým médiem (Kalinina a Page, 1992), centrifugou stočeny (400 g) a znovu propláchnuty médiem.

U druhého stádia – bičíkovce, bylo zapotřebí ponechat trofozoity v Pageově roztoku delší dobu.

Pozorování cyst nepotřebovalo žádnou přípravu, protože k zacystování docházelo již během samotné kultivace – cysty byly přimíšeny k trofozoitům.

### **3.2.2 Izolace DNA**

K provedení izolace DNA bylo zapotřebí následujících laboratorních pomůcek:

- pinzety, sterilní skleněné „hokejky“, centrifugační zkumavky, pipety, Pageovo medium
- centrifuga Univerzal 32R.
- Genomic DNA mini Kit (firma)

Za pomoci sterilní skleněné „hokejky“ byly namnožené trofozoity setřeny z povrchu agarové plotny, kterou jsem zvlhčila Pageovým médiem (Kalinina a Page, 1992), následně centrifugou stočeny při nízkých otáčkách a opět propláchnuty výše zmiňovaným médiem. Samotnou izolaci jsem provedla pomocí Genomic DNA mini Kit, postupovala jsem dle pokynů výrobce (Geneaid).

### 3.2.3 Amplifikace SSU rDNA

Metoda, kterou jsem k amplifikaci SSU rDNA využívala, se nazývá PCR.

Zapotřebí byly tyto laboratorní pomůcky a přístroje:

- pipety, zkumavky – (Eppendorf)
- termocykler T-personal (Biometra).

Použité chemikálie:

- PCR pufr
- dNTP
- primer erib 1 (forward) 5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAG-3' (Bárta et al., 1997),
- primer erib 10 (reverse) 5'-CTTCCGCTGGTTCACCTACGG-3' (Bárta et al., 1997),
- Taq polymeráza.

**Tab 4.** Složení reakční směsi pro amplifikaci SSU rDNA.

<b>Reakční směs - master mix</b>	
Deonizovaná voda	16,5 $\mu$ l
pufr	2,5 $\mu$ l
dNTP	2 $\mu$ l
primer erib - 1	1 $\mu$ l
primer erib - 10	1 $\mu$ l
Taq polymeráza	1 $\mu$ l
DNA	1 $\mu$ l

**Tab 5.** Parametry termocyklieru.

	<b>Teplota °C</b>	<b>Počet opakování</b>	<b>Čas</b>
1. krok	95	1x	4 minuty
2. krok	95	34x	50 sekund
3. krok	Annealingová teplota		50 sekund
4. krok	72		2 minuty
5. krok	72	1x	10 minut

Parametry termocyklieru jsem nastavila na 34 cyklů. Z toho vyplývá, že po kroku č. 4 se proces opět vrátí na krok č. 2. Toto vrácení termocyklier provede 34 – krát. Annealingová teplota nastavená pro krok č. 3 činila 55 °C.

### 3.2.4 Sekvence ITS

ITS region, který se skládá z úseků ITS1, 5,8S a ITS2, je součástí jaderné ribozomální DNA. Jedná se o důležitý marker ve fylogenetických analýzách (Blattner FR, 1999). Využívá se jako diagnostický nástroj pro identifikaci druhů rodu *Naegleria* (De Jonckheere, 1998).

Laboratorní pomůcky a přístroje jsou shodné jako u amplifikace SSU rDNA, rozdíl je v chemikáliích, konkrétně v použitých primerech, dále v množství použité DNA a parametrech termocyklieru.

Primery:

- primer G-FOR (forward) 5'-GGGATCCGTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3' (Coleman and Vacquier, 2002),
- primer G-REV (reverse) 5'-GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3' (Coleman and Vacquier, 2002).

**Tab 6.** Složení reakční směsi pro ITS sekvenci.

<b>Reakční směs - master mix</b>	
Deonizovaná voda	15,5 µl
pufr	2,5 µl
dNTP	2 µl
primer G-FOR	1 µl
primer G-REV	1 µl
Taq polymeráza	1 µl
DNA	2 µl

**Tab 7.** Parametry termocyklu.

	<b>Teplota °C</b>	<b>Počet opakování</b>	<b>Čas</b>
1. krok	95	1x	4 minuty
2. krok	95	32x	50 sekund
3. krok	Annealingová teplota		50 sekund
4. krok	72		2 minuty
5. krok	72	1x	10 minut

Počet probíhajících cyklů byl 32. Po kroku č. 4 se proces opět vrátil na krok č. 2. Toto vrácení termocyklu provedl, dle počtu zvolených cyklů 32-krát. Annealingovou teplotu pro krok č. 3 jsem zvolila nižší, činila 46°C.

### 3.2.5 ELFO

Pro elektroforézu, jako další krok postupu navazujícího na obě předchozích metody, bylo zapotřebí těchto laboratorních pomůcek a chemikálií.



Lab. pomůcky:

- pipety, laboratorní váhy, mikrovlnná trouba, laboratorní sklo – Erlenmayerova baňka, soustava pro ELFO.

Použité chemikálie:

- agaróza,
- TAE pufr,
- ethidium bromid (po ozáření UV světlem umožňuje zviditelnění mol. DNA).

Návod na přípravu gelu:

- dle množství zpracovávaného materiálu jsem pro přípravu 1% roztoku navázila 0,45g (0,60g) agarózy,
- k agaróze jsem přilila 45ml (60ml) TAE pufru,
- roztok jsem nechala rozpustit v mikrovlnné troubě,
- pod proudem studené vody jsem nechala směs zchladit,
- přidala jsem 2,5 $\mu$ l (3,5 $\mu$ l) ethidium bromidu,
- po promíchání jsem roztok nalila do připravené ELFO soupravy,
- po ztuhnutí gelu (cca 0,5 hod.) jsem aplikovala PCR produkt, zapojila zdroj nastavený na 80V a spustila samotný proces elektroforézy.

Za pomoci UV lampy jsem prohlédla separované fragmenty DNA améb, které jsem touto metodou získala. Fragmenty, které svou délkou odpovídaly, jsem vyřezávala z gelu za pomoci skalpelu a připravila je tak, pro následnou extrakci.

### **3.2.6 Extrakce DNA z gelu**

Vyřezané fragmenty DNA jsem dále zpracovávala dle návodu výrobce (Geneaid) patřící k extrakční soupravě, která se nazývá Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit.

Cílem extrakce bylo rozpuštění agarózy a přečištění fragmentů od gelu a tím získání DNA vhodné pro odeslání na sekvenaci.

### 3.2.7 Sekvenace

Sekvenace DNA se v laboratoři rybí protistologie neuskutečňuje. Vzorky se zasílají firmě Seqme. Firma reakce uskutečňuje pomocí sekvenačních kitů BigDye Terminator (společnost Applied Biosystems) (<https://www.seqme.eu/sequencing-service/information>). Tyto vzorky se odesílají ve formě PCR produktu s přidáním vhodného sekvenčního primeru. Výsledné sekvence jsou doručovány elektronicky řádově do týdne.

### 3.2.8 Sekvenční data a jejich zpracování

Po doručení sekvencí firmou Seqme bylo nutné ověřit, zdali se skutečně jedná o fragmenty genu SSU rDNA či ITS *neglerie*. Pro ověření jsem využila službu BLAST, kterou poskytuje server NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Výsledky služby poskytly první část námi potřebné informace a to, jestli se jedná o améby rodu *Naegleria*. Za pomoci této služby jsem následně ověřila i sekvence ITS, díky nimž jsem získala informace o tom, jaké konkrétní druhy náleží zkoumaným fragmentům DNA. Při dalším zpracování už jsem pracovala jen se sekvencemi ITS.

Následující krok zahrnoval tvorbu datasetu. Kromě mnou získaných sekvencí byly do datasetu zařazeny referenční zveřejněné sekvence, které jsem vyhledala a stáhla z databáze GenBank, kterou také zprostředkovává server NCBI.

Dataset vytvořený z těchto sekvencí byl následně alignován programem, který se nazývá ClustalX (Larkin et al., 2007) a poté ořezán a zkontrolován za pomoci programu BioEdit (Hall, 1999).

Následným krokem při zpracování dat byla fylogenetická analýza v programu PAUP\* (Swofford, 2003). Pro rekonstrukci evoluce *neglerií*, jsem využila relativně

snadné metody, která se nazývá neighbor joining. Celkem byly provedeny dvě analýzy, ze kterých vznikly dva fylogenetické stromy. V prvním případě byl analyzován dataset, obsahující podstatně více druhů neglerií, kvůli výrazným rozdílům mezi sekvencemi ve variabilních úsecích byl však více ořezán. Druhý analyzovaný dataset byl zaměřen jen na skupiny druhů, mezi něž se zařadily na základě předchozí analýzy naše vzorky; obsahoval méně taxonů, ale sekvence ITS mohly být zachovány kompletní (kromě vhodného zkrácení konců na stejnou startovní resp. koncovou pozici). Konečnou fází, zahrnující prohlížení a zpracování stromů, jsem uskutečnila v programu Tree View (Page, 1996).

## 4 Výsledky

### 4.1 Mikroskopická pozorování

Stádium trofozoita, měňavky a cysty u jednotlivých kmenů améb, které jsem pozorovala, jsem nafotila pomocí mikroskopu se zabudovanou kamerou od značky Olympus. Tyto pořízené fotografie jsou k nahlédnutí v příloze.

### 4.2 Metody PCR a ELFO

Původním záměrem bylo získat k identifikaci neglerií také sekvence SSU rDNA. Vzhledem k neefektivitě tohoto postupu (nespolehlivá PCR s uvedenými primery, náročnost sekvenování kvůli větší délce úseku) i vzhledem ke standardnímu využití ITS při identifikaci druhů v literatuře, bylo od sekvenování SSU rDNA upuštěno. Dále jsem se plně zaměřila na získání ITS sekvencí studovaných kmenů. Výsledky elektroforéz po PCR amplifikaci oblastí ITS, která probíhala za pomoci primerů G-FOR a G-REV, jsou zachyceny na obr. 3 a obr. 4. Je patrné (obr. 3), že některé z výsledných fragmentů (PD 56, SIV83Z a 1385) jsou méně výrazné, i přes jejich slabost byla výsledná sekvence dostatečně kvalitní pro zařazení do fylogenetické analýzy.

**Obr. 3** Fragmenty DNA améb, po ELFO a prosvícení UV lampou. Silnější pruh dole jsou nepotřebované primery. 0 – negativní kontrola.



**Obr. 4** Fragментy DNA u vzorků s označením HORRA, HORRB, PD53 a PD55.



### 4.3 ITS sekvence

Více než polovina mnou získaných sekvencí byla izolována z žaber ryb, konkrétně se jednalo o pstruha duhového (PD): PD53, PD55, PD56, PD57, PD61, PD62.

Jedna ze sekvencí byla izolována též z žaber ryb, ale jiného druhu – sivena amerického: SIV83Z. Tyto ryby pocházely z chovu v Benešově nad Černou.

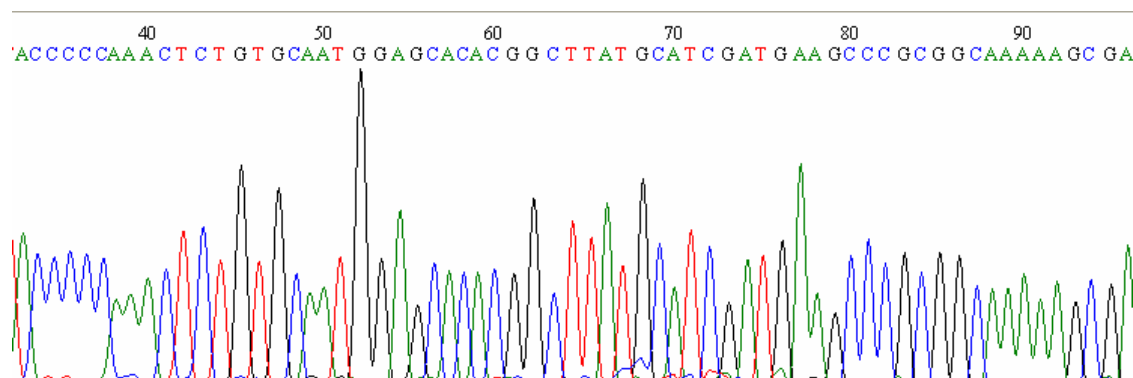
Další sekvence, také úspěšně zařazena do analýzy, byla izolována ze škeble, konkrétně se jednalo o vzorek s označením 1385.

Poslední úspěšně získanou a zařazenou sekvencí byl vzorek s označením HORRA a jako jediný z výčtu vzorků, nepochází z žádných živočichů, ale rybniční vody.

Pomocí metody PCR a elektroforézy byl pro analýzu ITS sekvence připraven vzorek s označením HORRB, který byl na základě předběžné charakterizace považován za zástupce rodu *Naegleria*. Již po prosvícení výsledné elektroforézy bylo patrné, že dle umístění svítícího proužku se kvůli výrazně odlišné délce s největší pravděpodobností o zástupce rodu *Naegleria* nejedná – viz obr. 4. Na základě získané sekvence ITS a po jejím následném otestování pomocí programu BLAST, bylo potvrzeno, že nejde o neglerii: vyhodnocení vzorku ukázalo, že se jedná o zástupce rodu *Vermamoeba* (dříve *Hartmanella vermiformis*).

Obrázek 5 zobrazuje podobu surových sekvenčních dat.

**Obr. 5** Ukázka sekvence zasláné firmou Seqme.



#### 4.4 Fylogenetické analýzy

Obrázek 6 znázorňuje výřez analyzovaných dat v alingmentu. Program, ze kterého je daný výřez vytvořen, se nazývá BioEdit. Alignment byl předtím vytvořen pomocí programu ClustalX.

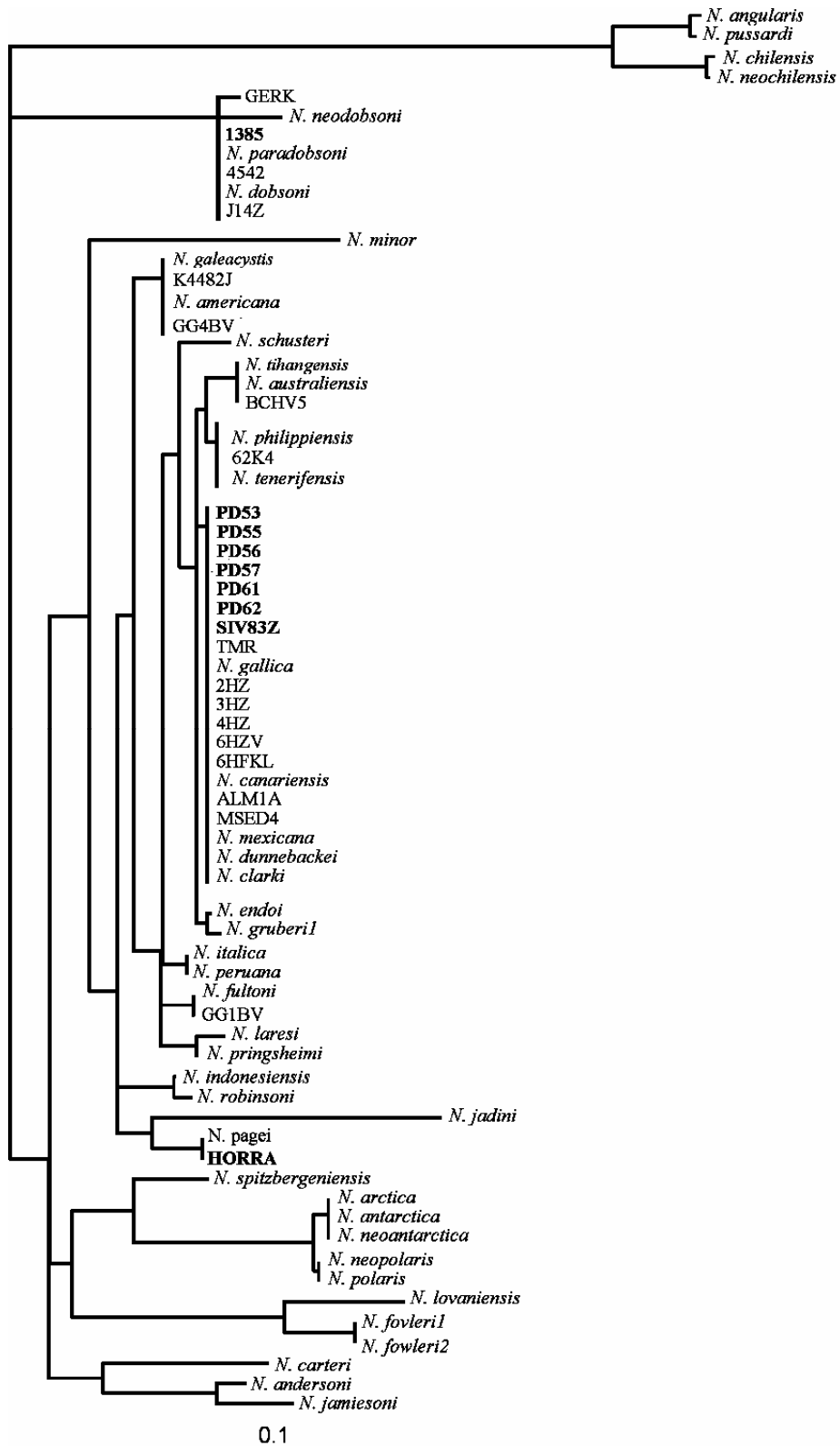
**Obr. 6** Výřez z alingmentu

BCHV5	GATCCTGGTAAAAGGTGTTTGAATCGTTAGGTTCTTACGCCCTAGCCGGTGGAGCCGGATTCTCTGAGAA
Tihangensis	GATCCTGGTAAAAGGTGTTTGAATCGTTAGGTTCTTACGCCCTAGCCGGTGGAGCCGGATTCTCTGAGAA
Australiensis	GATCCTGGTAAAAGGTGTTTGAATCGTTAGGTTCTTACGCCCTAGCCGGTGGAGCCGGATTCTCTGAGAA
Clarki	GATCCTGGTAAAAGGTGTTTGAATCATTAGGTTCTTACGCCCTAGCCGGTGTAGCCGGATTCTCTGAGAA
Philippinensis	GATCCTGGTAAAAGGTGTTTGAATCATTAGGTTCTTACGCCCTAGCCGGTGTAGCCGGATTCTCTGAGAA
Americana	GATCCTGGTAAAAGGTGTTTGAATCGTTAGGTTCTTACGCCCTAGCCGGTGTAGCCGGATTCTCTGAGAA
GG4BV	GATCCTGGTAAAAGGTGTTTGAATCGTTAGGTTCTTACGCCCTAGCCGGTGTAGCCGGATTCTCTGAGAA
K4482J	GATCCTGGTAAAAGGTGTTTGAATCGTTAGGTTCTTACGCCCTAGCCGGTGTAGCCGGATTCTCTGAGAA
Galeacystis	GATCCTGGTAAAAGGTGTTTGAATCATTAGGTTCTTACGCCCTAGCCGGTGTAGCCGGATTCTCTGAGAA
Fultoni	GATCCTGGTAAAAGGTGTTTGAATCATTAGGTTCTTACGCCCTAGCCGGTGTAGCCGGATTCTCTGAGAA
GG1BV	GATCCTGGTAAAAGGTGTTTGAATCATTAGGTTCTTACGCCCTAGCCGGTGTAGCCGGATTCTCTGAGAA
Schusteri	GATCCTGGTAAAAGGTGTTTGAATCATTAGGTTCTTACGCCCTAGCCGGTGTAGCCGGTTTCTCTGAGAA
GERK	GAGCCGATAAAAGGTGTTTAAATCTTTAGGTTATTACGCCCGAGTCGGAGAAAGCCGGTTCTCTGAGAA
Neodobsoni	GAGCCCGATAAAAGGTGTTTAAATCTTTAGGTTATTACGCCCGAGTCGGAGAAAGCCGGTTCTCTGAGAA

Výsledný fylogenetický strom I. (obr. 7), který jsem získala na základě fylogenetické analýzy, zahrnuje celkem 68 ITS sekvencí, jedná o kompletní strom zahrnující všechny analyzované druhy. K vytvoření stromu jsem měla k dispozici mnou získané sekvence ITS, které jsou zvýrazněny tučně. Hotové, avšak nezpracované sekvence poskytnuté lab. rybí protistologie žádné zvýraznění nemají. Sekvence stažené z databáze GenBank – pojmenované podle druhů kterým odpovídají – jsou označeny kurzívou.

Tento strom ukazuje předběžné zařazení analyzovaných vzorků. Kvůli výraznějšímu ořezání alignmentu nelze pomocí něj jednoznačně určit, do kterého druhu přesně analyzované sekvence ITS patří. K tomu byl vytvořen fylogenetický strom II.

Obr. 7 Fylogenetický strom I.





Fylogenetický strom II. (obr. 8) se od I. liší především v počtu analyzovaných sekvencí. Počet sekvencí mnou analyzovaných a poskytnutých laboratoří se nezměnil, došlo ke snížení počtu sekvencí získaných z databáze GenBank. Celkem tento strom obsahuje 44 sekvencí ITS. Označení jednotlivých skupin je totožné jako u stromu I.

Tento strom již poukazuje a odhaluje konkrétní zařazení analyzovaných sekvencí k jejich identickým druhům.

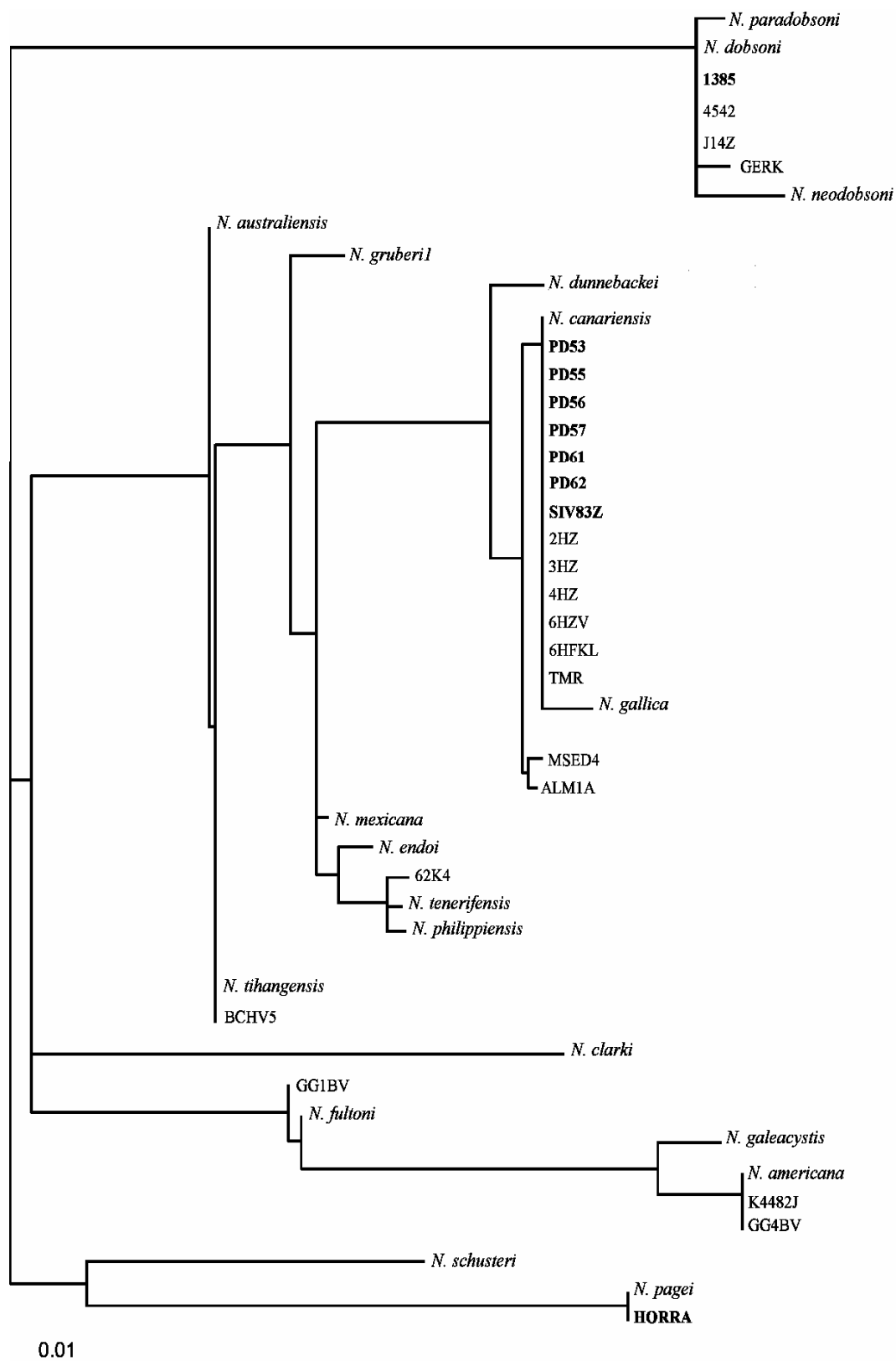
Z výsledného stromu je patrné, že vzorky s označením - 1385, 4542 a J14Z jsou totožné, neboli identické na základě analýzy s druhem *N. dobsoni*. Vzorek s názvem GERK patří do okruhu druhu *N. dobsoni*, ale není s tímto druhem zcela identický.

Největší skupiny vzorků tvoří ty, které jsou identické s druhem *N. canariensis*. Jsou zde zahrnuty tyto ITS sekvence – PD53, PD55, PD56, PD57, PD61, PD62, SIV83Z, 2HZ, 3HZ, 4HZ, 6HZV, 6HFKL a TMR.

Vzorek s označením BCHV5 na základě analýzy odpovídá druhu *N. tihangensis*. Druh *N. americana* má dva identické zástupce a to vzorek K4482J a GG4BV. Sekvence ITS vzorku HORRA odpovídá druhu, který se nazývá *N. pagei*.

Sekvence, konkrétně se jedná o MSED4, ALM1A, 62K4 a GG1BV, nejsou identické s žádným ze známých druhů zahrnutých v této fylogenetické analýze. Na základě této skutečnosti se jedná o unikátní sekvence a z toho vyplývá, že se v podstatě jedná o nové druhy rodu *Naegleria*.

Obr. 8 Fylogenetický strom II.



## 5 Diskuze

Na základě výsledků bych se v této kapitole chtěla věnovat diskuzi témat, která vyplývají z mé práce.

Hlavní téma, o kterém budu diskutovat v této části kapitoly se věnuje stanoveným hypotézám. Celkem byly stanoveny čtyři hypotézy.

Hypotéza s označením H1 měla potvrdit mínění, že pomocí molekulární analýzy bude možné přiřadit zkoumané kmeny na základě identických sekvencí k patřícím druhům a tím potvrdit, že rod *Naegleria* je již dobře prozkoumán. Co se týče jednotlivých identifikovaných druhů, první druh, *N. dobsoni* má tři identické zástupce označené jako 1385, 4542 a J14Z. Každý ze vzorků pochází z jiné lokality v rámci ČR a lze předpokládat, že je u nás poměrně hojný jak v tekoucích tak stojatých vodách. Druhý z identifikovaných druhů, *N. canariensis* má mezi mými vzorky celkem 13 zástupců s identickou sekvencí ITS. Konkrétně se jedná o vzorky označené PD53, PD55, PD56, PD57, PD61, PD62, SIV83Z, 2HZ, 3HZ, 4HZ, 6HZV, 6HFKL a TMR. To je největší počet vzorků – toto vysoké číslo je však dosaženo i díky tomu, že šlo o dominantní druh na nejpodrobněji zkoumaných lokalitách, v Benešově nad Černou a v Lanžhotských tůních. U druhů *N. tihangensis* a *N. pagei* (BCHV5 a HORRA) je obtížné zobecnit charakter jejich rozšíření vzhledem k ojedinělým nálezům.

Přesto se hypotéza H1 nepotvrdila. Sice se u většiny získaných sekvencí zařazení do příslušných identických druhů podařilo, ale zároveň z výsledků lze potvrdit H2, která na druhou stranu měla poukázat na fakt, že mezi sbírkovými izoláty neglerií se objeví ty, které nebude možné na základě nedostatečného prozkoumání zařadit.

Z mé studie vyplývá, že celkem pět výsledných sekvencí může odpovídat úplně novým druhům. Konkrétně se jedná o vzorky: GERK, MSED4, ALM1A, 62K4 a GG1BV, jejichž sekvence je unikátní.

Rozdíly mezi jednotlivými druhy, případně novými druhy jsou spojené se změnou, která se objevuje v ITS1 mezerníku (De Jonckheere, 2004). I přesto, že rozdíly mohou být naprosto minimální – např. vzorek GERK, je ve fylogenetickém stromu II. zařazen

k do okruhu druhu *N. dobsoni*, ale dle jeho postavení je patrné, že s druhem *N. dobsoni* identický není. Na základě své studie odhaduji, že takovýchto nových druhů bude objeveno ještě velké množství. Je otázkou, zda zvolené kritérium, tedy drobné rozdíly v sekvenci ITS, je zvoleno vhodně. Viz též např. práce Dykové et al. (2006) ukazující variabilitu v ITS oblasti v rámci jednoho klonu neglerií.

Hypotéza č. 3 říká, že mezi kmeny izolovanými v rámci jedné lokality bude dominovat vždy jeden druh neglerií (izoláty ze stejné lokality tak mají stejné druhové zařazení). H3 se potvrdila zejména díky studiu izolátů z Benešova nad Černou a Lanžhotských tůň. Všechny izoláty z obou lokalit patří druhu *N. canariensis* – zdá se tedy, že v daných podmínkách se namnoží a následně převládne jeden druh. V případě dvou vzorků izolovaných z okounů pocházejících ze stejného chovu (GG1BV a GG4BV) je však situace odlišná, oba reprezentují odlišný druh.

Po následném srovnání stejných lokalit a výsledného zařazení pozorovaných druhů s jinou studií zabývající se druhy rodu *Naegleria* nemůžeme brát potvrzení H3 za úplné. V laboratoři rybí protistologie byly analyzovány i některé jiné kmeny neglerií izolované ze stejných lokalit, konkrétně z Amazonky, Novohaklovského rybníka a Černovického potoka (Dyková, 2006).

Ve výše zmíněné práci se ukázalo, že izoláty pocházející z Amazonky (BCZ4 a CL) patří dle analýzy ITS do okruhu druhu *N. clarki* narozdíl od mnou studovaného kmene BCHV5 (*N. tihangensis*). Kmeny BCZ4 a BCHV5 byly přitom izolovány ze stejného druhu ryb, ale z různých orgánů (ze žaber resp. z jater). I v případě vzorků z obou zmíněných lokalit v ČR se jednalo o různé druhy neglerií v citované a méj práci. Tato pozorování poněkud oslabují platnost H3 o dominanci jednoho druhu neglerií na jedné lokalitě. Tímto oslabením, lze částečně potvrdit H4 a poukázat na zajímavý fakt, že stejné druhy ryb s největší pravděpodobností kolonizují různé druhy *Naegleria*.

Jiné téma, o kterém bych zde chtěla diskutovat, se týká toho, jak důležité je zevrubné ověřování rodové resp. druhové příslušnosti améb. Během výzkumu jsem při vyhodnocování sekvencí narazila na zjištění, že vzorek HORRB považovaný na základě

předběžné a nedostatečné identifikace pomocí zběžného pozorování v optickém mikroskopu za neglerii, vůbec do rodu *Naegleria* nepatří. Po následné sekvenaci ITS bylo zjištěno, že se jedná o rod *Vermamoeba* (dříve *Hartmanella*). Tato chybná určení nejsou výjimkou ani u zkušených odborníků (Smirnov et al., 2007) a ukazují na význam molekulární identifikace améb.

## 6 Závěr

Cílem práce bylo izolovat a získat sekvence DNA vybraných kmenů améb rodu *Naegleria*. Ke konečné analýze se mi podařilo získat celkem 9 kompletních ITS sekvencí a zároveň jsou do výsledných hypotéz zahrnuty vzorky poskytnuté lab. rybí protistologie – 16 vzorků, celkem tedy 25 ITS sekvencí.

K jejich zpracování, vyhodnocení a konečnému sestavení fylogenetických stromů I. a II. jsem využila služeb databáze a speciálních počítačových programů. Konkrétně se jednalo o službu BLAST v databázi NCBI a programy CLUSTALx a BioEdit. Pro samotnou fylogenetickou analýzu a její následnou interpretaci, jsem využila programy PAUP a TreeView.

Na základě vytvoření stromů I. a II., které obsahují mnou zpracované vzorky, sekvence poskytnuté Laboratoří rybí protistologie a z databáze GenBank, se podařilo sekvence ITS ve většině případů přiřadit k existujícím druhům. V pěti případech nebylo možné vzorky zařadit, protože se s největší pravděpodobností jedná o nové druhy rodu *Naegleria*.

Na základě získaných dat, jsem vyhodnotila stanovené hypotézy. První z hypotéz se nepotvrdila, i když se za pomoci výsledných sekvencí podařilo některé vzorky přiřadit k identickým druhům. Druhá z hypotéz poukazující na objevení se nových druhů na základě nedostatečného prozkoumání se potvrdila, jelikož se ve výsledku objevilo 5 unikátních sekvencí. Třetí z hypotéz se potvrdila i částečně vyvrátila a tím se i částečně potvrdila hypotéza čtvrtá. Z toho vyplývá, že na jedné lokalitě může být dominantní jeden druh, ale také to, že na jedné lokalitě může žít druhů více.

Využitelnost výsledků této práce může spočívat v jejím zařazení do rozsáhlejší výzkumné činnosti, která se zabývá (bude se zabývat) touto tematikou. Může být nápomocna při získávání dalších informací o výskytu améb rodu *Naegleria* na území České Republiky.

## 7 Seznam informačních zdrojů

**Adl SM, Simpson AGB, Lane ChE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Gall LI, Lynn DH, McManus H, Mitchell EAD, Stanridge SEM, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW (2012):** The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Mikrobiology*. 59: 429-514.

**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. *Journal of Parasitology*. 83: 268–271.

**Bartlett JMS, Stirling D (2003):** A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *PCR. Protocols*. 226: 3–6.

**Blattner FR (1999):** Direct amplification of the entire ITS region from poorly preserved plant material using recombinant PCR. *BioTechniques*. 6: 1180-1186.

**Burri DC, Gottstein B, Zumkehr B, Hemphill A, Schrürch N, Wittwer M, Müller N (2012):** Development of high- versus low- pathogenicity model of the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *Microbiology*. 158: 2652-2660.

**Cabral FM (1988):** Biology of *Naegleria* spp. *Microbiological reviews*. 1:114-133.

**Coleman AW, Vaquouier VD (2002):** Exploring the phylogenetic utility of ITS sequences for animals: a test case for abalone (*Haliotis*). *Journal of Molecular Evolution*. 54: 246–257.

**Debnath A, Tunac JB, Gómez SG, Olivares AS, Shibayama M, McKerrow JH** (2012): Corifungin, a New Drug Lead against *Naegleria*, Identified from a High-Throughput Screen. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 11: 5450-5457.

**De Jonckheere JF.** (1993): A group I intron in the SSUrDNA of some *Naegleria* spp. demonstrated by polymerase chain reaction amplification. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2: 179-187.

**De Jonckheere JF** (1998): Sequence variation in the ribosomal internal transcribed spacers including the 5.8S rDNA of *Naegleria* spp. *Protist* 149: 221–228.

**De Jonckheere JF** (2002): A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozoologica* 41: 309–342.

**De Jonckheere JF** (2004): Molecular definition and the ubiquity of species in the genus *Naegleria*. *Protist*. 155: 89–103.

**De Jonckheere JF** (2006) (a): Isolation and molecular identification of free-living amoebae of the genus *Naegleria* from Arctic and sub-Antarctic regions. *European Journal of Protistology*. 42: 115–123.

**De Jonckheere JF** (2006) (b): Isolation and Molecular Identification of Vahlkampfiid Amoebae from an Island (Tenerife, Spain). *Acta Protozoologica*. 45: 91-96.

**De Jonckheere JF** (2011): Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infection, Genetics and Evolution*. 11: 1520–1528.



**Dyková I, Pecková H, Fiala I, Dvořáková H** (2006): Fish-isolated Naegleria strains and their phylogeny inferred from ITS and SSU rDNA sequences. *Folia Parasitologica*. 53: 172-180.

**Hall TA** (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.

**Heggie TW** (2010): Swimming with death: Naegleria fowleri infections in recreational waters. *Travel Medicine and Infectious disease*. 8: 201-206.

**Jírovec O.** (1977) Parazitologie pro lékaře. 3 přeprac. a rozšíř. vyd. Praha: Avicenum.

**Kala M, Mareš J.** (2008) Lumbální punkce a mozkomíšní mok. 1. vyd. Galén, ISBN: 978-80-7262-5680.

**Kalinina LV, Page FC** (1992): Culture and preservation of naked amoebae. *Acta Protozoologica*. 31: 115-126.

**Khan NA, Jaroll EL, Paget TA** (2001): Molecular and Physiological Differentiation Between Pathogenic and Nonpathogenic Acanthamoeba. *Current mikrobiology*. 45: 197–202.

**Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, 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.

**Maaty DAAE, Hamza RS** (2012): Primary Amoebic Meningoencephalitis Caused By *Naegleria fowleri*. *Parasitologist United Journal*. 2: 93-104.

**Page RDM** (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357-358.

**Podstatová H.** (2001) *Mikrobiologie, epidemiologie, hygiena*. Olomouc: Epava. ISBN: 978-80-86297-07-1

**Ryšavý B. a kolektiv.** (1989) *Základy parazitologie*. 1 vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. ISBN: 80-04-20864-9.

**Schmidt GD, Roberts LS.** (1996) *Foundations of parasitology*. 5th ed. Dubuque: Brown. ISBN: 0-697-26071-2

**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.

**Swofford DL** (2003): *PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

**Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V, Kostíková J.** (2005) *Metody molekulární biologie*. Masarykova Univerzita - Brno.

**Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, 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*. Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Immunol Med Microbiol. 50:1-26.

**Volf P, Horák P.** (2007) Paraziti a jejich biologie. 1.vydání. Praha: Triton. ISBN: 978-80-7387-008-9.

## 8 Klíčová slova

*Naegleria fowleri*

Primární amébová meningoencefalitida

Molekulární charakterizace

Sekvence genu SSU rDNA

ITS sekvence

PCR

Key words

*Naegleria fowleri*

Primary amebic meningoencephalitis

Molecular characterization

Gene sequence SSU rDNA

ITS sequence

PCR

## 9 Příloha – fotografie

- všechny fotografie v příloze byly pořízeny při zvětšení mikroskopu: 400x2

Izolát HORRA – zachycení dvou životních stádií a nepohlavního dělení.



trofozoity

měřítka odpovídá vel. 20  $\mu\text{m}$



cysty

měřítka odpovídá vel. 10  $\mu\text{m}$

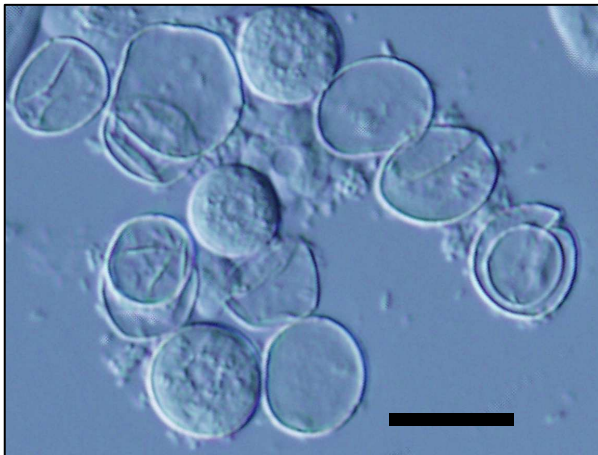


nepohlavní dělení trofozoitů



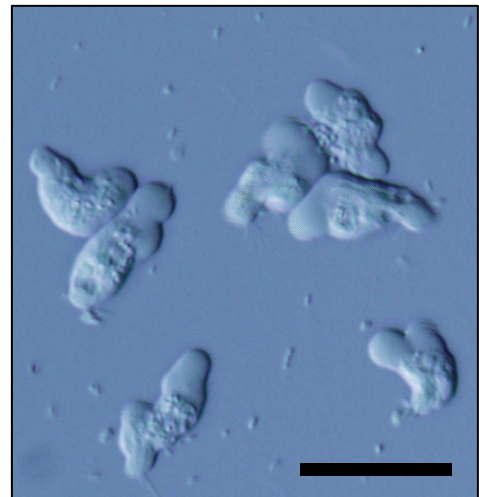
pokročilejší dělení

Izolát PD53 – životní stádium cysty a trofozoita, na obou obrázcích je přítomnost bakterií.



cysty, prázdné obaly po excystaci

měřítka odpovídá vel. 10  $\mu$ m



trofozoity

měřítka odpovídá vel. 20  $\mu$ m

Izolát PD 55 – stádium bičíkovce.

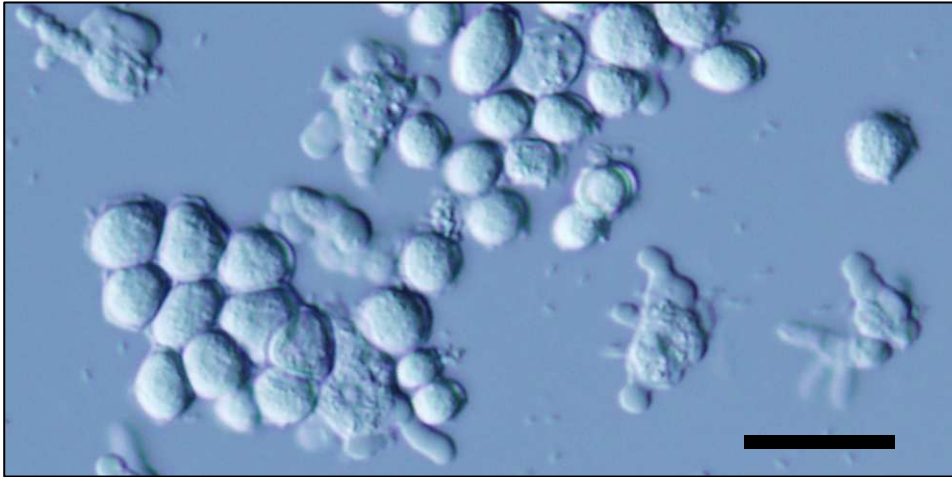


bičíkovec



bičíkovec

Izolát HORRB – odpovídající rodu *Vermamoeba*, odlišný vzhled trofozoitů.



trofozoity a cysty

měřítka odpovídá vel. 20  $\mu\text{m}$