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 s důrazem na potenciální patogeny

Vypracovala: Hana Kaňková

Vedoucí práce: Mgr. Martin Kostka, Ph.D.

České Budějovice 2015

Abstrakt

Jako cíle práce jsem si zvolila: vypracování literární rešerše, která bude zaměřena na volně žijící améby jako patogeny lidí a zvířat, molekulární charakterizaci vybraných sbírkových kmenů améb, kdy získám sekvence genů využívaných jako markery pro tyto organismy (SSU rDNA, ITS). Data získaná sekvenací fylogeneticky analyzovat a výsledky analýz interpretovat.

V teoretické části jsem se zabývala základní morfologií potenciálně patogenních améb (akantaméb a neglérií), jejich patogenitou a krátce i možnostmi léčby jimi způsobených onemocnění (primární amébová meningoencefalitida, granulomatózní amébová meningoencefalitida, amébová keratitida).

Akantaméby i neglérie (*Naegleria fowleri* a různé druhy akantaméb) jsou schopny invadovat lidský organismus, zejména významná je jejich schopnost pronikat do mozku, kde mohou způsobit amébovou meningoencefalitidu (onemocnění CNS).

Primární amébová meningoencefalitida (PAM) je způsobena *N. fowleri*. Onemocnění se vyskytuje hlavně u dětí a mladých dospělých, kteří se koupali (potápěli) v trvale oteplené vodě, v níž tento druh améby nacházíme. Améba vstupuje do těla přes nosní dutinu a podél čichového nervu se dostává do mozku. PAM má rychlý průběh – člověk zpravidla umírá do 7 dní od projevení se prvních příznaků.

Granulomatózní amébová encefalitida (GAE) je způsobena zejména druhy rodu *Acanthamoeba*. Onemocnění je chronického charakteru (probíhá i několik měsíců). Nalézáme ho u imunokompromitovaných lidí (diabetes, HIV/AIDS, drogová závislost apod.) Do těla se akantaméba dostane skrz poranění a do CNS putuje hematogenní cestou.

Dalším onemocněním způsobeným rodem *Acanthamoeba* je amébová keratitida (AK). AK je zánět rohovky. Akantaméba se do oka dostane většinou prostřednictvím nedostatečně sterilizované kontaktní čočky nebo při traumatu rohovky. Léčba chorob způsobených amébami je velmi komplikovaná a ne vždy úspěšná. U PAM je úmrtnost dokonce větší než 95%.

Rozdíly mezi akantamébami a negléríemi se týkají několika oblastí – životního cyklu, velikosti a patogenity. Na rozdíl od neglérií, které jsou schopny vytvořit 3 stádia

(trofozoit, bičíkovec, cysta), akantaméby přecházejí jen mezi dvěma stádii (trofozoit, cysta). Trofozoit akantaméb (12-35 μm) je v porovnání s tím neglériovým (15-25 μm) o něco větší. Nejvýraznější rozdíly jsou vidět na cystách, které jsou u akantaméb nepravidelného tvaru, zatímco u neglérií kulovité a hladké.

V praktické části své práce jsem se pokusila zodpovědět několik otázek, zejména blíže určit, do kterých genotypů resp. druhů patří mnou studované améby izolované dříve v laboratoři rybí protistologie a zjistit bližší údaje o jejich potenciální patogenitě, geografickém rozšíření atp. V metodické části jsem popsala postup kultivace vybraných améb, získávání DNA, průběh PCR, elektroforézu a softwarové zpracování výsledných sekvencí. Pro kultivaci jsem používala klasický nevýživný agar a améby sklízela po jejich vizuální kontrole. Průběh PCR byl standardní s využitím specifických primerů a termocykleru. Výsledný PCR produkt jsem použila pro elektroforézu. Po vyřezání odpovídajících proužků gelu, jsem je odeslala na sekvenaci do specializované firmy (Macrogen). Výsledné sekvence jsem prohlédla a ty s kvalitním signálem zpracovala pomocí programů SeqMan, ClustalX, BioEdit. Pro fylogenetickou analýzu jsem využila programů Paup, RAxML a MrBayes.

Podařilo se mi získat celkem 9 sekvencí genu pro SSU rRNA akantaméb a jednu sekvenci negleriové ITS. Pomocí fylogenetické analýzy jsem získala fylogenetické stromy, které jsem začlenila do kapitoly výsledky.

Na kapitolu výsledky jsem navázala v diskusi, kde jsem se podrobněji věnovala zvolené metodice. Nastínila jsem problém při získávání neglériových sekvencí a navrhla některá řešení. V další části diskuse jsem se věnovala podrobnější analýze fylogenetických stromů. Některé z mnou získaných sekvencí vykazují blízkou příbuznost se sekvencemi odvozenými z akantaméb izolovaných z pacientů s AK z různých oblastí světa, což naznačuje, že rozšíření některých potenciálně nebezpečných linií améb je globální. Neglériové sekvence jsou více omezeny prostředím, ale existují zde i výjimky.

Klíčová slova: *Acanthamoeba, Naegleria*, Primární amébová meningoencefalitida, Granulomatózní amébová encefalitida, PCR

Abstract

Goals of my work are: preparation of literature review, which will focus on free living amoebas as pathogens of humans and animals, molecular characterization of selected collection strains of amoebas: obtaining sequences of genes used as markers for these organisms (SSU rDNA, ITS). Data got by sequencing will be phylogenetically analyzed and results of analyzes interpreted.

In the theoretical part I described the basic morphology of potentially pathogenic amoebas (acantamoebas, naegleriae), their pathogenicity and briefly also treatment of these diseases (primary amebic meningoencephalitis, granulomatous amebic encephalitis, acanthamoeba keratitis).

Acanthamoebas and naeglerias (*Naegleria fowleri* and various species of acanthamoebas) are capable of entering human organism. Especially important is their ability to penetrate into brain, where they can be cause of amebic meningoencephalitis (disease of CNS).

Primary amebic meningoencephalitis (PAM) is caused by *N. fowleri*. The diaseas occurs in children and young adults, who bathed in a permanently warmed water, where this species is found. Amoeba enter the body through the nasal cavity and travels along the olfactory nerve to brain. PAM has rapid course – human die within 7 days from first symptoms.

Granulomatous amebic encephalitis (GAE) is caused by *Acanthamoeba* spp. The disease has a chronic character (its duration is up to several months). It is found in immunocompromised people (diabetes, HIV/AIDS, drug addiction ect.) Acanthamoebas enter through an injury and go to CNS by hematogenous route.

Another disease caused by genus *Acanthamoeba* is acanthamoeba keratitis (AK). AK is inflammation of cornea. *Acanthamoeba* come in to the eye through contaminated contact lenses or when cornea is damaged. Treatment these diseases is very complicated and success rate is not high. Mortality of PAM is even higher than 95%.

Differences between acanthamoebas and naeglerias concern several areas – life cycle, size and pathogenic potential. Naeglerias are able to create 3 stages (trophozoite, flagellate, cyst), acanthamoebas alternate between 2 stages (trophozoit, cyst). Trophozoite of acanthamoebas (12-35 μm) is somewhat bigger in comparsion with naegleria (15-25 μm). Major differences are visible on cysts which are irregular in shape in acanthamoebas and spherical and smooth in naeglerias.

In the practical part of my work I try to answer several questions: determination of genotypes or species of amoebas that were isolated in the laboratory of fish protistology and to ascertain more information about their pathogenity, geographic range etc. In the methodical part I described procedures of cultivation of amoebas, isolation of their DNA, course of PCR, electrophoresis and software processing of sequences. In cultivation I used classic non-nutrient agar and amoebas were harvested after their visual checking.The PCR protocol was standard: I used specific primers and termocycler. PCR products were separated by electrophoresis. After cutting proper bands from the gel, I sent the sample to be sequenced by a specialized company (Macrogen). Final sequences were checked and sequences with high quality signal were processed by programs SeqMan, ClustalX, BioEdit. For phylogenetic analysis I used programs – Paup, RAxML and MrBayes.

I got 9 sequences of genes for SSU rRNA of acanthamoebas and 1 naegleria´s ITS sequence. Using phylogenetic analysis I got phylogenetic trees which I inserted to chapter with results.

In the discussion chapter I outlined problems during gaining of naegleria´s sequences and I suggested several ways to solve them. The next part of discussion is devoted to detailed analysis of phylogenetic trees. Some of my sequences show close association with sequences derived from acanthamoebas which were isolated from patients with AK from various regions of the world, which indicate global distribution of some lineages of amoebas. *Naegleria* groups are more restricted by environment, but there are exceptions.

Key words: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, Primary amebic meningoencephalitis, Granulomatous amebic encephalitis, PCR

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala 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 5.5.2015 .....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu své práce Mgr. Martinu Kostkovi, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, ochotu pomoci a hlavně trpělivost, s kterou odpovídal na všechny mé otázky.

Seznam použitých zkratek

AK	Amébová keratitida
CDC	Center for Disease Control (and Prevention)
CNS	Centrální nervová soustava
CSF	Cerebrospinal fluid – mozkomíšní mok
CT	Computed Tomography – počítačová tomografie
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Deoxynukleotidy
GAE	Granulomatózní amébová encefalitida
HIV/AIDS	Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immune Deficiency Syndrome
ITS	Internal transcribed spacer
MBP	Mannose binding protein
ML	Maximum likelihood
PAM	Primární amébová meningoencefalitida
PBS	Phosphate Buffered Saline – pufrovaný fyziologický roztok
PCR	Polymerase chain reaction – polymerázová řetězová reakce
SSU rRNA	18S malá podjednotka ribosomální ribonukleové kyseliny
TAE	Tris-acetát-EDTA
TBE	Tris-borád-EDTA
UV	Ultraviolet – ultrafialové záření

Obsah

1 Úvod 12

2 Teoretická část 13

2.1 Negleria 14

2.1.1 Morfologie 15

2.1.2 Patogeneze 17

2.1.2.1 Primární amébová meningoencefalitida (PAM) 17

2.1.2.1.1 Příznaky 17

2.1.2.1.2 Diagnostika 18

2.1.2.1.3 Léčba 18

2.2 Acanthamoeba 19

2.2.1 Morfologie 20

2.2.2 Patogeneze 23

2.2.2.1 Granulomatózní amébová encefalitida 23

2.2.2.1.1 Příznaky 23

2.2.2.1.2 Diagnostika 24

2.2.2.2 Akantamébová keratitida 24

2.2.2.3 Léčba akantamébových infekcí 25

3 Cíle práce a výzkumné otázky 26

3.1 Cíle práce 26

3.2 Výzkumné otázky 26

4 Metodická část 27

4.1 Vymražení a kultivace 27

4.1.1 Pracovní pomůcky 28

4.2 Rozočkování a další kultivace 29
4.2.1 Postup rozočkování 29
4.3 Sklizeň 30
4.3.1 Postup 30
4.4 Izolace DNA ze sklizených améb (buněk) 30
4.5 PCR 31
4.5.1 Postup – namíchání reakční směsi 33
4.6 Elektroforéza 33
4.6.1 Namíchání gelu 34
4.6.2 Postup – spuštění elektroforézy a vyřezání proužků 34
4.7 Přečištění DNA z agarového bločku 35
4.8 Sekvenace 36
4.8.1 Příprava na sekvenování 36
4.8.2 Po obdržení sekvencí následuje: 36
5 Výzkumná část 38
6 Diskuse 43
7 Závěr 47
8 Seznam použitých zdrojů 48

1 Úvod

Mezi širokou veřejností není většinou známo, že jednou z příčin meningoencefalitid jsou i améby. Navíc je léčba meningoencefalitid, kde jsou patogenem améby, mnohem náročnější, než je-li tato nemoc způsobená viry nebo bakteriemi. V laboratoři rybí protistologie, která mi během práce poskytla zázemí, bylo v minulosti z různých prostředí vyizolováno mnoho různých améb včetně těch, které jsou potenciálními patogeny člověka. Většina jich byla izolována z ryb a jejich orgánů. V biologii těchto tzv. amfizoických améb zůstává řada nedořešených otázek. Nevíme například, zda se mohou améby na rybách preadaptovat na další obratlovce; nevíme, zda existují linie améb specializované na parazitaci ryb. Nejasná je i otázka geografického rozšíření améb atd. Ve své práci jsem se pokusila přispět k řešení těchto problémů.

Z těchto důvodů jsem se věnovala jednak vypracování literární rešerše, ale i části praktické, kde jsem popsala a použila tyto metody: kultivace, izolace DNA, PCR, elektroforéza, sekvenace. Výsledné sekvence jsem fylogeneticky analyzovala a interpretovala. Struktura mé práce vychází ze zvolených cílů.

2 Teoretická část

Améby patří do skupiny tzv. protozoí – prvoků (Visvesvara et al., 2007). Prvoci jsou jednobuněčné eukaryotické organismy, které používají k získání potravy pinocytózu i fagocytózu. Dalším společným znakem je dělení jader pomocí mitózy (následované typicky dělením buňky) (Khan, 2006). Protozoa se dále dělí do několika velkých skupin, jejichž pojetí se v posledních letech dramaticky změnilo a stále není zcela ustálené. Většina typických améb (měňavek) se však řadí do skupiny Amoebozoa, kterou můžeme dále rozdělit na dvě základní skupiny: Lobosa a Conosa (Smirnov et al., 2011; Cavalier-Smith et al., 2015). Do skupiny Lobosa řadíme především volně žijící améby netvořící bičík. Do skupiny Conosa se řadí bičíkaté améby (některé ale bičíky sekundárně ztratily) a část z nich žije endozoicky. Menší, ale významnou skupinou rovněž zahrnující améboidní organismy, jsou tzv. Heterolobosa. Z dále pojednávaných měňavek sem řadíme rod *Naegleria* (Volf, Horák a kol., 2007; Adl et al., 2012).

Améby jsou schopny žít jako volně žijící organismy v přírodě, ale některé příležitostně parazitují v hostitelské tkáni a proto je můžeme nazývat amfizoickými amébami. Jsou schopné obou způsobů života (Visvesvara et al., 2007; Nagyová et al., 2010). Mezi améby parazitické a oportunní řadíme druhy rodu *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris* a *Negleria fowleri*. Tyto améby můžeme považovat za aerobní, mitochondriální. Vyskytují se po celém světě a mohou být příčinou infekce lidí i zvířat. Známější obligátně parazitické či komenzální améby rodu *Entamoeba* jsou anaerobní a amitochondriální (Visvesvara et al., 2007).

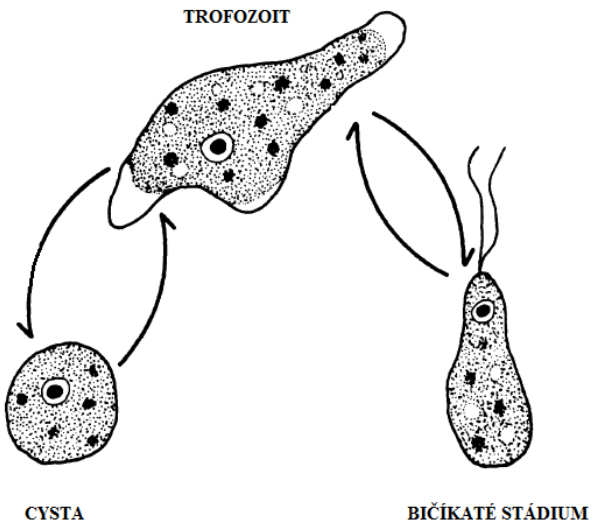
Výše uvedené amfizoické améby jsou příčinou onemocnění centrální nervové soustavy (CNS). *Acanthamoeba* a *Balamuthia* způsobují chronické a často fatální onemocnění zvané granulomatózní amébová encefalitida (GAE). GAE se vyskytuje zejména u imunokompromitovaných nebo jinak oslabených osob. *Naegleria fowleri* zapříčiňuje akutní, fulminantní, nekrotizující a hemoragickou meningoencefalitidu (PAM), která způsobuje smrt především zdravým dětem a mladým dospělým (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007).

Meningoencefalitida způsobená rodem *Negleria* a *Acanthamoeba*

Původcem amébové meningoencefalitidy jsou zástupci rodu *Acanthamoeba* (*A. culbertsoni, A. polyphaga, A. castellanii* a *A. rhysodes* a další) a *Naegleria* (*N. fowleri*). Toto onemocnění se projevuje jako 2 klinicky odlišné syndromy. Prvním z nich je primární amébová encefalitida (PAM), což je onemocnění s rychlým postupem a fatálními následky. Postihuje hlavně děti a mladé dospělé. Patogenem je zde *N. fowleri*. Druhým onemocněním je granulomatózní amébová encefalitida (GAE). Pro GAE jsou charakteristické neurologické změny postihující hlavně imunosuprimované pacienty, kteří se nakazí patogenem rodu *Acanthamoeba*. Do CNS se pak améba dostane z primárního ložiska hematogenní cestou (krevní oběh) (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007).

2.1 Negleria

Naegleria spp. Se řadí do čeledi Vahlkampfiidae v třídě Heterolobosea. Tato protozoa se živí převážně bakteriemi (De Jonckheere, 2011). Neglérie jsou améby schopné tvorby bičíkatých buněk a cyst (viz obr 1). Přeměna mezi stádii je reverzibilní a závisí na podmínkách, v jakých se améba nachází. Můžeme je nalézt v půdě, vodě, chladicích věžích, splaškách, blátě a bazénech (oteplených). Při invazi do organismu je primárně najdeme i v nosní a krční dutině (Ma et al., 1990; Bednář a kol, 1996).



Obrázek 1: Životní cyklus rodu *Naegleria*
Zdroj: Ma et al., 1990, upravené

2.1.1 Morfologie

Stádium trofozoita je měňavkovité, má oblé jádro s karyozomem (jadérkem). Velikost se pohybuje mezi 15 až 25 μm. Uvnitř se nacházejí pulzující vakuoly, jež shromažďují přebytečnou vodu a periodicky se vyprazdňují, což je patrné v cytoplazmě améb i při pozorování v mikroskopu. Tento děj pak pomáhá v diagnostice a rozpoznání amébových trofozoitů, které by jinak mohly být považovány za tkáňové buňky. Kulovitá struktura nacházející se v zadní části améby se nazývá uroid. Cytoplazma proudící uvnitř trofozoitů je granulovaná a obsahuje potravní vakuoly (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007; Shibayama et al., 2012).

Ve vhodném prostředí (méně osmoticky aktivním) se trofozoit během několika málo hodin mění na bičíkaté stádium, které mívá od 1 do 4 bičíků, ale nejčastěji dva. Velikost stádia se pohybuje mezi 10 až 16 μm. Bičíkatá forma se dokáže vrátit do stádia trofozoitu během jedné hodiny. Trofozoit se v odolnou cystu změní do 24 hodin. Tato změna nastává

díky nepříznivým podmínkám prostředí (nedostatek potravy, nepříznivá teplota, chemikálie apod.) (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007).

Cysta neglerií je charakterizovaná jako kulovitý hladký útvar s dvojitou stěnou. Ve stěně cysty se nacházejí zpravidla 2 až 3 póry, kterými mohou cirkulovat živiny a metabolity. Hlavní funkcí pórů je komunikace mezi cystou a vnějším prostředím. Póry mohou být uzavřeny hlenovitým špuntem. Průměrná velikost cysty je 10 μm. Stádium cysty se u nemocných nenachází, protože onemocnění způsobená negléreimi mají rychlý průběh a fatální následky pro postiženého (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007; Shibayama et al., 2012).

Jediný druh neglérie patogenní pro člověka se nazývá *Naegleria fowleri*. *N. fowleri* jako původce onemocnění poprvé pozorovali Fowler a Carter z Austrálie v roce 1965. K identifikaci byla využita kombinace testu patogenity a testu růstové teploty (De Jonckheere, 2011). Tato neglérie je termofilní, snáší teploty do 45°C (Novák, 2014; De Jonckheere, 2011). U člověka způsobuje PAM. Do organismu vniká přes dutinu nosní a podél čichového nervu putuje do CNS, kde se množí. Smrt nastává několik dní po propuknutí prvních příznaků (obvykle 5-7), které na počátku připomínají chřipku. (Visvesvara et al., 2007; De Jonckheere, 2011; Novák, 2014)

Naegleria fowleri je kosmopolitně se vyskytující amébou. Záznamy o jejím patogenním působení nejčastěji pocházejí z tropických zemí, což souvisí s její termofilií (Visvesvara et al., 2007). Ojediněle se PAM způsobené *N. fowleri* vyskytuje i u nás. Mezi lety 1962-1965 u nás zemřelo na amébovou encefalitidu 16 lidí, kteří se nakazili ve veřejném bazénu v Ústí nad Labem. Tato zkušenost se stala podnětem pro zkoumání těchto organismů po celém světě (Ma et al., 1990; Novák, 2014).

Další dosud objevené neglérie jsou pro člověka nepatogenní. Příkladem nepatogenních druhů jsou *Naegleria gruberi*, *N. lovaniensis* (blízce příbuzná *N. fowleri*), *N. jadini*, *N. australiensis* nebo *N. italica* (ta je ale vysoce patogenní pro experimentální zvířata) (Ma et al., 1990).

2.1.2 Patogeneze

2.1.2.1 Primární amébová meningoencefalitida (PAM)

Primární amébová meningoencefalitida (dále jen PAM) je onemocnění CNS. Vyznačuje se náhlým nástupem a bleskovým průběhem nemoci. Původcem PAM je améba *Naegleria fowleri.* Doba mezi první kontaktem se škodlivou agens a objevením prvních příznaků choroby se nazývá inkubační doba. Pro PAM, je inkubační doba zpravidla 2 - 7 dnů. První příznaky onemocnění se podobají chřipce, ty však velmi rychle přejdou v letargii, zmatenost nebo kóma. Úmrtnost na toto onemocnění je velmi vysoká, přes 95 %. Jedním z důvodů je i její podoba s akutní hnisavou meningoencefalitidou, na kterou zabírají antibiotika. Chybné stanovení diagnózy vede k pozdnímu nasazení vhodné léčby (Ma et al., 1990; Trnková a kol., 2008; Novák, 2014).

Vstupní branou pro *N. fowleri* je nosní dutina, do níž se prvok ve formě améby nebo bičíkovce dostane vdechnutím kontaminované vody (např. při potápění). V nosní dutině je místem primárního poškození čichový nerv, do kterého se neglérie dostane přes sliznice dutiny nosní. Podél čichového nervu se pak améba dostane do mozku. *N. fowleri* migruje přes axony (myelinové pochvy) čichového nervu až do čichového bulbu (výběžek čichového laloku na čichové kosti). Ten je spojen s dalšími částmi mozku a tím dojde k rozsevu améb po celé CNS (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007; Trnková a kol., 2008).

2.1.2.1.1 <u>Příznaky</u>

U nakaženého člověka se jako první objeví příznaky podobné chřipce – bolest hlavy v čelní a obou spánkových oblastech, vysoká horečka, rýma, nevolnost, zvracení, podrážděnost a neklid. Časné příznaky vystřídají neurologické obtíže – fotofobie, letargie, záchvaty, zmatenost, kóma apod. Smrt nastává většinou do 1 týdne od projevení se prvních příznaků. Pacient umírá díky zvyšujícímu se nitrolebečnímu tlaku, který vede ke kardio-respiratornímu selhání a edému plic (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007).

2.1.2.1.2 Diagnostika

V časných stádiích nemoci je likvor (CSF) zbarvený. Barva přechází od šedé k žlutobílé a někdy má i narůžovělé zbarvení, díky obsahu červených krvinek (250 mm^{-3}). Jak choroba postupuje, můžeme nalézt mnohem větší počet červených krvinek (< 24 600 mm^{-3}). Objevují se bílé krvinky, hlavně polymorfonukleáry (300 – 26 000 mm^{-3}), ale žádné bakterie. Tlak mozkomíšní tekutiny (CSF) je zvýšený (300 – 600 mm H_2O) a stejně tak i obsah bílkovin (od 100 mg/100 ml do 1000 mg/100 ml). Koncentrace glukózy je normální nebo nižší (≤10 mg/100 ml) (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007).

Poškození mozku vlivem PAM je možné vidět pomocí počítačové tomografie (CT). CT ukáže vyhlazení gyrů okolo střední části mozku a subarachnoidálních oblastí mozkových hemisfér. Mozkové hemisféry jsou hladké a oteklé vlivem nitrolebečního tlaku. Pleny mozku jsou ucpané, neprůhledné. Čichový bulbus je poškozen nekrózou a obklopen hnisavým exudátem. Záznam CT se dá vylepšit pomocí kontrastního média (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007).

Při diagnostice nemoci se odebírá CSF a prohlíží se pod mikroskopem (nejlépe vybaveným fázovým kontrastem), kde jsou vidět aktivní trofozoity. Améby jsou jasně odlišitelné od buněk hostitelské tkáně. Finální diagnostika je založena na izolaci a kultuře améb z odebrané mozkomíšní tekutiny nebo nalezení trofozoitů v mozkové tkáni. Serologický test není validní, jelikož je jeho výsledek ovlivněn mnoha faktory (věk, roční období, teplota prostředí apod.) (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007).

2.1.2.1.3 Léčba

U PAM přežívá pouze 5% nakažených a proto je nejdůležitější prevence – nekoupat se v trvale oteplených vodách (nepotápět se), dezinfikovat vyhřívané bazény. V případě včasného zásahu se využívá amphotericin B podaný nejlépe intratekálně (do mozkových plen v rámci lumbální punkce). Amphotericin B se kombinuje s rifampinem a doxycyklinem nebo jinými léky. (Novák, 2014; Tolan, 2015; Maxdorf s.r.o., 2008)

2.2 Acanthamoeba

Akantaméby jsou volně žijící améby, které můžeme najít v půdě, vodě, prachu, vzdušných filtrech, lidských i zvířecích exkrementech a při onemocnění také v tkáních a orgánech nemocného hostitele. Tyto volně žijící améby byly původně popsány jako *Hartmanella castellanii*. Jako první je popsal M. Douglas v roce 1930. Do rodu *Acanthamoeba* byly zařazeny později (1931), když tento rod zavedl Volkonsky. Čeleď *Acanthamoebidae* byla vytvořena až v roce 1975 a zasloužili se o to Sawyer a Griffin (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007; Khan, 2006).

Všechny améby rodu *Acanthamoeba* byly původně považovány za nepatogenní, dokud Culbertson a jeho tým neobjevili druh, který byl schopen zabít laboratorní zvířata. Tuto patogenní amébu popsali a pojmenovali Singh a Das v roce 1970. Améba dostala název *A. culbertsoni*. Původní kmen byl izolován z indického komunálního odpadu (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007).

Spojení mezi optimální růstovou teplotou a patogenitou rodu *Acanthamoeba* objevil Griffin při jeho výzkumu teplotní tolerance améb. Patogenní *Acanthamoeba culbertsoni* je životaschopná a reprodukčně aktivní i při teplotě 37°C. Jiné akantaméby nemají tak vysokou teplotní toleranci, např. *A. rhysodes* (je schopná přežít 37°C, ale nemůže se množit), *A. castellanii* a *A. polyphaga* (teplotu 37°C nepřečkají). *A. culbertsoni* je pro nás tedy potenciálně patogenní a ostatní druhy můžeme zařadit mezi oportunní patogeny (za normálních okolností jsou neškodné) (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007). Ukazuje se však, že otázka druhů akantaméb a jejich medicinského významu je stále otevřená.

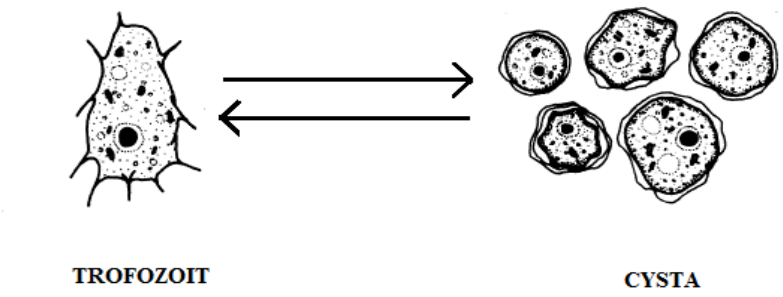
Pro medicínu se staly *Acanthamoeba* spp. zajímavými až po objevení jejich role při zánětu rohovky, hlavně u lidí nosících kontaktní čočky. Ty mohly být kontaminovány vodou nebo vzduchem obsahující améby či jejich cysty (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007; Khan, 2006).

2.2.1 Morfologie

Mezi rodem *Naegleria* a *Acanthamoeba* existuje řada rozdílů. První z rozdílů je v životním cyklu, ten zahrnuje u akantaméb pouze dvě střídající se stádia – trofozoit a cystu (viz obr. 2). Pro trofozoit akantaméb je charakteristické jediné jádro s velkým jadérkem neboli endozomem. Jádro zaujímá asi 1/6 vnitřního prostoru. Velikost trofozoitu se pohybuje od 12 do 35 µm. Pohyb tohoto stádia je pomalý. Na povrchu se tvoří filózní pseudopodia, kterým se říká akantopodia (Ma et al., 1990; Khan, 2006).

Akantaméby se živí bakteriemi, například *E. coli* a jinými gram-negativními bakteriemi. Některé druhy jsou schopné konzumovat i *L. pneumophila*, sinice a kvasinky. K pohlcení bakterií využívají fagocytózy (Ma et al., 1990; Khan, 2006; Clarke, Niederkorn, 2006).

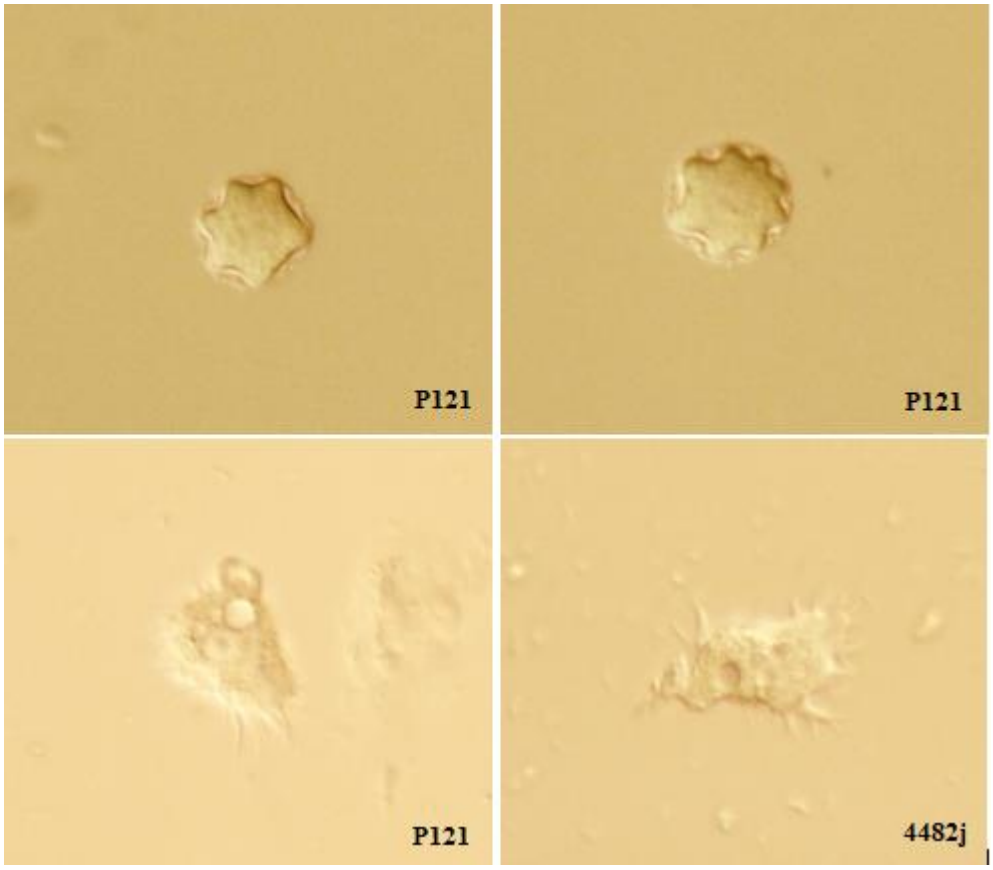
Při pozorování trofozoitu (viz obr. 3) v aktivně rostoucí kultuře můžeme pozorovat i velké pulzující vakuoly, které se během 1-2 minut naplní a znova vyprázdní. Trofozoity mají sklon pohybovat se po určité linii a často tuto trasu můžeme pozorovat jako stopu na agaru (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007).



Obrázek 2: Životní cyklus rodu *Acanthamoeba*
Zdroj: Ma et al., 1990, upravený

K zacystování trofozoitu dochází za nepříznivých podmínek – nedostatek potravy, nízká teplota, přítomnost chemikálií apod.). Rozdíl mezi rodem *Naegleria* a *Acanthamoeba* je nejmarkantnější právě u cyst. Jejich velikost se pohybuje od 5 do 20 μm (Khan, 2006). Cysty akantaméb mají dvě vrstvy – vnější ektocystu a vnitřní endocystu. Obě tyto vrstvy se velikostně i tvarově liší, a to dle druhu. Vnější ektocysta je obvykle nepravidelně kulovitá. Endocysty mohou být nepravidelného tvaru (povrchové vroubky), oblé, trojúhelníkovité, čtvercové nebo s hlubokými vroubky (Visvesvara et al., 2007; Khan, 2006).

Dle velikosti cysty lze akantaméby rozdělit do tří morfologických skupin. Skupina 1 je charakteristická relativně velkými cystami (přibližně 18-20 μm), endocystou hvězdicovitého tvaru a hladkou a sférickou ektocystou. Pro skupinu 2 a 3 je typická velikost menší než 18 μm. Druhá skupina se vyznačuje tvarem mnohoúhelníku u endocysty a nepravidelností u ektocysty. Endocysta třetí skupiny je kulovitá a ektocysta zvlněná. Morfologie cyst (viz obr. 3) se může měnit v závislosti na vnějších podmínkách (Nagyová et al., 2010; Kong, 2009).



Obrázek 3: Cysty (nahoře) trofozoity (dole) rodu *Acanthamoeba*. Použité zvětšení – 400x. Olympus digital camera – vlastní fotografie

Kontakt mezi ekto- a endocystou zajišťují póry, které jsou viditelné jen v určitých intervalech. Zajišťují i kontakt cysty s vnějším prostředím. Před vytvořením cysty existuje takzvaná precysta, ta ovšem není rozlišitelná ve světelném mikroskopu (její stěna zatím není viditelná). Funguje u ní stále pulzující vakuola a póry zde ještě neexistují. Póry jsou viditelné až na cystě. Počet pórů, k nimž směřují výběžky endocysty, je závislý na druhu améby (7 pórů u *A. catellanii*, 5 u *A. astronyxis*, 3-4 u A. *hatchetti*) (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007; Khan, 2006).

Cysty jsou velmi rezistentní. Jsou odolné vůči vysychání, chladu a různým antimikrobní prostředkům. V případě zlepšení vnějších podmínek je schopná cysta

přeměny na aktivní stádium (trofozoit) během několika hodin nebo i dnů (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007).

2.2.2 Patogeneze

2.2.2.1 Granulomatózní amébová encefalitida

Příčinou granulomatózní amébové encefalitidy (GAE) jsou různé druhy rodu *Acanthamoeba – A. castellanii, A. polyphaga, A. culbertsoni, A. astronyxis, A. healyi* a *A. divionensis*. Tyto améby jsou oportunními patogeny – za normálních podmínek nejsou schopny způsobit onemocnění. Jako příčinu GAE je nacházíme u imunokompromitovaných hostitelů. Největší množství případů GAE je diagnostikováno u HIV/AIDS pozitivních, lidí s chronickými chorobami, diabetiků, pacientů po transplantaci apod. (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007; Magliano, 2011).

Virulentní akantaméby se mohou do těla dostat ze vzduchu, aerosolem nebo prachovými částicemi obsahující cysty nebo trofozoity. Poté se usadí v nižším dýchacím traktu (plíce) nebo v kůži. U imunokompromitovaných lidí se pak rozšíří do CNS pomocí krve (hematogenní rozsev) (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007).

Na rozdíl od PAM je inkubační doba GAE způsobené rodem *Acanthamoeba* neznámá. Někdy se onemocnění projeví po několika týdnech od proniknutí améby do těla, ale může to trvat i několik měsíců. Delší inkubační doba je způsobena pomalejším růstem těchto améb (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007).

2.2.2.1.1 Příznaky

Mezi příznaky nemoci patří bolest hlavy, strnutí šíje, nevolnost, zvracení, letargie, někdy horečky. Neurologické příznaky se objevují v závislosti na zasažené oblasti mozku – hemiparéza (ochrnutí poloviny těla), ospalost, změny osobnosti, záchvaty, kóma apod. Nejvýznačnějším příznakem GAE jsou psychické změny. Nejčastější příčinou smrti

postižených pacientů je bronchopneumonie (lalůčkový zápal plic) (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007; Maxdor s.r.o., 2008).

2.2.2.1.2 Diagnostika

GAE se projevuje jako chronické, dlouhotrvající onemocnění a není omezeno věkem ani pohlavím. Výskyt během roku není závislý na teplotě, na rozdíl od PAM asociované s teplým prostředím. Jediným spojujícím znakem nakažených je určitá míra imunokompromitace (oslabenost) těchto jedinců. Nejvýznamnějšími rizikovými faktory toho onemocnění jsou maligní onemocnění (lymfomy), diabetes, otevřená zranění, popáleniny, drogová závislost, HIV/AIDS pozitivita aj (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007).

Stejně jako u PAM, je velmi důležitá časná diagnostika onemocnění. Úspěšnost terapie klesá s časem uplynulým od projevení se prvních příznaků choroby. Při diagnostice GAE se může využít vyšetření CSF odebranou lumbální punkcí. To však může být kontraindikováno kvůli zvyšujícímu se nitrolebečnímu tlaku. Při použití CT jsou viditelné četné oblasti mozku, kde je snížená hustota (změklé) mozkové kůry a subkortikální (podkorové) bílé hmoty vlivem septické embólie (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007; Maxdorf s.r.o., 2008).

Mikroskopický nález v infikované tkání je charakterizovaný chronickou granulomatózní reakcí a nálezem nevelkého množství velkých polymorfonukleárů. Trofozoity a cysty jsou roztroušeny okolo primárního ložiska v perivaskulárním prostoru (v okolí cév). Při patologii je patrný edém mozku s krvácením (Ma et al., 1990; Visvesvara et al., 2007; Maxdorf s.r.o., 2008).

2.2.2.2 Akantamébová keratitida

Akantamébová keratitida (dále jen AK) je infekce rohovky vzniklá nejčastěji po kontaminaci kontaktní čočky vodou obsahující *Acanthamoeba* spp. Nemoc byla objevena

Nogingtonem a kolektivem roku 1974 ve Velké Británii. Případy tohoto onemocnění zaznamenává organizace CDC (Khan, 2006; Ma ed al., 1990).

Při AK se *Acanthamoeba* spp. dostane do oka pomocí nedostatečně sterilizované kontaktní čočky nebo při poškození rohovky. Na rohovku se améba uchytí pomocí MBP (mannose binding protein) na epitelu rohovky. Dále penetruje do Bowmanovy membrány (blanka pod rohovkovým epitelem) a ničí cílové buňky. Tím se spustí buněčná lýza, fagocytóza a apoptóza. Dochází k poškození rohovky (Ma et al., 1990; Khan, 2006; Clarke, Niederkorn, 2006; Magliano et al., 2011; Maxdorf s.r.o., 2008).

Včasná diagnostika tohoto onemocnění je velice důležitá. Ve většině případů dochází, i přes včasnou léčbu, k poškození zraku nebo i ztrátě oka. Mezi používané léky patří steroidy nebo agresivní biguanid a diamidy (propamidin) (Ma et al., 1990; Khan, 2006; Dart et al., 2009).

2.2.2.3 Léčba akantamébových infekcí

Akantamébové infekce jsou velmi odolné vůči léčbě, zvláště stádia cysty. Nejlepších výsledků v léčbě těchto onemocnění se dosahuje při časné diagnostice. Čas je v tomto případě velmi důležitý, protože s uplynulým časem klesá účinnost léčby. Kvůli jejich odolnosti se také často využívá kombinace léčiv (Khan, 2006; Dart et al., 2009).

K léčbě AK se využívá lokálních léčiv jako je polyhexamethylen biguanid (0,02%) nebo chlorhexidin (0,02%), který může být kombinován s propamidinem (0,1%). Použití kortikosteroidů je použitelné pro zastavení šíření améb. Při neúspěšné léčbě se musí postižená rohovka transplantovat, proto je nejlepší tomuto onemocnění předcházet (CDC-1, 2010; Khan, 2006; Dart et al., 2009).

Při léčbě GAE je velmi důležité stádium nemoci. V případě včasného zásahu se využívá např. ketoconazol, amphotericin B, paromomycin, polymyxin, sulfadiazin, clotrimazol a další (Tolan, 2015; CDC-2, 2012).

3 Cíle práce a výzkumné otázky

3.1 Cíle práce

1) Vypracovat rešerši na téma "volně žijící améby jako patogeny lidí a zvířat".
2) Molekulárně charakterizovat vybrané sbírkové kmeny améb: získat sekvence genů využívaných jako markery pro tyto organismy (SSU rDNA, ITS).
3) Získaná data fylogeneticky analyzovat a výsledky analýz interpretovat.

3.2 Výzkumné otázky

1) Do kterých genotypů patří akantaméby izolované v laboratoři rybí parazitologie? Jedná se o běžné linie akantaméb, nebo se mezi nimi vyskytují unikátní linie?
2) Jakým dalším kmenům améb jsou námi studované izoláty nejblíže příbuzné? Jaké je geografické rozšíření linií zastoupených v našich vzorcích a jaká prostředí mohou obývat?

4 Metodická část

4.1 Vymražení a kultivace

Prvním krokem výzkumu bylo vytipování vhodných kultur améb v databázi (viz tab. 1) a jejich vymražení z tanků s tekutým dusíkem, kde jsou dlouhodobě konzervovány v ampulkách s Pageovým roztokem (viz níže) a 10% DMSO. Pro zajištění lepších výsledků byly améby vymražovány jednak na agarové plotny a jednak do tekutého média.

Tabulka 1: Seznam vybraných vzorků pro kultivaci

Typ améb	Název	Zdroj	Geografický původ	Datum prvního zamrazení
ACANTHAMOEBY	LITHOA	Lithophyllum racemus	Chorvatsko	2006
	NAHAC	Cyprinus carpio	ČR	1905
	4478	Cyprinus carpio, játra	VURH Vodňany	1905
	4479m	Cyprinus carpio, mozek	VURH Vodňany	1905
	4479S	Cyprinus carpio, slezina	VURH Vodňany	1905
	4481	Cyprinus carpio, mozek	VURH Vodňany	1990
	4482j	Cyprinus carpio, játra	VURH Vodňany	1990
	P121	Mota, žábry	Peru - Iquitos	2004
	P122A	Lisa, žáby	Peru - Iquitos	2004
	P122B	Lisa, žáby	Peru - Iquitos	2004
	Pd52Z	Oncorhynchus mykiss, žábry	Benešov nad. Černou	1998
NAEGLERIE	Pd59ZVC	Oncorhynchus mykiss, žábry	Benešov nad. Černou	1998
	CB1K	Clarias batrachus x gariepinus, ledviny	Thajsko	1997
	CB1G	Clarias batrachus x gariepinus, žábry	Thajsko	1997
	CB1B	Clarias batrachus x gariepinus, mozek	Thajsko	1997
	Pd90Z	Oncorhynchus mykiss, žábry	Chvalšiny	1998
	Pd91Z	Oncorhynchus mykiss, žábry	Chvalšiny	1998

	Pd92Z	Oncorhynchus mykiss, žábry	Chvalšiny	1998
	Pd58Z	Oncorhynchus mykiss, žábry	Benešov nad. Černou	1998
	ALM1B	Environ. Kmen seškrab ze skály lemující silnici	Tenerife, Almaciga carretera	2010
	KAPR2	Cyprinus carpio, žábry	náš chov-bazény	2000
	ALC1	Environ. Kmen, stružky podél silnice	Tenerife, Almaciga carretera	2010
	ALC2	Environ. Kmen, stružky podél silnice	Tenerife, Almaciga carretera	2010
OSTATNÍ	893	Carassius auratus, mozek	Mydlovary	1993
	4362MM	Pseudorasbora parva, žábry	Podřezaný	1990
	4599	Perca fluviatilis, slezina	Černovický pot.	1991
	BCZ4	Bunocephalus coracoides, žábry	import Brazílie Amazonka	1999
	SS7FJ	Salmo salar, žábry	Irsko, farma FARAD	2000
	SMA15	Scophthalmus maximus, žábry	Vigo - Acuinova	2000
	P18	Mota, žábry	Peru iquitos	2004
	NEPA2	Nepenthes ampularia - masožravka; tekutina v láčce	NP Bako, Sarawak, Borneo	2008
	REH1	Oncorhynchus mykiss, žábry	ČR	2009
	PV65	Prázdná pivní láhev	ČR	2011
	PV68	Prázdná pivní láhev	ČR	2011

Zdroj: Databáze protistologické laboratoře Akademie věd České republiky.

4.1.1 Pracovní pomůcky

- Misky s nevýživným agarem (non-nutrient agar). Jde o 1% agarový gel připravený z Pageova roztoku s přídavkem maltózy, jakožto zdroje energie, a kvasničného extraktu sloužícího jako zdroj aminokyselin, fosforu aj. Obě tyto látky podporují množení bakterií, které následně konzumují améby.
- Inkubační miska s více jamkami
- Pipeta (1000 μl)
- Kovová špachtle vhodná pro žíhání

- Pageův roztok – použitý pracovní roztok je připraven ze zásobního koncentrátu Pageova roztoku (tab. 2). Pracovní roztok je připraven z 5 ml zásobního roztoku, který je doplněn deoinizovanou vodou na výsledný objem 1l.
- Skleněná hokejka

Tabulka 2: Pageův roztok – obsah látek v 500 ml zásobního roztoku

Chemikálie	Obsah (g)
NaCl	12
$MgSO_4$. 7H2O	0,4
$CaCl_2$. 6H2O	0,6
Na_2HPO4	14,2
KH_2PO4	13,6

Zdroj: Kalinina and Page, 1992

4.2 Rozočkování a další kultivace

Po několikadenní inkubaci jsem misky zkontrolovala pod mikroskopem, zdali améby dobře rostou nebo je třeba přeočkování na nové plotny, např. kvůli zaplísnění. V několika případech bylo třeba améby přikrmit suspenzí bakteriálních buněk (*E. coli*). Všechny úspěšně vymražené kultury byly před sklizní buněk rozočkovány na větší množství (cca 4) čerstvých agarových ploten.

4.2.1 Postup rozočkování

1) Na plotnách, které bylo třeba přeočkovat, jsem si označila místo s největší koncentrací aktivních améb (trofozoitů).
2) Připravila jsem si potřebné množství nových ploten a popsala je čísly vzorků a datem.

3) Na plotny jsem kvůli zvlhčení napipetovala po 0,5 ml Pageova roztoku (případně i kapku suspenze *E. coli*) a rozetřela skleněnou hokejkou.
4) Označená místa jsem vyřízla kovovou špachtlí a rozřezala na více kusů. Ty jsem poté přenesla na nové plotny.
5) Přeočkované plotny jsem zabalila do mikroténového sáčku (kvůli minimalizaci ztrát vody výparem) a dala opět inkubovat.
6) Postup jsem opakovala dle potřeby. Tedy do doby, kdy na plotně narostlo velké množství trofozoitů.

4.3 Sklizeň

Agarové misky byly vhodné ke sklizni, pokud na nich bylo dostatečné množství pohyblivých améb (trofozoitů), tj. byla-li většina jejich plochy porostlá víceméně souvislou kulturou.

4.3.1 Postup

1) Popsala jsem si zkumavky a připravila Pageův roztok, skleněné hokejky, pipetu a špičky.
2) Na povrch narostlé plotny jsem si napipetovala 3 mililitry Pageova roztoku.
3) Pomocí hokejky jsem améby smyla z povrchu plotny.
4) Pipetou jsem nasála roztok se suspenzí buněk a přenesla do připravené zkumavky.
5) Zkumavky jsem dala na 10 minut do centrifugy, kde se točily na nízké otáčky (cca 1000 g) a stočený vzorek slila. Ve zkumavkách zůstal jen sediment buněk.

4.4 Izolace DNA ze sklizených améb (buněk)

Proces izolace DNA z amébových buněk, které jsem získala při sklizni agarových ploten, se skládá ze 4 kroků - resuspendování, lýza, přečištění DNA a eluce. K tomuto

účelu jsem využila sestavu (KIT-1, 2012) od společnosti ROCHE a protokol pro izolaci DNA z buněčných kultur.

1) Resuspendování – buněčný sediment získaný při centrifugaci jsem resuspendovala v PBS, což je fyziologický roztok pufrovaný fosfátem.
2) Lýza - v tomto kroku jsem rozrušila buňky améb pomocí lyzačního pufru, který je doplněn o proteinázu K.
3) Přečištění – k získání DNA zbavené všech nadbytečných látek (inhibitory) jsem použila promývací pufr. Tento pufr obsahuje alkohol, který DNA vysráží a ta se pak zachytí v kolonce.
4) Eluce – pro tento účel je v sestavě eluční pufr, jenž rozpustí vysráženou DNA v kolonce a ta poté proteče do čisté Eppendorfovy zkumavky.

4.5 PCR

Polymerázová řetězová reakce (dále jen PCR) byla vynalezena Kary Mullis, PhD, a jeho týmem v roce 1983. Veřejnosti byl tento vynález představen o dva roky později. Byl to přelomový vynález, jelikož díky němu bylo možno vyrobit milióny kopií DNA během několika hodin (ROCHE s.r.o., 2015).

PCR je založena na přirozeném procesu replikace DNA. Touto formou však replikujeme jen vybraný úsek DNA, který nám pomůže identifikovat určitý organismus. Tento úsek DNA může být specifický pro každý typ améb, nebo konzervativní napříč různými liniemi organismů. K vymezení, ohraničení požadovaného úseku se využívá primerů. Primery bývají uměle připravené oligonukleotidy, jejichž délka se pohybuje kolem 18 až 30 bazí (Rosypal, 2002; Molekulární biologie-1, 2011).

PCR pracuje na principu cyklického opakování enzymatické syntézy nových řetězců DNA, ve směru 5‘ → 3‘, která je zprostředkovaná enzymem zvaným DNA polymeráza (Molekulární biologie-1, 2011).

Tento děj je rozdělen na 3 fáze – denaturace, annealing, extenze (polymerizační reakce) – všechny tyto děje probíhají v přístroji zvaném termocycler, zcela automaticky (Molekulární biologie-1, 2011; ROCHE s.r.o., 2015).

1) Denaturace – dvouvláknová DNA je rozdělena (denaturována) pomocí teploty vyšší než 90 °C na dvě vlákna.
2) Annealing – v této fázi dojde k nasednutí (hybridizaci) primerů na komplementární část řetězce. Fáze probíhá při teplotě od 40 do 65°C.
   a) Používají se 2 primery, které nám ohraničují sekvenovanou oblast.
   b) Primery se liší podle organismu (viz tab. 3).
3) Extension – po nasednutí primerů na řetězce, začíná syntéza komplementárního vlákna. Teplota se zvedne na 72° C. Syntéza probíhá díky termostabilní DNA-dependentní-DNA-polymeráze (Taq polymeráza, DNA polymeráza).

Tabulka 3: Seznam použitých primerů

Použití	Název	Sekvence	Poznámky
ACANTHAMOEBY	AcaJDP1	GGGCCCAGATCGTTTACCGTGAA	Akantaboebové primery (Dyková, 1999)
	AcaJDP2	CTCACAAGCTGCTAGGGGAGTCA	
NAEGLERIE	G-FOR	GGGATCCGTTTCCGTAGGTGAACCTGC	Primery negleria ITS (Coleman, Vacquier, 2002; Dyková et al., 2006)
	G-REV	GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT	
	NuF	GAA CCT GCG TAG GGA TCA TTT	Jiná verze ITS primerů pro neglérie (Pélandakis et al., 2000)
	NuR	TTT CTT TTC CTC CCC TTA TT	
NEURČENÉ AMÉBY	Erib1	ACCTGGTTGATCCTGCCAG	Univerzální eukaryotické primery pro SSU rDNA (Bárta et al., 1997)
	Erib10	CTTCCGCAGGTTCACCTACGG	

V každém cyklu se v ideálním případě vytvoří dvojnásobné množství příslušného úseku DNA. Cyklus probíhá 30x – 40x. Výsledné množství DNA je tedy teoreticky až 2^n molekul, kdy n se rovná počtu navolených cyklů (30 – 40). Počet nově nasyntetizované DNA přesahuje v reálu 1 miliardu molekul (Molekulární biologie-1, 2011; ROCHE s.r.o., 2015).

4.5.1 Postup – namíchání reakční směsi

1) Vyndala jsem z mrazáku H_2O, pufr, dNTP, primery a vzorky DNA, které jsem chtěla otestovat, aby se rozmrazily. Mezitím jsem si připravila PCR zkumavky a jednu mikrozkumavku na namíchání reakční směsi (tzv. mastermix, tab. 4).
2) Podle množství vzorku jsem si namíchala příslušný objem mastermixu.
3) Rozpipetovala jsem mastermix do PCR zkumavek (celkový objem mínus množství DNA).
4) Přidala jsem DNA a zamíchala na vortexu.
5) Do termocycleru jsem vložila mikrozkumavky, nastavila program a spustila.

Tabulka 4: Složení mastermixu

Chemikálie	**Objem (µl)**
Pufr	2,5
dNTP	2
Primer 1	1
Primer 2	1
TAG	1
DNA	3
H_2O	14,5
Celkový objem	25

4.6 Elektroforéza

Principem elektroforézy je separace částic pomocí stejnosměrného proudu, ve kterém se částice pohybují každá jinou rychlostí. Nosičem rozdělovaných částic bývá gel (v našem případě agarózový gel), jenž funguje jako síto. Nabité částice jím procházejí podle svojí velikosti – menší molekuly se v gelu dostanou nejdále (Rosypal, 2002; Molekulární biologie-2, 2011).

Částice DNA nelze v gelu spatřit, a proto se využívá barvivo. Nejčastěji využívaným barvivem je etidiumbromid, ale v mém výzkumu jsem používala SYBR green, který funguje obdobně, není však toxický. Barvivo se dostane mezi báze DNA a vytvoří s nimi komplex, který fluoreskuje pod UV-lampou (Rosypal, 2002).

4.6.1 Namíchání gelu

Před spuštěním elektroforézy je třeba nejdříve namíchat agarový gel s jamkami pro vložení PCR produktu.

1) Na analytických váhách jsem do Erlenmeyerovy baňky odvážila potřebné množství agarózy (0,5 g).
2) V odměrném válci jsem odměřila 50 ml tris-acetát-EDTA pufru (TAE), nalila do baňky a promíchala.
3) Baňku jsem dala do mikrovlnné trouby, aby se agaróza rozpustila.
4) Připravila jsem formu pro nalití gelu a vložila hřebínek na vytvoření jamek.
5) Po úplném rozpuštění agarózového prášku jsem roztok nalila do formy a nechala cca 15 minut tuhnout.

4.6.2 Postup – spuštění elektroforézy a vyřezání proužků

1) Zatuhnutý gel jsem přenesla do elektroforetické vany a zalila TBE pufrem.
2) Do první a poslední jamky jsem napipetovala tzv. žebříček (standard), sloužící k identifikaci potřebného proužku DNA.
3) Do každého produktu PCR jsem přidala barvivo SYBR green, který proužky v UV světle zviditelní, a vzorky jsem postupně přepipetovala do jamek.
4) Uzavřela jsem vanu víkem a zapnula zdroj stejnosměrného proudu.
5) Asi po 30 minutách jsem přístroj vypnula, gel jsem vyndala a vložila do UV transluminátoru (Molekulární biologie-2, 2011), abych proužky zviditelnila.
6) Vhodné (délkou odpovídající) proužky jsem vyřízla pomocí skalpelu a vložila do popsaných mikrozkumavek.

4.7 Přečištění DNA z agarového bločku

K tomuto účelu jsem využila sestavu (KIT-2, 2010) firmy ROCHE pro získání DNA z PCR produktu. Tento kit obsahuje tzv. binding pufr, promývací pufr, eluční pufr a kolonky. Fáze tohoto postupu jsou podobné izolaci DNA z buněk, ale zahajuje jej rozpuštění agarového bločku.

1) Rozpuštění agarového bločku
   a) Vyřezané bločky jsem nechala asi 10 minut rozpouštět v binding pufru v 56 °C.
   b) Po 10 minutách jsem zkontrolovala, jestli se všechen gel rozpustil a poté přidala po 150 µl isopropanolu na každých 100 mg agarósového gelu. Roztok jsem promíchala pomocí vortexu.
   c) Během rozpouštění gelu s DNA jsem si připravila a popsala kolonky a pod ně dala sběrné zkumavky.
   d) Tekutinu z Eppendorfových zkumavek jsem přenesla do kolonek.
   e) Kolonu jsem vložila do centrifugy, nastavené na nejvyšší otáčky, asi na 1 minutu.
   f) Tekutinu, která protekla do sběrné zkumavky, jsem vylila. DNA zůstala zachycená v kolonce.
2) Přečištění – odstranění přebytečných látek a zafixování DNA v kolonce.
   a) Do kolonky jsem napipetovala 500 µl promývacího pufru a vložila do centrifugy na 1 minutu.
   b) Tekutinu ve sběrné kolonce jsem vylila, napipetovala 200 µl promývacího pufru, dala stočit na 1 minutu a proteklou tekutinu slila.
3) Eluce – rozpuštění zachycené DNA a její zachycení v čisté eppendorfce.
   a) Připravila a popsala jsem si nové mikrozkumavky a vložila do nich kolonky se zachycenou DNA. Pomocí 50 µl elučního pufru byla z kolonek na centrifuze vymyta potřebná DNA.

4.8 Sekvenace

4.8.1 Příprava na sekvenování

Sekvenaci získaného PCR produktu provádí specializovaná firma (Macrogen). Vzorky určené pro sekvenaci i primery se naředí na vhodnou koncentraci a odesílají v objemu 20 µl. Moje PCR produkty byly sekvenovány za pomoci forwardového i reverzního amplifikačního primeru.

4.8.2 Po obdržení sekvencí následuje:

1) Kontrola
   a) Sekvence jsem nejprve zkontrolovala vizuálně, zda jsou dostatečně dlouhé a jejich signál je kvalitní.
   b) Po vizuální kontrole jsem si sekvenci zkopírovala (pořadí písmen) a vložila do programu BLAST na stránkách National Center for Biotechnology Information (National Library of Medicine, 2015). Jde o algoritmus vyhledávající podobné (nebo shodné) sekvence v databázi sekvencí.
   c) Vyhledávání sekvencí pomocí blastu slouží k identifikaci daného druhu.
2) Assemblování sekvencí (SeqMan)
   a) K assemblování (seskupení) dílčích sekvencí jsem použila program SeqMan (DNASTAR Inc., USA)
3) Příprava datasetu – stažení dalších sekvencí z databáze GenBank (přes NCBI). S těmito zveřejněnými, jinými autory získanými sekvencemi jsou srovnávány a následně analyzovány mnou získané sekvence. Pro analýzu příbuzenských vztahů naegleriií a akantaméb byly připraveny dva různé datasety.
4) Alignování (ClustalX) – pomocí programu ClustalX (Larkin et al., 2007) se sekvence zarovnají pod sebe tak, aby homologické úseky byly ve stejné poloze (případné chybějící báze jsou nahrazeny mezerami).
5) Kontrola a manuální úprava alignmentu (BioEdit) – v programu BioEdit (Hall, 1999) jsou odstraněny úseky, které jsou příliš variabilní pro spolehlivý annealing.
6) Fylogenetická analýza (PAUP a RAxML).

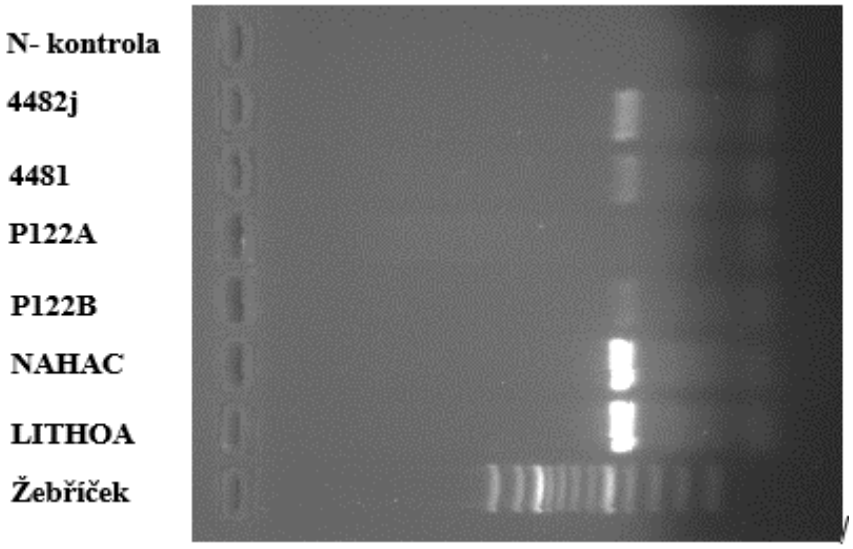
a) Pro vytvoření základního fylogenetického stromu jsem použila algoritmus NJ (neighbor joining) v programu PAUP (Swofford, 2003).
b) Výsledkem je fylogenetický strom, který by měl odpovídat příbuzenské hierarchii améb.
c) K stejnému účelu jako program PAUP (Swofford, 2003) slouží i RAxML (Stamatakis, 2006), s tím rozdílem, že tento program využívá komplikovanější algoritmus (ML – maximum likelihood). Vytvoření stromu pomocí RAxML (Stamatakis, 2006) slouží jako kontrola správnosti. Na metodě ML je založen i program MrBayes (Ronquist, Huelsenbeck, 2003), který však využívá zcela odlišný (stochastický) způsob hledání optimálního stromu, tzv. Bayeskou analýzu.

7) Prohlédnutí stromu (TreeView)
a) Vizualizace stromu v programu TreeView (Page, 1996) a jeho grafické úpravy jsou finálním krokem.

5 Výzkumná část

Sekvence pro fylogenetickou analýzu jsem získala prostřednictvím kultivace vybraných kmenů améb (akantaméby, neglérie), které pocházejí z parazitologického oddělení Jihočeské univerzity. Vykultivované améby jsem sklidila a izolovala jejich DNA, kterou jsem použila při míchání PCR.

Dalším důležitým mezikrokem byla elektroforéza. Ta ukazuje úspěšnost při izolaci DNA. Vzhled jedné z několika mnou spuštěných elektroforéz, ukazuje obrázek číslo 4, na kterém je vidět elektroforetický gel s několika fragmenty DNA.



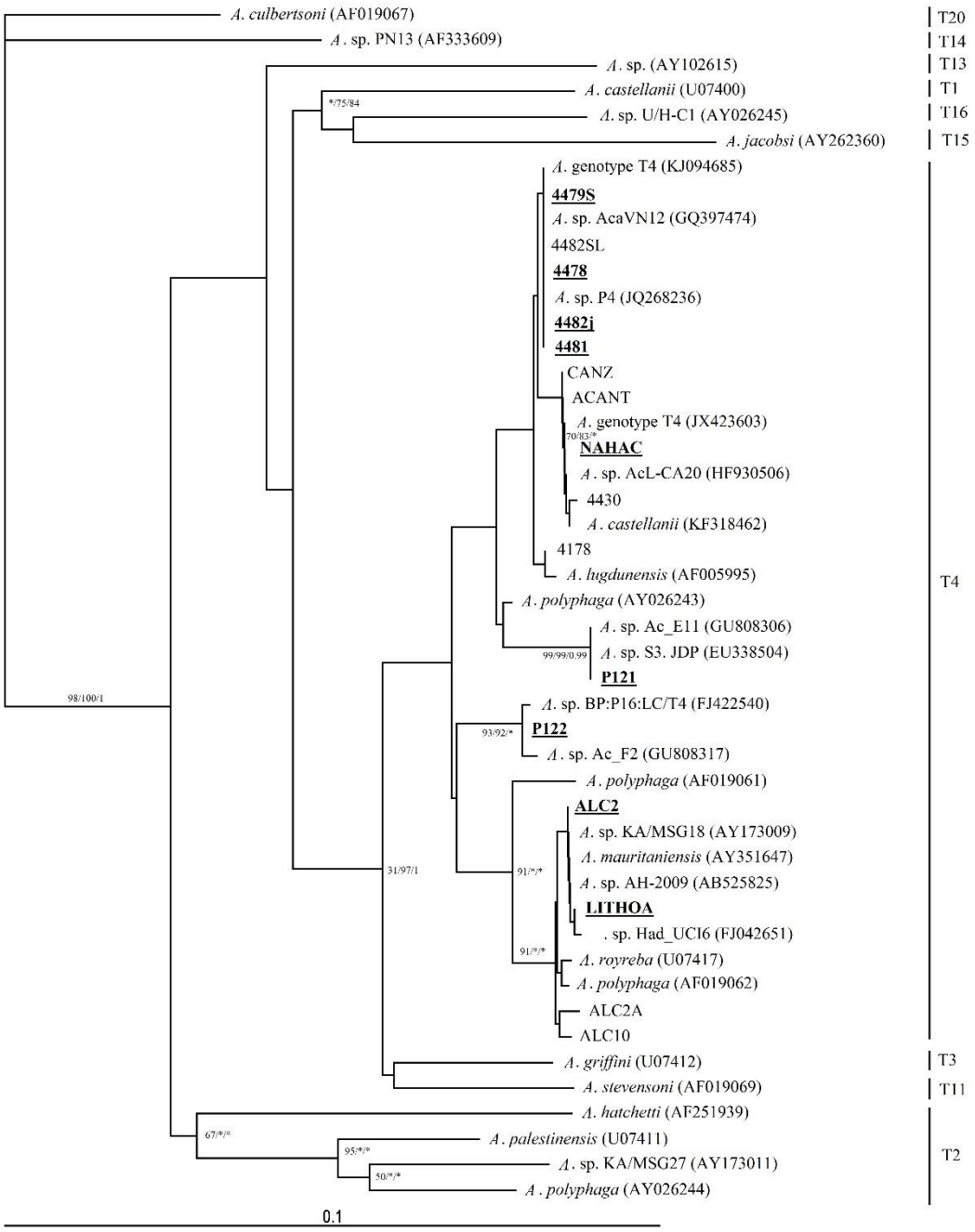
Obrázek 4: Výsledek elektroforézy zviditelněný pomocí UV lampy

Vlastní fotografie elektroforetického gelu

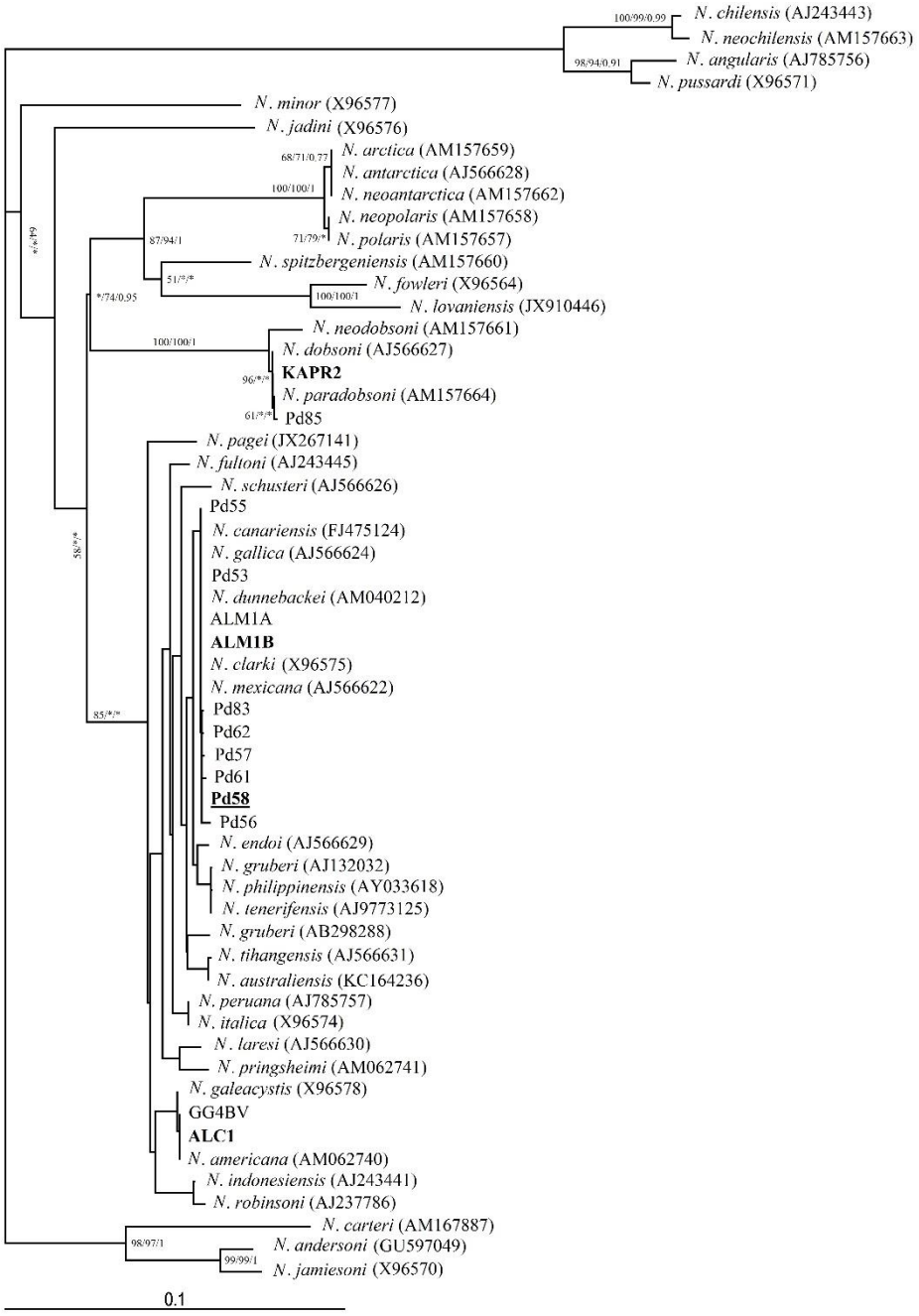
Sekvenaci PCR produktů jsem svěřila specializované firmě (Macrogen). Hotové sekvence jsem prohlédla a pro vytvoření fylogenetických stromů (akantamé, neglérií) použila jen ty s kvalitním signálem. Fylogenetický strom akantaméb (obr. 5) obsahuje 9 mnou získaných sekvencí, přičemž sekvence P122 je složena z 2 shodných sekvencí: P122A a P122B. Všechny mnou získané akantamébové sekvence se zařadily do genotypu T4. Do neglériového stromu (obr. 6) jsem začlenila 1 mnou vykultivovanou sekvenci (Pd 58) a 3 sekvence, které byly získány v laboratoři rybí parazitologie, ale nebyly dosud publikované (viz tab. 5). Protože patří do početné skupiny blízce příbuzných druhů (s výjimkou kmenu KAPR2), provedla jsem ještě jednu analýzu zaměřenou na tuto skupinu. Její výsledek je na obr. 7.

Tabulka 5: Seznam vzorků, jejichž sekvence jsou použity pro fylogenetickou analýzu

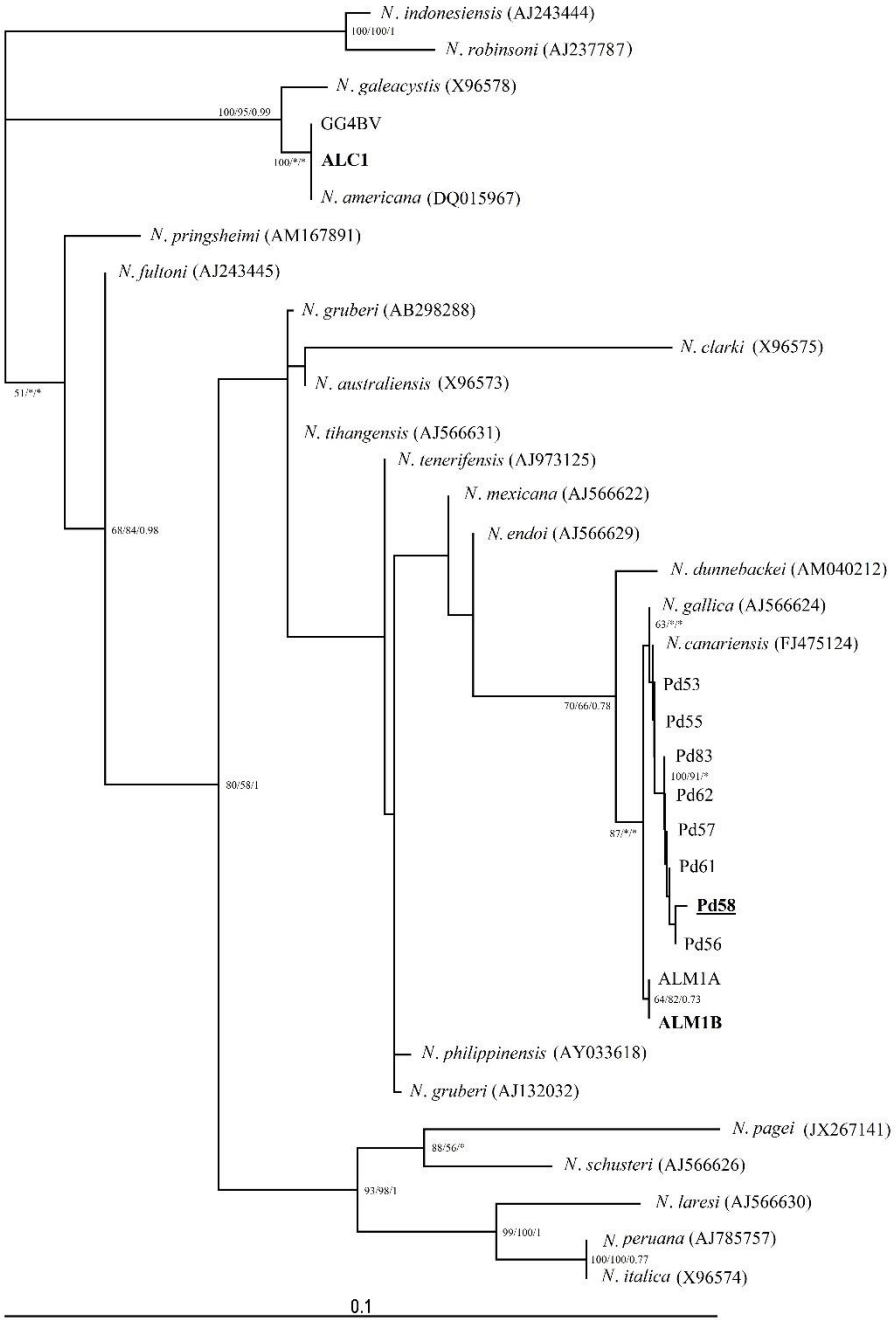
Typ améb	Název vzorku	Poznámka
ACANTHAMOEBY	4482j	
	4479S	
	4478	
	4481	
	NAHAC	
	P121	
	P122	Sekvence složená z P122A a P122B
	ALC2	Původně označená jako neglérie
	LITHOA	
NAEGLERIE	Pd58Z	
	ALM1B	Hotová sekvence
	KAPR2	Hotová sekvence
	ALC1	Hotová sekvence



Obrázek 5: Výsledný fylogenetický strom znázorňující vztahy mezi 47 kmeny akantaméb. Strom je konstruovaný pomocí metody neighbor joining (NJ). K ukotvení stromu jsem využila *A. culbertsoni* a *A.* sp. PN13. U jednotlivých větví je číselně vyjádřena statistická podpora formou hodnot bootstrapu NJ, maximum likelihood a posteriorních pravděpodobností Bayeské metody výpočtu. Hodnoty bootstrapu nižší než 50 resp. Posteriorní pravděpodobnosti nižší než 0,75 nejsou uvedeny, případně jsou nahrazeny hvězdičkou. Kmeny améb, ze kterých jsem získala v průběhu řešení této práce sekvenci já, jsou zvýrazněny tučným písmem a podtrženy.



Obrázek 6: Výsledný fylogenetický strom znázorňující vztahy mezi 57 kmeny neglérií. Strom je konstruovaný pomocí metody neighbor joining (NJ). Strom je ukotvený kmeny – *N. chilensis, N. neochilensis, N. angularis* a *N. pussardi*. U jednotlivých větví je číselně vyjádřena statistická podpora formou hodnot bootstrapu NJ, maximum likelihood a posteriorních pravděpodobností Bayeské metody výpočtu. Hodnoty bootstrapu nižší než 50 respektive posteriorní pravděpodobnosti nižší než 0,75 nejsou uvedeny, případně jsou nahrazeny hvězdičkou. Statistická podpora vnitřní části stromu je vyznačena v detailu téhož stromu. Kmeny améb, jejichž sekvence zatím nebyly zveřejněny, a které byly poprvé analyzovány v této práci, jsou zvýrazněny tučným písmem. Kmeny, ze kterých jsem získala v průběhu řešení této práce sekvenci já, jsou tučně zvýrazněny a podtrženy.



Obrázek 7: Detail výsledného fylogenetického stromu neglérií znázorňuje vztahy mezi 35 kmeny neglérií. Strom je konstruovaný pomocí metody neighbor joining (NJ). Strom je ukotvený pomocí *N. indonesiensis* a *N. robinsoni*. U jednotlivých větví je číselně vyjádřena statistická podpora formou hodnot bootstrapu NJ, maximum likelihood a posteriorních pravděpodobností Bayeské metody výpočtu. Hodnoty bootstrapu nižší než 50 respektive posteriorní pravděpodobnosti nižší než 0,75 nejsou uvedeny, případně jsou nahrazeny hvězdičkou. Kmeny améb, jejichž sekvence zatím nebyly zveřejněny, a které byly poprvé analyzovány v této práci, jsou zvýrazněny tučným písmem. Kmeny, ze kterých jsem získala v průběhu řešení této práce sekvenci já, jsou tučně zvýrazněny a podtrženy.

6 Diskuse

Zvolená metodika vedla dobře k získání akantamébových sekvencí. Použité primery (AcaJDP1, AcaJDP2) byly komplementární s cílovými úseky DNA a spolehlivě amplifikovaly potřebný fragment. Z 11 zkoumaných vzorků, kde byla předpokládána přítomnost akantaméb, jsem využila pro sestavení fylogenetického stromu 9 sekvencí (viz tabulka 2).

Akantaméby byly rozčleněny pomocí fylogenetické analýzy do genotypů T1 – T16. Rozčlenění dle genotypů se prokázalo i v dalších pracích. (Risler ed al., 2013; Qvarnstrom ed al., 2013; Schroeder ed al., 2011)Všechny mnou získané sekvence patří do genotypu T4.

Při získávání negleriových sekvencí jsem tak úspěšná nebyla. Použité primery (G-FOR, G-REV) nebyly funkční. Proto jsem v průběhu práce využila jiné primery amplifikující ITS oblast. Nové primery (NuF, NuR) byly účinnější, ale ne dostatečně. V budoucnu by bylo vhodné 1) pokusit se optimalizovat průběh PCR 2) designovat lepší primery účinné na dostatečné spektrum druhů neglerií 3) ověřit kvalitu izolované DNA a případně DNA izolovat znovu. Z celkového množství vzorků (9), s předpokládaným výskytem neglérií, jsem získala a zařadila do fylogenetického stromu pouze jednu sekvenci (Pd 58). Vzorek s názvem ALC1, který jsem původně na základě údajů databáze laboratoře rybí parazitologie kultivovala jako neglerii, se ukázal jako akantaméba. Buď šlo o nesprávný údaj v databázi, nebo byla kultura od počátku směsná a akantaméba „přerostla“ kokultivovanou neglérii.

Neglérie zahrnuté v datasetu jsem rozčlenila pomocí fylogenetické analýzy, dle příbuznosti. Celkový strom jsem ukotvila pomocí *N. chilensis*, *N. neochilensis*, *N. angularis* a *N. pussardi*. Ukotvené (ale i neukotvené) stromy se srovnatelnou topologií jsou publikované i v dalších pracích. (De Jonckheere, 1994, 2004; Dyková ed al., 2001)

K doplnění výzkumu jsem chtěla použít a molekulárně charakterizovat některé problematické vzorky, ze kterých byla DNA v laboratoři rybí parazitologie již izolována, ale sekvence se z nich, během předchozích projektů, nepodařilo získat. K tomuto účelu

jsem využila univerzálních eukaryotických primerů (Erib1, Erib10), avšak sekvence se mi z 11 testovaných vzorků nepodařilo získat. S největší pravděpodobností mohla být příčinou nízká kvalita izolované DNA, protože můj pokus o získání sekvencí nebyl u těchto vzorků prvním, navíc řada vzorků DNA byla skladována již léta. Další příčinou mohly být použité primery. Ty nemusely být komplementární s cílovým úsekem námi požadovaného genu (ten by byl u těchto améb aberantní). To by opět vysvětlovalo i neúspěšné předchozí pokusy.

Sekvence 4479S, 4478, 4482j, 4481 jsou shodné, leží tudíž na stejné větvi stromu. Tyto mnou zkoumané vzorky pocházejí z různých orgánů (játra, mozek, slezina) kapra obecného, chovaného ve VURH Vodňany. Shoda tudíž není překvapivá: jde o akantamébu schopnou invadovat různé tkáně kapra. Zbývající améby na téže větvi (sekvence KJ904685, GQ397474, JQ268236), pocházejí z Itálie, Slovenska a Brazílie. Různý geografický původ kmenů genotypu T4 prostředí značí adaptabilitu této améby a vysokou schopnost disperze, patrně ve formě cyst. Nejzajímavějším analyzovaným vzorkem této větve, je vzorek KJ094685, pocházející z Itálie. Sekvence pochází z klinického materiálu, což značí infekčnost této skupiny améb.

Vzorek s názvem NAHAC byl zařazen do skupiny akantaméb, které byly získány od pacientů s AK i ryb pocházející z České Republiky. To naznačuje potenciální patogenitu těchto améb. Je možné, že schopnost nakazit ryby koreluje se schopností infikovat lidi – lze si představit, že akantaméby se v rybách, s nimiž se setkávají patrně častěji, preadaptují i na jiné obratlovčí hostitele.

Další mou akantamébovou sekvencí je vzorek P121, pocházející z Peru. Dle srovnání NJ metodou je totožný s akantamébami pocházejícími z Tajvanu a Filipín. Jde tedy pravděpodobně o amébu přizpůsobenou tropickému klimatu a zároveň široce rozšířenou.

Vzorek P122 je složen ze sekvencí P122A a P122B, které byly odebrány v Peru. Podle fylogenetické analýzy je příbuzný akantamébě – FJ422540, která byla vykultivovaná ze vzorku pocházejícího od pacienta s keratitidou (USA), a GU808317 odebrané na Tajvanu. Sekvenovaná améba by tedy mohla být potencionálně patogenní.

Sekvence ALC2 byla odebraná na Tenerife, příbuzný vzorek LITHOA ze Středomoří – je to možná mořská akantaméba, možná jde však o akantamébu nacházející se v moři jen ve formě cyst. Všechny akantaméby této příbuznosti pocházejí z teplých oblastí (Tenerife, Kore, Iran, Izrael). Akantaméba je přizpůsobena teplejšímu klima. LITHOA má o něco větší příbuzenské spojení s akantamébou skrývající se pod kódem FJ042651, která byla izolována od pacienta s AK. LITHOA by mohla být potenciálně patogenní.

Pro fylogenetickou analýzu neglérií jsem využila hlavně dataset vytvořený ze sekvencí již dříve publikovaných neglérií. Ten jsem obohatila o vlastní sekvenci (Pd58) a tři dosud nezveřejněné sekvence (KAPR2, ALM1B, ALC1).

Hostitelem kmene s názvem KAPR2 je kapr obecný pocházejícího z chovného bazénu v České Republice. Podle fylogenetické analýzy je tento druh zařazen mezi neglérie pocházející z Austrálie a Antarktidy či Grónska. Pocházejí tedy z velmi různorodého prostředí. Navíc český vzorek parazituje na rybách, ale vzorek pocházející z Austrálie (*N. dobsoni*) byl izolován z čerstvé vody. Tento druh améb je tedy potencionálně patogenní pro obratlovce. Další améby, které jsou té naší příbuzné, jsou získány ze sedimentu v Grónsku nebo na Antarktidě. To naznačuje, že nebude příliš vázaný na teplé prostředí a jeho potenciál pro lidské nákazy je tudíž malý.

Mnou osekvenovaný vzorek je příbuzensky spjat s ostatními vzorky řady „Pd“, což není žádným překvapením, protože byly odebrány ve stejném místě (Benešov nad Černou) na chovné farmě pstruha duhového. Blíže příbuzné neglérie na stromu pocházejí z Francie a Brazílie – oba vykultivované z čisté vody. Pstruh obecný je citlivý na kvalitu vody.

Vzorek s názvem ALM1B je shodný se vzorkem ALM1A. Oba pocházejí z Tenerife. ALM1B byla získána seškrabem ze skály a ALM1A pochází ze sedimentu sladkovodní stružky.

Sekvence ALC1 pochází též z Tenerife (sediment stružky). Analýza ji shledala shodnou se vzorkem GG4BV a *N. americana*. GG4BV pochází ze závojnatky (chov v

ČR) a *N. americana* je půdní neglerií (jablečný sad USA). Jde tedy patrně o typicky amfizoickou amébu potencionálně patogenní pro ryby.

7 Závěr

V mé práci jsem se zabývala molekulární charakterizací vybraných améb (akantaméb, neglérií). Při zpracování práce jsem se řídila předem danými cíli práce. Teoreticky jsem shrnula morfologii a patogenitu neglérií a akantaméb. Popsala metodiku mého výzkumu a provedla fylogenetickou analýzu získaných sekvencí spolu se sekvencemi použitých datasetů. Výsledné fylogenetické stromy jsem prozkoumala, přičemž jsem se zaměřila na mnou získané sekvence.

Při získávání akantamébových sekvencí jsem byla úspěšná. V tomto případě jsem zvolila kompatibilní primery i optimální teploty pro PCR. Z 11 kultivovaných vzorků se mi podařilo získat 9 sekvencí.

Největší problém jsem měla se získáním sekvence neglérií. Z celkového množství vzorků, kde jsem předpokládala neglérie, se mi podařilo získat jen 1 kvalitní sekvenci – tu jsem zařadila do analýzy. Důvodů, proč se mi nepodařilo získat více sekvencí, může být více – teploty při PCR nemusely být ideální pro tyto neglérie, použité primery nebyly dostatečně kompatibilní s konkrétní ITS oblastí a mimo jiné šlo i o kvalitu získané DNA. V budoucnosti by chtělo prozkoumat tyto navržené možnosti.

Pro výslednou fylogenetickou analýzu jsem využila 9 mnou získaných akantamébových sekvencí a 1 negléríovou (spolu se 3 nezveřejněnými sekvencemi). Při prozkoumání příbuznosti akantaméb jsem zjistila, že některé z nich mají kosmopolitní rozšíření a můžeme je považovat za potencionální patogeny. Všechny se také řadí do genotypu T4, který je nejvíce zastoupen.

Mnou analyzované neglérie jsou více přizpůsobeny určitému prostředí, s výjimkou sekvence s názvem KAPR2, která je příbuzensky spjatá s negléríemi pocházejícími z Austrálie, Grónska a Antarktidy. Výsledná analýza naznačuje, že klasifikace améb (akantaméb, neglérií) ještě není jasně daná.

8 Seznam použitých zdrojů

ADL, S.M., SIMPSON, A.G.B., LANE, C.E., LUKEŠ, J., BASS, D., BOWSER, S.S., BROWN, M.W., BURKI, F., DUNTHORN, M., HAMPL, V., HEISS, A., HOPPENRATH, M., LARA, E., GALL, L.L., LYNN, D.H., MCMANUS, H., MITCHELL, E.A.D., MOZLEY-STANRIDGE, S.E., PARFREY, L.W., PAWLOWSKI, J., RUECKERT, S., SHADWICK, L., SCHOCK, C.L., SMIRNOV, A. and SPIEGEL, F.W. The Revised Classification of Eukaryotes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2012, 59(5), 429-493.

BÁRTA, J. Investigating phylogenetic relationships within the Apicomplexa using sequence data: the search for homology. *Methods*. 1997, 13(2), 81-88.

BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A. a VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie, bakteriologie, virologie, parazitologie*. Parazitologie. Vyd. 1. Praha: Marvil, 1996, 494-495.

CAVALIER-SMITH, T., FIORE-DONNO, A.M., CHAO, E., KUDRYAYTSEV, A., BERNEY, C., SNELL, E.A. and LEWIS, R. Multigene phylogeny resolves deep branching of Amoebozoa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2015, 83, 293-304.

CDC-1: Centers for Disease Control and Prevention. Parasites - Acanthamoeba - Granulomatous Amebic Encephalitis (GAE); Keratitis: Acanthamoeba Keratitis Fact Sheet [Health Professionals]. *Cdc* [online]. 2 November 2010 [cit. 2015 – 2 - 25]. Dostupné z: http://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/health_professionals/acanthamoeba_keratitis_hcp.html

CDC-2: Centers for Disease Control and Prevention. Parasites - Acanthamoeba - Granulomatous Amebic Encephalitis (GAE); Keratitis: Treatment. *Cdc* [online]. 22 August 2012 [cit. 2015 – 2 - 25]. Dostupné z: http://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/treatment.html

CLARKE, D.W. and NIEDERKORN, J.Y. The pathophysiology of Acanthamoeba keratitis. *TRENDS in Parasitology*. 2006, 22(4), 175-180.

COLEMAN, A.W. and VACQUIER, V.D. Exploring the phylogenetic utility of ITS sequences for animals: a test case for abalone (Haliotis). *Journal of Molecular Evolution*. 2002, 54(2), 246-257.

DART, J.K.G., SAW, V.P.J. and KILVINGTON, S. Acanthamoeba Keratitis: Diagnosis and Treatment. *American Journal of Ophthalmology*. 2009, 148, 487-499.

DE JONCKHEERE, J.F. Comparison of Partial SSUrDNA Sequences Suggests Revisions of Species Names in the Genus *Naegleria*. *European Journal of Protistology*. 1994, 30, 333-341.

DE JONCKHEERE, J.F. Molecular Definition and the Ubiquity of Species in the Genus *Naegleria*. *Protist*. 2004, 155, 89-103.

DE JONCKHEERE, J.F. Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infection, Genetics and Evolution*. 2011, 11, 1520-1528.

DYKOVÁ, I., KYSELOVÁ, I., PECKOVÁ, H., OBORNÍK, M. and LUKEŠ, J. Identity of *Naegleria* strains isolated from organs of freshwater fishes. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2001, 46, 115-121.

DYKOVÁ, I., LOM, J., SCHROEDER-DIETRICH, J.M., BOOTON, G.C. and BYERS, T.J. Acanthamoeba strains isolated from organs of freshwater fishes. *Journal of Parasitol*ogy. 1999, 85(6), 1106-1113.

DYKOVÁ, I., PECKOVÁ, H., FIALA, I. and DVORÁKOVÁ, H. Fish-isolated Naegleria strains and their phylogeny inferred from ITS and SSU rDNA sequences. *Folia Parasitologica*. 2006, 53(3), 172-180.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999, 41, 95-98.

KALININA, L.V., PAGE, F.C. Culture and preservation of naked amoebae. *Acta Protozoologica*. 1992, 31, 115-126.

KHAN, N.A. Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews*. 2006, 30, 564-595.

KIT-1: ROCHE s.r.o. *High Pure PCR Template Preparation Kit*. Version 20. 2012, 8-14.

KIT-2: ROCHE s.r.o. *High Pure PCR Product Purification Kit*. Version 16. 2010, 7-9.

KONG, H.H. Molecular Phylogeny of Acanthamoeba. *The Korean Journal of Parasitology*. 2009, 47, 21-28.

LARKIN, M.A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P.A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I.M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J. and HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007, 23, 2947-2948.

MA, P., VISVESVARA, G.S., MARTINEZ, A.J., THEODORE, F.H., DAGGETT, P.-M. and SAWYER, T.K. Naegleria and Acanthamoeba Infections: Review. *Review of Infectious Diseases*. 1990, 12(3), 490-513.

MAGLIANO, A.C.M., TEIXEIRA, M.M.G. and ALFIERI, S.C. Revisiting the Acanthamoeba species that form star-shaped cysts (genotypes T7, T8, T9, and T17): characterization of seven new Brazilian environmental isolates and phylogenetic inferences. *Parasitology*. 2011, 139, 45-52.

Maxdorf, s.r.o. Velký lékařský slovník. *Lekarske.slovniky* [online]. Praha: 2008 [cit. 2015 – 2 - 10]. Dostupné z: http://lekarske.slovniky.cz/

Molekulární biologie-1: BÁRTOVÁ, E. PCR (polymerázová řetězová reakce). In: Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE, VFU Brno. *Mmp.vfu* [online]. Brno: 2011 [cit. 2015 – 1 - 9]. Dostupné z: http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz

Molekulární biologie-2: BÁRTOVÁ, E. Gelová elektroforéza. In: Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE, VFU Brno. *Mmp.vfu* [online]. Brno: 2011 [cit. 2015 – 1 - 9]. Dostupné z: http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz

NAGYOVÁ, V., NAGY, A., JANEČEK, Š. and TIMKO, J. Morphological, physiological, molecular and phylogenetic characterization of new enviromental isolates of *Acanthamoeba* spp. from the region of Bratislava, Slovakia. *Biologia*. 2010, 65(1), 81-91.

National Library of Medicine. Basic Local Alignment Search Tool. *Blast* [online]. 29. Januar 2015 [cit. 2015 – 3 - 18]. Dostupné z: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

NOVÁK, K. Šestnáct obětí, překvapivý pachatel. Vzpomínka českého epidemiologa. *Vesmír*. 2014, 93, 489-491.

PAGE, R.D.M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*. 1996, 12, 357-358.

PÉLANDAKIS, M., SERRE, S. and PERMIN, P. Analysis of the 5.8S rRNA gene and the internal transcribed spacers in Naegleria spp. and in *N. fowleri*. *The Journal of eukaryotic mikrobiology*. 2000, 47(2), 116-121.

QVARNSTROM, Y., NERAD, T.A. and VISVESVARA, G.S. Characterization of a New Pathogenic *Acanthamoeba* Species, A. *byersi* n. sp., Isolated from a Human with Fatal Amoebic Encephalitis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2013, 60, 626-633.

RISLER, A., COUPAT-GOUTALAND, B. and PÉLANDAKIS, M. Genotyping and phylogenetic analysis of *Acanthamoeba* isolates associated with keratitis. *Journal of Parasitology Research*. 2013, 112, 3807-3816.

ROCHE s.r.o. The Evolution of PCR. In: Roche Molecular Systems Inc. *Molecular.roche* [online]. 30. 4. 2015 [cit. 2015 – 1 - 9]. Dostupné z: http://molecular.roche.com/pcr/Pages/default.aspx

RONQUIST, F., HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003, 19, 1572-1574.

ROSYPAL, S. *Úvod do molekulární biologie*. 3., inovované vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 2002, 1090-1108. ISBN 8090256244.

SHIBAYAMA, M., SERRANO-LUNA, J., CERVANTES-SANDOVAL, I. and TSUTSUMI, V. Naegleria. **In:** LIU, Dongyou. *Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2012, 871, 109-118. ISBN 978-1-4398-1242-6.

SCHROEDER, J.M., BOOTON, G.C., HAY, J., NISZL, I.A., SEAL, D.V., MARKUS, M.B., FUERST, P.A. and BYERS, T.J. Use of Subgenic 18S Ribosomal DNA PCR and Sequencing for Genus and Genotype Identification of *Acanthamoebae* from Humans with Keratitis and from Sewage Sludge. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011, 39(5), 1903-1911.

SMIRNOV, A.V., CHAO, E., NASSONOVA, E.S. and CAVALIER-SMITH, T. A Revised Classification of Naked Lobose Amoebae (Amoebozoa: Lobosa). *Protist*. 2011, 162, 545-570.

STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 2006, 22, 2688-2690.

SWOFFORD, D.L. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. *Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts*. 2003.

TOLAN, R.W. Amebic Meningoencephalitis Treatment & Management. *Medscape* [online]. 2015 [cit. 2015–3-20]. Dostupné z: http://emedicine.medscape.com/article/996227-treatment

TRNKOVÁ, K., MAĎAROVÁ, L. a KLEMENT, C. Je neglerióza verejno-zdravotnickym problémom? *HYGIENA*. 2008, 53(2), 53-59.

VISVESVARA, G. S., MOURA, H. and SCHUSTER, F.L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2007, 50, 1-26.

VOLF, P., HORÁK, P. a kol. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: TRITON, 2007, 120-121. ISBN 978-80-7387-008-9.