

JE NEGLERIÓZA VEREJNO-ZDRAVOTNÍCKYM PROBLÉMOM?

IS PRIMARY AMOEBIC MENINGOENCEPHALITIS (NAEGLERIASIS) A PUBLIC HEALTH PROBLEM?

KATARÍNA TRNKOVÁ, LUCIA MAĎAROVÁ, CYRIL KLEMENT

*Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Banskej Bystrici,
odbor lekárskej mikrobiológie*

SOUHRN

Neglerióza alebo primárna amébová meningoencefalitída (PAM) je zriedkavé ochorenie CNS, pôvodcom ktorého je voľne žijúca meňavka *Naegleria fowleri*.

Medzi stovkami voľne žijúcich meňaviek sú známe i ďalšie rody, ktorých zástupcovia sú schopní infikovať človeka a vyvolať u neho ochorenie. Za patogény sú považovaní zástupcovia rodov *Acanthamoeba* a *Naegleria* a druhy *Balamuthia mandrillaris* a *Sappinia diploidea*. Infekcie spôsobené týmito organizmami vyvolávajú u ľudí syndrómy v rozsahu od akútneho fatálneho ochorenia po chronické, tkanivá napadajúce infekcie s granulomatóznymi prejavmi. Epidemiológia, imunológia, patológia a klinické prejavy týchto infekcií sa vzájomne veľmi líšia. Príspevok podáva prehľad o pôvodcovi ochorenia PAM, o jeho morfológii, životnom cykle, ekológii ako aj o patogenéze, symptomatike a spôsoboch laboratórnej diagnostiky negleriózy.

Kľúčové slová: neglerióza, primárna amébová meningoencefalitída, epidemiológia, laboratórna diagnostika *Naegleria fowleri*

SUMMARY

Naegleriasis or primary amoebic meningoencephalitis (PAM) is invariably an acute, often fulminant infection of CNS caused by *Naegleria fowleri*, a small, free-living amoeba. Pathogenic free-living amoebae can cause serious illnesses in humans. The amoebae belonging to the genus *Naegleria*, *Acanthamoeba* and *Balamuthia mandrillaris* and *Sappinia diploidea* produce syndromes in man ranging from acute fatal disease to chronic tissue invasion with granulomatous manifestation. The purpose of this report is to describe the clinical history, treatment, pathology and methods of laboratory diagnostic of naegleriasis.

Key words: primary amoebic meningoencephalitis, naegleriasis, epidemiology, laboratory diagnostics of *Naegleria fowleri*

Úvod

Neglerióza alebo primárna amébová meningoencefalitída (PAM) je náhle, prudké a ťažko diagnostikovateľné ochorenie centrálného nervového systému, prejavujúce sa ako akútna hnisavá meningoencefalitída, ktorá nereaguje na bežnú antibiotickú liečbu. Fulminantný priebeh ochorenia spolu s náročnou, často nesprávnym smerom vedenou diagnostikou poskytujú málo času pre terapiu, preto väčšina prípadov končí fatálne.

Úmrtnosť je viac ako 95%, smrť nastáva obvykle v priebehu 7 dní po objavení sa prvých príznakov ochorenia. Do roku 2005 je známych len pár prípadov prežitia PAM (3, 4, 8, 49, 53, 61), pričom ojedinelé zvládnutie ochorenia je možné len veľmi skorým rozpoznaním pôvodcu ochorenia a následnou dôraznou terapiou.

Pôvodcom je prvok *Naegleria fowleri*, ktorá patrí medzi voľne žijúce meňavky. Sú to jednobunkové eukaryotické organizmy bežne sa vyskytujúce v rôznych typoch sladkovodného prostredia, ale i v pôde. Ich rezistentné cysty môžu byť transportované vzduchom.



Obr. 1: Trofozoit *Naegleria fowleri*, TEM. (<http://www.vcu.edu/micro/marciano.htm>)

Zástupcovia rodov *Naegleria*, *Acanthamoeba* a *Balamuthia* sú pôvodcami závažných ochorení a hoci počet zaznamenaných prípadov je vzhľadom ku všadeprítomnosti voľne žijúcich meňaviek v prírode nízky, predpokladá sa, že reálny dopad infekcií je oveľa vyšší, pretože ochorenia neboli rozpoznané alebo sú často chybné diagnostikované.

Nakoľko meňavky sú schopné prežívať v životnom prostredí ako voľne žijúce organizmy, ale za určitých podmienok sa môžu prispôsobiť parazitickému spôsobu života, nazývame ich tiež amfizoické meňavky.

Ďalší druh bežne sa vyskytujúci v pôde, *Sappinia diploidea*, donedávna nebol považovaný za patogénny pre ľudí. Prípád amébovej encefalitídy spôsobenej týmto druhom bol zaznamenaný v roku 2001 v USA (21). Keďže išlo o doposiaľ jediný prípad, je zovšeobecnenie, že tento druh je pôvodcom meňavkových encefalitíd, predčasné. Na druhej strane, tento prípad indikuje, že sa pravdepodobne medzi meňavkami objavujú nové druhy schopné vyvolávať ochorenia u ľudí, preto im treba venovať zvýšenú pozornosť.

Meňavky sú tiež prírodným rezervoárom niektorých klinicky významných patogénnych mikroorganizmov (napr. *Cryptococcus neoformans*, *Legionella* spp., *Chlamydia pneumoniae*, *Mycobacterium avium*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Francisella tularensis*).

Nákazy vyvolané amfizoickými meňavkami postihujú buď oko formou zápalu rohovky (akantamébová keratitída – AK) (45) alebo centrálny nervový systém (CNS) pod obrazom ložiskového zápalu mozgu (granulomatózna amébová encefalitída – GAE, BAE) (33). *Naegleria fowleri* je pôvodcom akútnej purulentnej meningoencefalitídy (PAM) nazývanej tiež neglerióza.

Podľa staršej klasifikácie organizmus patril medzi prvoky (Protozoa), kmeňa Rhizopoda, triedy Heterolobosea, radu Schizopyrenida, čeľade Vahlkampfiidae, rod *Naegleria* (46). Najnovšie poznatky výskumu molekulárnej biológie na základe analýz nukleových kyselín a proteínových komplexov však priniesli podstatné zmeny do systematiky prvokov a tým aj nahých meňaviek.

V novej schéme sú Eukaryota klasifikované v 6 ríšach: **Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata, Excavata** (40).

Meňavky zodpovedné za infekcie u ľudí sú v rámci tohto členenia umiestnené v ríši Amoebozoa a Excavata:

Naegleria fowleri v ríši Excavata: podríša Heterolobosea: kmeň Schizopyrena: čeľ. Vahlkampfiidae.

Acanthamoeba a *Balamuthia mandrillaris* v ríši Amoebozoa: podríša Lobosea: kmeň Acanthamoebinae: čeľ. Acanthamoebidae.

Sappinia diploidea v ríši Amoebozoa: podríša Lobosea: kmeň Flabellina: čeľ. Thecamoebidae (1, 40).

V súčasnosti je pre rod *Naegleria* opísaných a pomenovaných viac než 30 druhov (16). Medicínsky záujem je sústredený na jediný ľudský patogén *Naegleria fowleri*, morfológicky ťažko odlíšiteľný od bežne sa vyskytujúceho nepatogénneho zástupcu rodu *N. gruberi*.

N. australiensis spolu s *N. italica*, vykazujú patogénny potenciál, keďže sú schopné prežívať v endozoických podmienkach a sú patogénne pre myši.

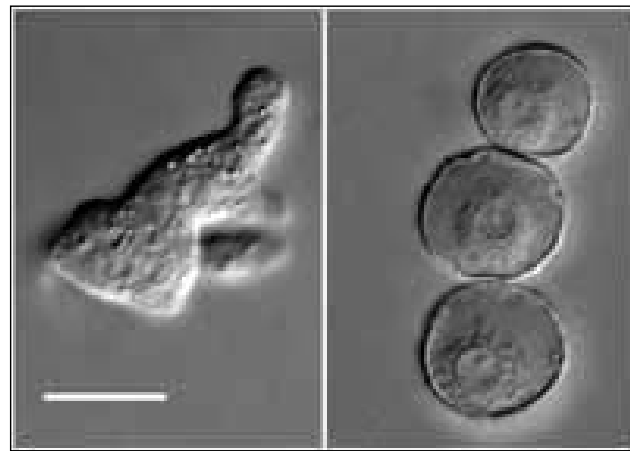
Životný cyklus

V prirodzených podmienkach sa vo vývinovom cykle *Naegleria fowleri* vyskytujú tri štádiá: trofozoit (množiace sa vegetatívne štádium), cysta (rezistentné kľudové štádium) a bičíkaté štádium.

Trofozoit je aktívna pohybujúca sa forma meňavky, schopná prijímať potravu, zhromažďovať zásobné látky v tele a rozmnožovať sa binárnym delením. Veľkosť trofozoitu je 10 až 25 µm. V cytoplazme, ktorá je diferencovaná na ekto- a endoplazmu, sa nachádza jedno jadro s centrálnym jadierkom, charakteristickým morfológickým znakom je nápadný prstenec kryštálických inklúzií okolo jadra. Endoplazma je jemne granulovaná

a nachádzajú sa v nej všetky organely typické pre stavbu eukaryotickej bunky.

N. fowleri je monopodiálna meňavka, tvorí jednu veľkú lalokovitú panôžku (pseudopódiu) plynulo vybiehajúcu z tela bunky. Pohybuje sa typickým prudkým erupčivým pohybom. Je to jediné infekčné štádium organizmu.



Obr. 2: *N. fowleri* - trofozoit a cysty, mierka 10 µm. (Foto B. Robinson, Australian Water Quality Centre a CRC for Water Quality Research)

Pri zmene vonkajších podmienok, v závislosti na povahe zmeny dochádza k transformácii meňavky – trofozoity encystujú alebo vytvoria prechodné bičíkaté štádium.

Pri zhoršení životných podmienok (nedostatok potravy, znížená vlhkosť, zvýšená teplota nad hranicu tolerancie trofozoitov, iný nepriaznivý stav) tvoria jednovrstvové, guľovité 7–15 µm cysty s pórmi, rezistentné voči vysychaniu a vplyvu chemických látok.

Pri dostatočnom zriedení prostredia vodou, špeciálnymi roztokmi solí (46) alebo veľmi zriedenými kyselinami, dochádza ku vzniku bičíkatého (flagelátového) štádia. Je oválneho tvaru s dvoma bičkami, veľkosti 6 až 14 µm a nedelí sa. Flageláty sa pohybujú trhavým alebo krúživým špirálovitým pohybom. Predpokladá sa, že štádium zabezpečuje distribúciu druhu v priestore v nepriaznivom období. Termofilná ameboflageláta je schopná žiť a množiť sa pri teplote nad 40 °C, ako voľne žijúci organizmus aj ako príležitostný patogén (16).

Ekológia a rozšírenie

Meňavky sú zastúpené v najrozmanitejších biotopoch, predovšetkým v pôde a v rôznych typoch sladkovodného prostredia a ich všadeprítomnosť je dôkazom zjavne veľmi nízkeho stupňa špecializácie. Boli izolované z jazier, prírodných termálnych prameňov, liečebných a rekreačných bazénov, z pitnej vody i z priemyselne otepľovaných tokov, odpadových vôd, vzduchu a klimatizačných zariadení (7, 15, 29, 38). Hoci poznatkov o geografickom rozšírení je málo, predpokladá sa kozmopolitnosť väčšiny druhov, o čom svedčí množstvo záznamov o virulentných kmeňoch voľne žijúcich druhov *Naegleria* spp. takmer z celého sveta.

Prieskumy druhovej diverzity meňaviek naznačili, že *N. fowleri* je častejšie prítomná v umelo vytvorených termálnych habitatoch v porovnaní s prírodným prostredím, kde majú prevahu iní zástupcovia nepatogénnych termofilných druhov (32, 30).

Naegleria spp. má vyššiu toleranciu na veľký rozsah teplôt, čo je pravdepodobne príčinou jej bohatého výskytu v termálnych vodách ako sú geotermálne pramene alebo priemyselné chladiace okruhy elektrární.

V Južnej Austrálii sa *N. fowleri* vyskytla aj vo verejnej vodovodnej sieti, kde bol preukázaný vplyv teploty a bakteriologického osídlenia. Podobný prípad zaznamenali v Arizone, kde nález *Naegleria fowleri* vo vodovodnej sieti súvisel s dvoma prípadmi PAM (2).

Vo vodách na kúpanie bola zdrojom nákazy v 16 prípadoch PAM *N. fowleri* a ďalšie termofilné *Naegleria* spp. boli nájdené v hojnom počte v pukline za poškodenou stenou bazéna (28). Hoci sa veľa písalo o prítomnosti *N. fowleri* v termálnych vodách, doposiaľ sa urobilo len málo výskumov v súvislosti s výskytom *Naegleria* spp. v nich. Prvá termofilná *Naegleria* spp. bola opísaná ako *N. lovaniensis*, ktorá je bežne rozšírená. Jej prítomnosť v životnom prostredí môže byť signálom, že nastali podmienky vhodné pre množenie *N. fowleri*.

Epidemiológia

PAM je pomerne zriedkavo sa vyskytujúce ochorenie, ale je zrejmé, že súvisí s využívaním vôd na kúpanie. Väčšina pacientov s PAM v anamnéze uvádza pár dní pred prepuknutím ochorenia kontakt s vodou pri aktivitách umožňujúcich vniknutie vody do nosovej dutiny, ktorá je vstupnou bránou infekcie do ľudského organizmu (19, 26, 39).

Ochorenie sa vyskytuje prevažne u zdravých detí a mladých ľudí a vo väčšine prípadov súvisí s kúpaním a potápaním v jazerách, nádržiach, riekach alebo bazénoch pred objavením sa prvých príznakov. Hoci obraz ochorenia a spôsob prenosu je dostatočne známy, ani zďaleka nie sú známe všetky rizikové faktory, ktoré rozvoj ochorenia ovplyvňujú. Nie sú známe štúdie, ktoré by potvrdili, či zvýšený výskyt ochorenia u mladých ľudí súvisí s ich správaním sa pri kúpaní a potápaní alebo s fyziologickými faktormi (hormonálne hladiny, imunologické vzťahy) (25).

Podľa údajov CDC (Centers for Disease Control and Prevention) sa priemerne v USA vyskytne 1–3 infekcie za rok (11). Do r. 2006 bolo takmer z celého sveta oznámených približne 200 prípadov, pričom Austrália, Československo a USA patria medzi krajiny, kde sa vyskytlo 75 % všetkých zaznamenaných prípadov ochorení.

Po prvýkrát zaznamenali prípady PAM u ľudí v roku 1965 Fowler a Carter v Austrálii a Butt v r. 1966 na Floride. Záujem neobišiel ani našu odbornú verejnosť, ktorá začala v tejto oblasti pracovať a publikovať. Najväčšiu svetovú epidémiu amébovej meningoencefalitídy z rokov 1962–1965 v Ústí nad Labem opísal Červa (12). V decembri 1977 *N. fowleri* bola izolovaná z vody počas bežnej hygienickej kontroly plaveckého bazénu, ktorý bol zdrojom pôvodcu infekcie v prípade tejto epidémie. Dva virulentné kmene *N. fowleri*, ktorých patogenita bola potvrdená testom na myšiach, boli izolované z vypúšťacieho žľabu a následne z ďalších miest plaveckého komplexu (schodíky, sedimenty z dna bazénu a z povrchu filtrov recirkulačného systému). Ďalším skúmaním bolo zistené, že vnútorná čelná stena v hĺbke bola prasknutá a vytvorila sa za ňou dutina, v ktorej sa *Naegleria fowleri* nachádzala vo vysokých koncentráciách, teplota vody tu bola okolo 27–30 °C a bola relatívne chránená voči vplyvu dezinfekcie.

Pernin and Riany (48) vo svojej štúdii 9 plaveckých bazénov v Lyone (Francúzsko) zistili, že 90 % zo 44 vzoriek vody odobratých z bazénov bolo kontaminovaných meňavkami. Väčšina izolátov patrila do rodov *Acanthamoeba* a *Hartmannella*, ale v jednom z bazénov bola potvrdená prítomnosť r. *Naegleria*.

Wellings et al. (62) zistili, že viac ako 60 % Floridských jazier bolo pozitívnych na prítomnosť *N. fowleri*.

De Jonckheere (18) skúmal 1 vonkajší a 15 vnútorných plaveckých bazénov v Belgicku na prítomnosť meňaviek. Z izolátov získaných z 13 bazénov 43,6 % patrilo do r. *Acanthamoeba*. Rod *Naegleria* bol zistený v 7,3 % izolátov, ale *N. fowleri* nebola zaznamenaná v žiadnej zo vzoriek.

Gogate and Deodhar (22) predstavili štúdiu 12 plaveckých bazénov, 6 malých rybníkov, nádrží a 3 jazier v Bombai, India. *N. fowleri* bola izolovaná z 1 vzorky plaveckého bazénu. Rivera et al. (52) vyšetroval vzorky troch termálnych kúpeľných bazénov v Mexiku a získal skupinu 33 kmeňov FLA patriacich do r. *Naegleria*, *Acanthamoeba* a *Willaertia*. Z nich 20 kmeňov patrilo do rodu *Naegleria* a z tých 16 bolo klasifikovaných ako *Naegleria* spp., 2 ako *N. lovaniensis*. Dva druhy *N. australiensis* a *N. lovaniensis*, ktoré boli determinované, môžeme považovať za dobré indikačné organizmy pri zisťovaní prítomnosti *N. fowleri* (24).

Prepuknutie a symptómy ochorenia PAM

Vstupnou bránou infekcie je nosná dutina. Vdýchnutie vody obsahujúcej dostatočnú koncentráciu meňaviek umožní ich preniknutie cez sliznicu nosa a prichytenie na čuchový neuroepitel, odkiaľ pozdĺž čuchového nervu prenikajú do mozgu. Sú známe prípady, keď sa ochorenie objavilo po vdýchnutí infekčných cýst prítomných v prachových časticách (39). Inkubačná doba je 2–7 dní. Nie sú známe žiadne faktory predispozície, ktoré by boli potrebné k prepuknutiu infekcie u ľudí. Infekcia je pravdepodobne nadobudnutá priamo kontaktom so životným prostredím (kontakt s vodou, pôdou). Infekčnosť ochorenia nebola zaznamenaná, žiadny prenos z človeka na človeka alebo prostredníctvom vektorov doposiaľ nebol zistený (63).

Ako klinická tak i epidemiologická anamnéza vykazujú charakteristické, nie však špecifické klinické príznaky PAM. Hyperakútny priebeh je sprevádzaný v prvotnej fáze narastajúcimi bolesťami hlavy, diskomfortom horných ciest dýchacích, príležitostne sa objavujú problémy čuchového ústrojenstva. Akútna fáza zahŕňa tiež bolesti v krku, horúčkavité stavy, zvracanie. Postupne ako symptómy pretrvávajú nastupuje letargia, zmätenosť a tuhnutie šije, kŕče až kóma (23, 36).

PAM je charakterizovaná obojstrannou bolesťou hlavy v oblasti čelovej a spánkovej, horúčkami, nevoľnosťou, zvracaním, rýchlym nástupom meningeálnych príznakov signalizujúcich postihnutie čuchového, ale i čelného a spánkového mozgového laloka, prípadne mozočka. Nasleduje kóma a smrť obvykle 3–6 dní od objavenia sa prvých príznakov ochorenia. V anamnéze je významný kontakt s vodou, najmä s oteplenou – bazény, termálne vody, výtoky z elektrární a pod. Klinický obraz je podobný akútnej bakteriálnej meningitíde, s nešpecifickými symptómami: progredujúca cefalea, horúčka, nauzea, zvracanie, faryngitída, konvulzie, meningeálne prízna-

ky (hlavne opozícia šije), poruchy chuti a čuchu, ataxia, fotofóbia, príznaky zvýšeného intrakraniálneho tlaku, generalizované či parciálne záchvaty. Nejasné znaky a symptómy meningitídy sú neskôr potvrdené CT a MR zobrazovaním, pričom CT nálezy v mozgu pri podozrení na PAM sú nešpecifické: difúzny edém. Krvný obraz a biochémia sú v norme.

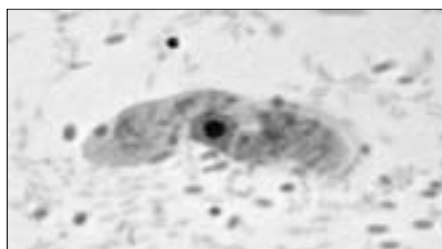
Sпособы лабораторной диагностики неглерии

K správnej identifikácii negleriózy, či už *intra vitam* alebo *post mortem*, je potrebné na ňu myslieť a indikovať špeciálne vyšetrenie zamerané na dôkaz meňaviek.

Pri podozrení na PAM (symptómy + anamnéza) sú základnými diagnostickými nástrojmi priame mikroskopické pozorovanie čerstvo odobratého, nechladeného mozgovomiechového moku a dôkaz prítomnosti *N. fowleri* vo vzorkách mozgovomiechového moku kultiváciou.

Микроскопия

Medzi základné mikroskopické metódy dôkazu prítomnosti *N. fowleri* vo vyšetrovaných vzorkách patrí natívny preparát. Mikroskopický nález meňaviek v čerstvo odobratom mozgovomiechovom moku môže obsahovať pohyblivé trofozoity v mikroskopickom obraze, pričom typický erupčný pohyb je v protiklade k pomaly sa pohybujúcim leukocytom, ktoré môžu byť v likvore prítomné. Lumbálna punkcia vykazuje zvýšenú hladinu proteínov, hlavne polymorfonukleárných leukocytov, hladina glukózy je v norme až znížená, prítomnosť erytrocytov, pleocytóza s prevahou neutrofilov, prítomnosť trofozoitov *N. fowleri*, absencia baktérií a fungi. Po zafarbení trichromom – trofozoity belasé, vezikulárne jadro karmínovočervené.



Obr. 3: *N. fowleri*, trichrom.
(Foto K. Trnková)

Культивация (мозговомиехового мoku, vzoriek tkanív z biopsie alebo autopsie)

Kultivácia je vykonávaná pri teplote 37 °C a 42 °C na pevných alebo v tekutých kultivačných médiách (53).

Post mortem diagnostika

Nález meňaviek v histologickom sekčnom materiáli a ich identifikácia nepriamou imunoflourescenciou.

Flagelátový test

Pomocnou identifikačnou metódou je flagelátový test, ktorý slúži na dôkaz prítomnosti bičíkatých štádií vo vzorke likvoru. Vzorku zriedime v malom množstve destilovanej vody a suspenziu pravidelne sleduje vo vlh-

kom preparáte pod mikroskopom. Približne po 30 min. až 2 hodinách sa objavujú bičíkaté štádiá. Mnohé práce ale poukazujú na fakt, že nie všetky patogénne kmene *N. fowleri* vytvárajú bičíkaté štádiá, preto tento test nie je spoľahlivým identifikačným nástrojom (5).

Nakoľko ani flagelátový test nie je dostatočný dôkazový prostriedok, práve pre možnosť falošnej negativity, musí byť doplnený o ďalšie dôkazové metódy: ELISA, test patogenity na zvierati, DNA sondy, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (dôkazová metóda založená na rozdielnych restričných profiloch jednotlivých druhov rodu *Naegleria*), či PCR a to i v prípade, že flagelátový test bol negatívny. Serológia je v prípade PAM bez významu, vzhľadom na rýchle prepuknutie a priebeh ochorenia, protilátky vykazujú nízke alebo žiadne titre. Dôkaz protilátok zo séra u ľudí testom ELISA podáva teda len potvrdenie diagnózy zväčša *post mortem*.

Test patogenity na zvierati

Pokiaľ sú izoláty meňaviek získané z klinických vzoriek, je jednoznačné, že ide o patogénne kmene. Vo vzorkách zo životného prostredia schopnosť týchto organizmov prežívať pri teplotách 37 °C a vyšších je predpokladom, že môžu byť patogénne aj pre človeka. Meňavky izolované v týchto vzorkách môžu byť však i napriek termotolerancii a flagelátovému testu nepatogénne. Na determináciu patogenity jednotlivých kmeňov slúži test patogenity na zvierati. Dokazuje sa na myšiach po predchádzajúcej inokulácii (14, 25), kedy dochádza k usmrteniu po 1–4 týždňoch, v závislosti od virulencie jednotlivých kmeňov. Toto vyšetrenie je však pomerne náročné a v bežnej laboratórnej diagnostickej praxi sa na Slovensku nevyužíva.

Молекулярно-биологическая диагностика

Dôkazovú metódu identifikácie pomocou DNA sond opísali Sparagano v roku 1993 a taktiež Kilvington a Beeching v roku 1995. Jedná sa o rýchlu dôkazovú metódu, pomocou ktorej je možné detegovať *Naegleria fowleri* po predložení izolácii z prostredia. V genomickej DNA sa musí nájsť unikátna sekvencia, ktorá charakterizuje práve tento druh, naklonuje sa do vhodného vektora a slúži ako DNA sonda, ktorá hybridizuje ku komplementárnej sekvencii vo vzorke (31).

Prítomnosť *N. fowleri* vo vzorke je možné dokázať taktiež metódou RFLP. Táto metóda je založená na rozdielnych restričných profiloch jednotlivých druhov rodu *Naegleria*, ktoré vznikajú po predchádzajúcej izolácii celkovej DNA a po štiepení DNA restričnými endonukleázami (17, 42). Výhodou tejto metódy je skutočnosť, že je možné pomocou nej súčasne nielen stanoviť prítomnosť *N. fowleri*, ale taktiež určiť prítomnosť iných druhov rodu *Naegleria*.

Všetky vyššie spomínané metódy sú však pomerne časovo náročné (kultivácia), finančne nákladné (RFLP), vyžadujú zložitú manipuláciu (test patogenity) a poskytujú len dodatočnú a neskorú identifikáciu (kultivácia, ELISA), resp. nedostatočnú identifikáciu, ktorá musí byť doplnená o ďalšie dôkazové metódy (flagelátový test).

Pomocou PCR je možné nielen stanoviť prítomnosť rodu *Naegleria* vo vyšetrovaných vzorkách ale tiež odlíšiť

Naegleria fowleri od ostatných druhov rodu *Naegleria*. Navyše PCR metodiky sú aplikovateľné tak na vyšetrenie klinických vzoriek ako aj environmentálnych vzoriek. Nespornou výhodou je fakt, že DNA je možné izolovať priamo z klinického materiálu, či z vyšetrovanej vody bez predošlej kultivácie, čím sa značne zníži časová náročnosť (34). PCR metodiky sú nenáročné na manipuláciu a poskytujú spoľahlivé výsledky už za niekoľko hodín. V súčasnosti sa v diagnostike *Naegleria fowleri* využívajú najmä konvenčné PCR metódy (41, 56, 31, 30), nested PCR metódy (51, 37, 34), multiplex PCR metódy (47) a real-time PCR (5, 6).

Verejné zdravotníctvo

V Slovenskej republike požiadavky na kvalitu vôd na kúpanie ustanovujú povinnosť monitorovať prítomnosť voľne žijúcich meňaviek vo vodách na kúpanie. Monitoring a vývoj legislatívy SR z hľadiska sledovania prítomnosti voľne žijúcich meňaviek v plaveckých komplexoch prešiel nasledovným vývojom.

R. 1986: v rámci Hlavných úloh hlavného hygienika Slovenskej republiky bola vykonaná Analýza hygienických podmienok rekreácie na verejných kúpaliskách v SSR sledovanie výskytu améb skupiny limax.

R. 2002 vstúpila do platnosti Vyhláška MZ SR č. 30 o požiadavkách na vodu na kúpanie, kontrolu kvality vody na kúpanie a na kúpaliská, ktorá stanovila ukazovatele kvality vody na kúpanie, ich medzné hodnoty a rozsah a početnosť kontroly kvality vody. Pre bazény umelých kúpalísk sa stanovuje povinnosť sledovať termotolerantné améby (TTA) s medznou hodnotou „nepřítomné“ v 10 ml s frekvenciou sledovania 1x za 2 mesiace. Améby sa vyšetrujú z vody a zo sedimentov bazénu a sterov zo stien bazénu.

R. 2004 vstúpila do platnosti Vyhláška MZ SR č. 146/2004 ktorou sa mení a dopĺňa Vyhláška MZ SR č. 30/2002 Z.z. kde medzi biologické indikátory kvality vody sú pre bazény umelých kúpalísk zaradené termotolerantné améby.

1. 6. 2006 vstúpila do platnosti Vyhláška MZ SR č. 252/2006 Z.z. o podrobnostiach o prevádzke kúpalísk a podrobnostiach o požiadavkách na kvalitu vody kúpalísk, vody na kúpanie a jej kontrolu, v ktorej ako biologické indikátory kvality vody sú pre bazény umelých kúpalísk stanovené améby kultivovateľné pri 36 °C a améby kultivovateľné pri 40 °C.

1. 9. 2007 nadobudol účinnosť Zákon NR SR č. 355/2007 Z.z. o ochrane, podpore a rozvoji verejného zdravia a o zmene a doplnení niektorých zákonov, ktorý upravuje aj podmienky kontroly kvality vôd. Problematika monitorovania kvality vôd na kúpanie v prírodných kúpacích oblastiach je zosúladená s legislatívou EÚ. Monitorovanie kvality vôd bazénov umelých kúpalísk budú riešené osobitne novým vykonávacím predpisom, ktorý zohľadní aj požiadavky kladené na kvalitu vôd podľa predpisov Európskej únie.

Naegleria fowleri ako možná biologická zbraň

Nevieme presne čo napomáha rozvinutiu ochorenia u ľudí, aké sú predpoklady nadobudnutia infekcie. Je známe, že ochorenie sa rozvinie aj u celkom zdravých

jedincov akoby náhodne, prevažne po kontakte s vodou, vdýchnutím vody cez dutinu nosa. Početné nálezy meňaviek rodu *Naegleria* v epidemiologických štúdiách izolované z nosohltanových výterov u zdravých jedincov indikujú možnosť vzduchom nesenej infekcie (13, 54). Aj tento fakt predurčil zaradiť *N. fowleri* do skupiny možných biologických agens.

V roku 2001 na zasadnutí Ad hoc pracovnej skupiny k Dohovoru o zákaze, vývoji, výrobe a hromadení bakteriologických (biologických) a toxínových zbraní a o ich ničení, bol predložený pracovný materiál BWC/AD HOC GROUP/56-2. V tabuľke A3.1 Najčastejšie citované biologické agens, ktoré možno zneužiť ako možné biologické zbrane, je v časti PROTOZOA zaradená *Naegleria fowleri* a ochorenie B60.2 neglerióza.

Tento dodatok poskytuje informácie o jednotlivých pôvodcoch infekcií vymenovaných v tabuľke, ktorá obsahuje reprezentatívne skupiny pôvodcov ochorení vyvolávajúcich prirodzene sa vyskytujúce ľudské ochorenia, hlavne v endemických regiónoch a v populáciách bez prístupu k primeraným hygienickým podmienkam, vhodným potravinovým zdrojom, veterinárnym a medicínskym komplexom, bez rozvinutého manažmentu verejného zdravotníctva.

Naegleria fowleri a *Naegleria australiensis* vyvolávajú primárnu amébovú meningoencefalitídu. *Naegleria fowleri* pritom vyvoláva hemoragický typ meningoencefalitídy s letalitou 97 %. Vstupnou bránou nákazy je sliznica nosovej dutiny. Agens by mohol byť použitý v biologickej vojne vo forme aerosólu (43).

Diskusia a záver

Súvislosť oportúnnej patogénnej meňavky *N. fowleri* s rekreačnými vodami je zjavná. Prírodné i umelé vodné telesá môžu predstavovať zdroj týchto infekcií, predovšetkým s ohľadom na predpoklady rozvinutia ochorenia PAM, ktoré je v priamej súvislosti s kúpaním a potápaním sa, preto má sledovanie výskytu virulentných kmeňov význam ako účinný preventívny prostriedok. Všeobecné preventívne opatrenia z pohľadu verejného zdravotníctva by sa mali zamerať na bezpečnosť a efektívnosť hygienického režimu na kúpaliskách určených širokej verejnosti: primeraná a nepretržitá dezinfekcia, filtrácia a/alebo recirkulácia vody bazénov a ich vyhovujúci technický stav sú hlavnou podporou bezpečnej prevádzky plaveckých komplexov. Praktické opatrenia na zníženie rizika infekcií vyvolaných voľne žijúcimi meňavkami zahŕňajú okrem technických opatrení aj informovanie verejnosti o zdravotných rizikách spojených s kúpaním a pobytom na kúpaliskách.

Analýzy vzoriek zo životného prostredia môžu poskytnúť epidemiologicky významné výsledky (identifikácia zdroja nedávnej infekcie, predvídanie rizika vzniku ochorenia) (10, 37).

Predpoklady, že ide o evolučne aktívnu skupinu so schopnosťou osídľovať nové biotopy adaptáciou na zmenené životné podmienky v rôznych typoch prostredia po celom svete naznačujú, že význam týchto prvokov ako pôvodcov ochorení bude ešte narastať.

Regionálne úrady verejného zdravotníctva v Slovenskej republike sa problematikou termotolerantných améb z terénneho a laboratórneho hľadiska dlhodobo zaoberajú. Do budúcnosti je žiadúce zamerať sa na skvalitnenie

diagnostiky molekulárno-biologickými metodami, aby sa zefektívnila diagnostika, čo by napomohlo rozhodovacím procesom regionálnych hygienikov.

LITERATÚRA

- Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol.* 2005 Sep-Oct;52(5):399-451.
- Amann J, et al. *Naegleria fowleri* in a drinking water system: two fatal cases of primary amebic meningoencephalitis - Arizona. In: Parasitic and vector-borne diseases. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2005.
- Anderson K, Jamieson A. Primary amebic meningoencephalitis. *Lancet.* 1972 Aug 19;2(7773):379.
- Apley J, Clarke SK, Roome AP, Sandry SA, Saygi G, Silk B, et al. Primary amebic meningoencephalitis in Britain. *Br Med J.* 1970 Mar 7;1(5696):596-9.
- Behets J, Seghi F, Declerck P, Verelst L, Duvivier L, Van Damme A, et al. Detection of *Naegleria* spp. and *Naegleria fowleri*: a comparison of flagellation tests, ELISA and PCR. *Water Sci Technol.* 2003;47(3):117-22.
- Behets J, Declerck P, Delaet Y, Verelst L, Ollevier F. A duplex real-time PCR assay for the quantitative detection of *Naegleria fowleri* in water samples. *Water Res.* 2007 Jan;41(1):118-26.
- Brown TJ, Cursons RTM, Keys EA, Marks M, Miles M. The occurrence and distribution of pathogenic free-living amoebae in thermal areas of the North Island of New Zealand. *NZ J Mar Freshwater Res.* 1983;17:59-69.
- Brown RL. Successful treatment of primary amebic meningoencephalitis. *Arch Intern Med.* 1991 Jun;151(6):1201-2.
- Butt CG. Primary amebic meningoencephalitis. *N Engl J Med.* 1966 Jun 30;274(26):1473-6.
- Cabanes PA, Wallet F, Pringuez E, Pernin P. Assessing the risk of primary amebic meningoencephalitis from swimming in the presence of environmental *Naegleria fowleri*. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Jul;67(7):2927-31.
- CDC.gov [homepage on the Internet]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention [cited 2007 Dec 12]. Available from: www.cdc.gov.
- Červa L, Novák K. Amebic meningoencephalitis: sixteen fatalities. *Science.* 1968 Apr 5;160(8323):92.
- Červa L, Serbus C, Skočil V. Isolation of limax amoebae from the nasal mucosa of man. *Folia Parasitol.* 1973;20(1):97-103.
- Červa L. Laboratory diagnosis of primary amebic meningoencephalitis and methods for the detection of limax amoebae in the environment. *Folia Parasitol.* 1980;27(1):1-9.
- Červa L, Kasprzak W, Mazur T. *Naegleria fowleri* in cooling waters of power plants. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1982 26(2):152-61.
- De Jonckheere JF. A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozool.* 2002;41(4):309-42.
- De Jonckheere JF. Characterization of *Naegleria* species by restriction endonuclease digestion of whole-cell DNA. *Mol Biochem Parasitol.* 1987 May;24(1):55-66.
- De Jonckheere JF. Occurrence of *Naegleria* and *Acanthamoeba* in aquaria. *Appl Environ Microbiol.* 1979 Oct;38(4):590-3.
- Dorsch MM, Cameron AS, Robinson BS. The epidemiology and control of primary amebic meningoencephalitis with particular reference to South Australia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983;77(3):372-7.
- Fowler M, Carter RF. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *Br Med J.* 1965 Sep 25;2(5464):740-2.
- Gelman BB, Popov V, Chaljub G, Nader R, Rauf SJ, Nauta HW, et al. Neuropathological and ultrastructural features of amebic encephalitis caused by *Sappinia diploidea*. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003 Oct;62(10):990-8.
- Gogate A, Deodhar L. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria fowleri* (aerobia) from a swimming pool in Bombay. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985;79(1):134.
- Gutierrez Y. Diagnostic pathology of parasitic infections with clinical correlations. Philadelphia: Lea and Febiger; 1990.
- Hallenbeck HW, Brenniman GR. Risk of fatal amebic meningoencephalitis from waterborne *Naegleria fowleri*. *Environ Manage.* 1989;13(2):227-32.
- John DT. Opportunistically pathogenic free-living amoebae in parasitic protozoa. In: Kreier P, Baker JR, editors. Parasitic protozoa. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1993. p. 143-246.
- John DT. Primary amebic meningoencephalitis and the biology of *Naegleria fowleri*. *Annu Rev Microbiol.* 1982;36:101-23.
- Kadlec V, Škvárová J, Červa L, Nebáznivá D. Virulent *Naegleria fowleri* in indoor swimming pool. *Folia Parasitol.* 1980;27(1):11-17.
- Kadlec V, Červa L, Škvárová J. Virulent *Naegleria fowleri* in an indoor swimming pool. *Science* 1978 Sep 15;201(4360):1025.
- Kasprzak W, Mazur T, Červa L. *Naegleria fowleri* in thermally polluted waters. *Folia Parasitol.* 1982;29:211-8.
- Kilvington S, Beeching JR. Detection of a novel restriction fragment length polymorphism type in *Naegleria fowleri* (free-living amoeba) isolates from electricity power stations in England and France. *Eur J Protistol.* 1997;33:186-91.
- Kilvington S, Beeching JR. Development of a PCR for identification of *Naegleria fowleri* from the environment. *Appl Environ Microbiol.* 1995 Oct;61(10):3764-7.
- Kilvington S, Mann PG, Warhurst DC. Pathogenic *Naegleria amoebae* in the waters of Bath: a fatality and its consequences. In: Kellaway GA, editor. Hot springs of Bath. Bath: Bath City Council; 1991. p. 89-96.
- Kodet R, Nohýnková E, Tichý M, Soukup J, Visvesvara GS. Amebic encephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris* in Czech child: description of the first case from Europe. *Pathol Res Pract.* 1998;194(6):423-9.
- MacLean RC, Richardson DJ, LePardo R, Marciano-Cabral F. The identification of *Naegleria fowleri* from water and soil samples by nested PCR. *Parasitol Res.* 2004 Jun;93(3):211-7.
- Maďarová L, Klement C. Využitie molekulárno-biologických metód v mikrobiologických laboratóriách verejného zdravotníctva I. *Hygiena.* 2006;51(3-4):110-5.
- Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev.* 2003 Apr;16(2):273-307.
- Marciano-Cabral F, MacLean R, Mensah A, LaPat-Polasko L. Identification of *Naegleria fowleri* in domestic water sources by nested PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Oct;69(10):5864-9.
- Marciano-Cabral F. Biology of *Naegleria* spp. *Microbiol Rev.* 1988 Mar;52(1):114-33.
- Martinez AJ, Visvesvara GS. Free-living, amphizoic and opportunistic amoebas. *Brain Pathol.* 1997 Jan;7(1):583-98.
- Matis D, Tirjaková E, Feriancová-Masárová Z, Hensel K. Prehľad zoologického systému. 11. vyd. Bratislava: Katedra zoológie PF UK; 2007.
- McLaughlin GL, Vodkin MH, Huizinga HW. Amplification of repetitive DNA for the specific detection of *Naegleria fowleri*. *J Clin Microbiol.* 1991 Feb;29(2):227-30.
- McLaughlin GL, Brandt FH, Visvesvara GS. Restriction fragment length polymorphisms of the DNA of selected *Naegleria* and *Acanthamoeba* amoebae. *J Clin Microbiol.* 1988 Sep;26(9):1655-8.
- Mezencev R. Biologické zbrane - technológia, výroba, účinky a spôsoby použitia. In: Klement C, Mezencev R, editors. Verejno-zdravotnícke aspekty biologických zbraní I. Bratislava: Slovenská zdravotnícka univerzita; 2007. s. 509.

44. Nariadenie vlády SR č.252/2006 o podrobnostiach o prevádzke kúpalísk a podrobnostiach o požiadavkách na kvalitu vody kúpalísk, vody na kúpanie a jej kontrolu. Zbierka zákonov. 2006 Apr 5;čiasťka 90:1518-27.
45. Ondriska F, Mrva M, Lichvár M, Žiak P, Murgašová Z, Nohýnková E. First cases of *Acanthamoeba keratitis* in Slovakia. Ann Agric Environ Med. 2004;11(2):335-41.
46. Page FC. A new key to freshwater and soil *Gymnamoebae*. Ambleside (UK): Freshwater Biological Association; 1988.
47. Pélandakis M, Pernin P. Use of multiplex PCR and PCR restriction enzyme analysis for detection and exploration of the variability in the free-living amoeba *Naegleria* in the environment. Appl Environ Microbiol. 2002 Apr;68(4):2061-5.
48. Pernin P, Riany A. Study on the presence of free-living amoebae in the swimming-pools of Lyon. Ann Parasitol Hum Comp. 1978 Jul-Aug;53(4):333-44. (In French.)
49. Pongvarin N, Jariya P. The fifth nonlethal case of primary amoebic meningoencephalitis. J Med Assoc Thai. 1991 Feb;74(2):112-5.
50. Protocol to the Convention on the Prohibition of the Development, Production and Stockpiling of Bacteriological (Biological) and Toxin Weapons and on Their Destruction, BWC/AD HOC GROUP/56-2, Annex B, 2001a. Bradford: Bradford Disarmament Research Centre; 2001.
51. Réveiller FL, Cabanes PA, Marciano-Cabral F. Development of a nested PCR assay to detect the pathogenic free-living amoeba *Naegleria fowleri*. Parasitol Res. 2002 May;88(5):443-50.
52. Rivera F, Cerva L, Martinez J, Keleti G, Lares F, Ramirez E, et al. *Naegleria lovaniensis tarasca* new subspecies, and the purepecha strain, a morphological variant of *N. l. lovaniensis*, isolated from natural thermal waters in Mexico. J Protozool. 1990 Jul-Aug;37(4):301-10.
53. Seidel JS, Harmatz P, Visvesvara GS, Cohen A, Edwards J, Turner J. Successful treatment of primary amoebic meningoencephalitis. N Engl J Med. 1982 Feb 11;306(6):346-8.
54. Shin HJ, Im KI. Pathogenic free-living amoebae in Korea. Korean J Parasitol. 2004 Sep;42(3):93-119.
55. Schuster FL. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. Clin Microbiol Rev. 2002 Jul;15(3):342-54.
56. Sparagano O. Differentiation of *Naegleria fowleri* and other *Naegleriae* by polymerase chain reaction and hybridization methods. FEMS Microbiol Lett. 1993 Jul 1;110(3):325-30.
57. Sparagano O. Detection of *Naegleria fowleri* cysts in environmental samples by using a DNA probe. FEMS Microbiol Lett. 1993 Sep 15;112(3):349-51.
58. Visvesvara GS, Mirra SS, Brandt FH, Moss DM, Mathews HM, Martinez AJ. Isolation of two strains of *Acanthamoeba castellanii* from human tissue and their pathogenicity and isoenzyme profiles. J Clin Microbiol. 1983 Dec;18(6):1405-12.
59. Vyhláška MZ SR č. 30/2002 o požiadavkách na vodu na kúpanie, kontrolu kvality vody na kúpanie a na kúpaliská. Zbierka zákonov. 2002 Jan 9;čiasťka 15:253-60.
60. Vyhláška MZ SR č.146/2004 ktorou sa mení a dopĺňa Vyhláška MZ SR č.30/2002 Z.z. o požiadavkách na vodu na kúpanie, kontrolu kvality vody na kúpanie a na kúpaliská. Zbierka zákonov. 2004 Jan 26;čiasťka 69:1670-5.
61. Wang A, Kay R, Poon WS, Ng HK. Successful treatment of amoebic meningoencephalitis in a Chinese living in Hong Kong. Clin Neurol Neurosurg. 1993 Sep;95(3):249-252.
62. Wellings FM, Amuso PT, Chang SL, Lewis AL. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria* from Florida lakes. Appl Environ Microbiol. 1977 Dec;34(6):661-7.
63. Wiser MF. Drug design strategies for the control of parasitic infections. ID Wkly Highlights. 2000 Nov;47:29-31.
64. Zákon NR SR č.355/2007 o ochrane, podpore a rozvoji verejného zdravia a o zmene a doplnení niektorých zákonov. Zbierka zákonov. 2007 Jun 21;čiasťka 154:2402-75.

Ing. Katarína Trnková
Regionálny úrad verejného zdravotníctva
so sídlom v Banskej Bystrici
Odbor lekárskej mikrobiológie
Cesta k nemocnici 1
975 56 Banská Bystrica
E-mail: katarina.trnkova@vzbb.sk