

## Fluorescenčný rozjasňovač Rylux – alternatíva ku Calcofluor White pre fluorescenčnú vizualizáciu cýst akantaméb

Martin Mrva, Mária Garajová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra zoológie, Bratislava

Patogénne kmene amfizoických meňaviek rodu *Acanthamoeba* sú pôvodcami závažných ochorení – granulomatóznej amébovej encefalitídy (GAE) a akantamébovej keratitídy (AK). V napadnutých tkanivách zvyčajne encystujú. Pre rýchlu identifikáciu patogéna je vhodná detekcia cýst v odobratej vzorke alebo kultúre aplikáciou fluorescenčných rozjasňovačov (optických bieličov). Okrem štandardne používaného fluorochrómu Calcofluor White (CFW) možno využiť jeho analóg Rylux, ktorý sa rovnako nešpecificky viaže na polysacharidy v stene cýst akantaméb a jednoduchou aplikáciou poskytuje jej optimálnu vizualizáciu.

**Kľúčové slová:** *Acanthamoeba*, cysty, Rylux, fluorescenčný rozjasňovač

### Fluorescent brightener Rylux – an alternative to Calcofluor White for fluorescent visualization of *Acanthamoeba* cysts

Pathogenic strains of amphizoic amoebae of the genus *Acanthamoeba* are the causative agents of serious diseases – granulomatous amoebic encephalitis (GAE) and *Acanthamoeba* keratitis (AK). *Acanthamoebae* usually encyst in the infected tissues. For rapid pathogen identification, detecting cysts in the collected sample or culture by applying fluorescent brighteners (fluorescent whitening agents) is suitable. In addition to the standardly used fluorochrome Calcofluor White (CFW), it is possible to use its analogue Rylux, which also non-specifically binds to polysaccharides in the *Acanthamoeba* cyst wall and provides its optimal visualization by simple application.

**Keywords:** *Acanthamoeba*, cysts, Rylux, fluorescent brightener

NewsLab, 2023; roč. 14 (S): 71 – 72

### Úvod

Amfizoické meňavky rodu *Acanthamoeba* Volkonsky, 1931 sú pôvodcami závažných a ťažko liečiteľných ochorení človeka: zväčša fatálnej granulomatóznej amébovej encefalitídy (GAE), systémových a kožných infekcií u imunodeficitných pacientov a bolestivého progresívneho ochorenia rohovky u imunokompetentných osôb – akantamébovej keratitídy (AK)<sup>(1)</sup>. Životný cyklus akantaméb pozostáva z pohyblivého štádia trofozoita a dormantnej cysty, ktorá sa vyznačuje dvojrstvovou stenou obsahujúcou celulózu v oboch vrstvách<sup>(2)</sup>. Súčasná klasifikácia rodu *Acanthamoeba* je založená na analýze 18S rDNA a zahŕňa 23 genotypov, pričom najčastejšie býva z klinických vzoriek izolovaný genotyp T4<sup>(3)</sup>. Pre základnú diagnostiku v klinickej praxi je však dôležitá najmä rýchla identifikácia patogéna priamo v odobratej vzorke alebo v kultúre, k čomu prispieva charakteristická morfológia cýst akantaméb definovaná dvojrstvovou stenou. Jednou z vhodných metód vizualizácie steny cýst je aplikácia fluorescenčných rozjasňovačov (optických bieličov). V prípade akantaméb sa využíva fluorochróm Calcofluor White (CFW), nešpecificky sa viažuci na celulózu a chitín<sup>(4)</sup>. K menej známym dostupným analógom CFW patrí aj Rylux, ktorý sa štandardne využíva pri vizualizácii spór mikrosporídií v klinických vzorkách<sup>(5)</sup>. V našej práci sme sa zamerali na jeho aplikáciu na cysty akantaméb.

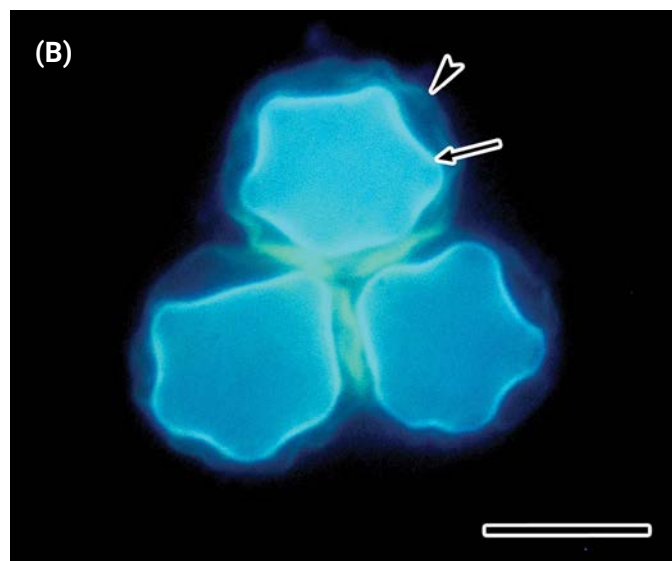
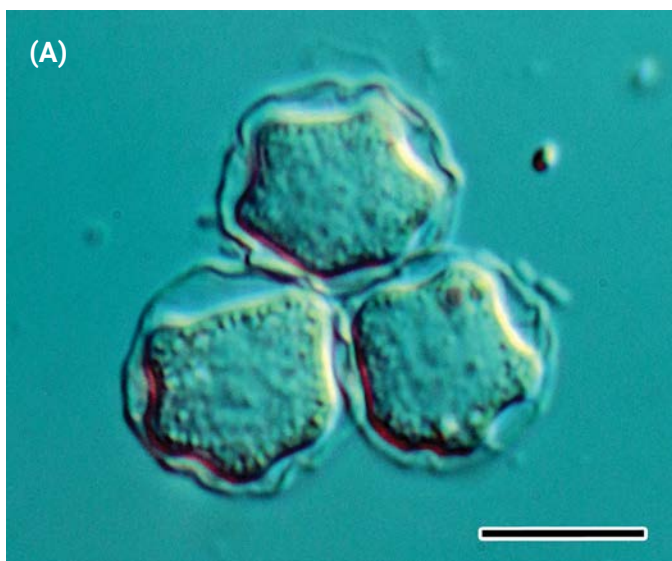
### Materiál a metodika

Izolát *Acanthamoeba* sp. bol kultivovaný na beznutričnom agare s *Escherichia coli*. Vizualizácia dvojrstvovej steny cýst izolátu bola zrealizovaná intravitálnym farbením s fluorescenčným rozjasňovačom Rylux (Ostacolor, Pardubice, Česká republika), ktorý je derivátom kyseliny diaminostilbendisulfónovej, na základe modifikácie metodiky Vávra et al.<sup>(6)</sup>. Zásobný roztok bol pripravený ako 10<sup>-2</sup> % koncentrácia Ryluxu v modifikovanom Neffovom roztoku (AS)<sup>(7)</sup>. Kvapka pripraveného roztoku bola zmiešaná so suspenziou kultúry akantaméb, obsahujúcej vitálne trofozoity a cysty, priamo na krycom sklíčku. Po príprave tzv. visiacej kvapky bola táto suspenzia okamžite mikroskopovaná pomocou epifluorescenčného mikroskopu Leica DM 2500 s filtrom DAPI (excitačné spektrum 300 – 400 nm, dichroické zrkadlo 400 nm, emisné spektrum 410 – 510 nm) a so snímaním záberov pomocou Canon EOS 600D.

### Výsledky

Po aplikácii roztoku Ryluxu nedošlo k zafarbeniu trofozoitov, ktoré boli v suspenzii. Vitálne zrelé cysty však boli charakteristické výraznou modrou fluorescenciou dvojrstvovej steny so zreteľnou separáciou endocysty a ektocysty, typickou pre druhy skupiny II. Endocysta bola typická intenzívnym fluorescenčným signálom, zatiaľ čo ektocysta prejavila slabú fluorescenciu (**obrázok 1**).

**Obrázok 1.** Farbenie cýst izolátu *Acanthamoeba* sp. intravitálnou aplikáciou fluorochrómu Rylux. (A) Cysty v interferenčnom kontraste. (B) Rovnaká skupina cýst vo fluorescenčnom zobrazení. Zvltná ectocysta je typická slabou fluorescenciou (hrot šípky), polyedrická endocysta sa vyznačuje výraznou fluorescenciou (šípka). Mierka je 10  $\mu$ m.



## Diskusia

Pre rýchlu detekciu cýst akantaméb pomocou fluorescenčnej mikroskopie sa odporúča farbenie fluorescenčnými rozjasňovačmi<sup>(4)</sup>. Aplikovaný Rylux, ktorý je analógom Calcofluor White, sa viaže nešpecificky na polysacharidy obsiahnuté v oboch stenách cýst. Intenzívny fluorescenčný signál je charakteristický pre endocystu obsahujúcu vysoký podiel celulózy. V ectocyste je obsah celulózy nižší, z čoho vyplýva nižšia intenzita fluorescencie<sup>(2)</sup>. Získané výsledky sú v zhode s výsledkami po aplikácii CFW na cysty akantaméb<sup>(6)</sup>. Okrem diagnostického využitia možno využiť Rylux aj na detekciu pseudocýst pri experimentoch testovania potenciálne amebicídnych zlúčenín<sup>(9)</sup>. Pseudocysty, ktoré sú výsledkom rýchlej obrannej reakcie trofozoitov, sa vyznačujú odlišnou stavbou glykokalyxu než trofozoity a fluores-

cenčnými rozjasňovačmi ich možno zreteľne odlíšiť od morfológicky podobných nezrelých cýst s už nasyntetizovanou ectocystou<sup>(10)</sup>.

## Záver

V prípade vizualizácie cýst akantaméb predstavuje Rylux vhodnú a dostupnú alternatívu ku Calcofluor White. Výhodou je aj jednoduchšia a rýchlejšia metodika aplikácie, pri ktorej nie je potrebná predchádzajúca fixácia.

## Pod'akovanie

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-19-0056.

## LITERATÚRA

1. Cope JR, Ali IK, Visvesvara GS. Pathogenic and opportunistic free-living ameba infections. In: Ryan ET, Hill DR, Solomon T, et al. (Eds) Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases, 10th Ed. Elsevier Inc 2020: 814–820.
2. Garajová M, Mrva M, Vašková N, et al. Cellulose fibrils formation and organisation of cytoskeleton during encystment are essential for *Acanthamoeba* cyst wall architecture. *Sci Rep* 2019; 9: 4466.
3. Putaporntip C, Kuamsab N, Nuprasert W, et al. Analysis of *Acanthamoeba* genotypes from public freshwater sources in Thailand reveals a new genotype, T23 *Acanthamoeba bangkokensis* sp. nov. *Sci Rep* 2021; 11: 17290.
4. Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite* 2015; 22: 10.
5. Valenčáková A, Sučík M. Alternatives in molecular diagnostics of *Encephalitozoon* and *Enterocytozoon* infections. *J Fungi* 2020; 6: 114.
6. Vávra J, Dahbiová R, Hollister WS, et al. Staining of microsporidian

7. Page FC. A new key to freshwater and soil gymnamoebae. *Ambleside: Freshwater Biological Association* 1988.
8. Lorenzo-Morales J, Kliescikova J, Martinez-Carretero E, et al. Glycogen phosphorylase in *Acanthamoeba* spp.: Determining the role of the enzyme during the encystment process using RNA interference. *Eukaryot Cell* 2008; 7: 509–517.
9. Garajová M, Mrva M, Timko L, et al. Cytomorphological changes and susceptibility of clinical isolates of *Acanthamoeba* spp. to heterocyclic alkylphosphocholines. *Exp Parasitol* 2014; 145: S102–S110.
10. Kliescikova J, Kulda J, Nohynkova E. Stress-induced pseudocyst formation – a newly identified mechanism of protection against organic solvents in acanthamoebae of the T4 genotype. *Protist* 2011; 162: 58–69.

doc. RNDr. Martin Mrva, PhD.

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra zoológie  
Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava  
e-mail:martin.mrva@uniba.sk