

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Kateřina Pacandová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914P360004

Kateřina Pacandová

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914P360004

LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA TOXOPLAZMÓZY

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Karel Fajfrlík, Ph.D.

PLZEŇ 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 28. 3. 2023.

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Kateřina Pacandová

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Laboratorní diagnostika toxoplazmózy

Vedoucí práce: RNDr. Karel Fajfrlík, PhD.

Počet stran – číslované: 45

Počet stran – nečíslované: 17

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 24

Klíčová slova: *Toxoplasma gondii*, toxoplazmóza, parazit, laboratorní diagnostika, EIA

Souhrn:

Tato bakalářská práce se zabývá především laboratorní diagnostikou parazita *Toxoplasma gondii*. Teoretická část obsahuje informace o možnostech nákazy, epidemiologickém výskytu a také je zde stručně popsána prevence a možnosti léčby. Velkou kapitolou jsou pak samotné možnosti stanovení, které se dělí na: přímé metody, imunodiagnostiku a molekulární diagnostiku. V praktické části je podrobně popsána metoda EIA pro IgG, IgM a IgA, kterou byl získán soubor výsledků, následně graficky zpracovaných. Data byla sbírána ve Fakultní nemocnici Plzeň oddělení mikrobiologie – parazitologie za rok 2022.

Abstract

Surname and name: Kateřina Pacandová

Department: Department of Rescue Services, Diagnostics Fields and Public Health

Title of thesis: Laboratory diagnosis of toxoplasmosis

Consultant: RNDr. Karel Fajfrlík, PhD.

Number of pages – numbered: 45

Number of pages – unnumbered: 17

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 24

Keywords: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis, parasite, laboratory diagnostics, EIA

Summary:

This thesis primarily describes the laboratory diagnosis of the *Toxoplasma gondii* parasite. The theoretical part contains information about the possibilities of infection, epidemiologic occurrence, but also prevention and treatment options. A great part of the thesis describes the determination methods that are divided into: direct methods, immunodiagnosis and molecular diagnosis. In the practical part of the thesis, the EIA method used on IgG, IgM and IgA is described. A set of results was obtained using this method, that is later analyzed and processed. The data set has been obtained in the microbiology-parasitology department of the University Hospital in 2022.

Předmluva

Tato bakalářská práce byla napsána za účelem přiblížení problematiky toxoplazmózy a shrnout doposud známé informace o ní. I přes popularizaci tohoto tématu v laické veřejnosti dochází k šířením chybných informací a screening bývá často opomíjen. Cílem práce je proto vyhodnocení výsledků pacientů vyšetřených na přítomnost parazita a následné vyvození důsledků v souladu s riziky, které s sebou toto onemocnění nese.

Poděkování

Děkuji panu RNDr. Karlu Fajfrlíkovi, PhD., za odborné vedení práce, poskytování rad a materiálních podkladů. Dále děkuji panu Ing. Janu Váverkovi za konzultace ohledně technické stránky věci.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	11
SEZNAM ZKRATEK	12
ÚVOD.....	13
TEORETICKÁ ČÁST	14
1 BIOLOGIE PARAZITA.....	14
1.1 Obecná specifikace	14
1.2 Taxonomie	14
1.3 Životní cyklus	15
2 EPIDEMIOLOGIE TOXOPLAZMÓZY	16
2.1 Alimentární cesta přenosu	16
2.2 Transplacentární cestou	17
2.3 Ostatní způsoby přenosu	17
3 FORMY ONEMOCNĚNÍ	18
3.1 Vrozená toxoplazmóza	18
3.1.1 Vrozená oční toxoplazmóza	19
3.2 Získaná toxoplazmóza	19
3.2.1 Chronická toxoplazmóza	20
3.2.2 Oční toxoplazmóza.....	20
3.2.3 Nervová forma toxoplazmózy	20
3.2.4 Uzlinová forma toxoplazmózy	21
3.2.5 Abdominální forma toxoplazmózy.....	21
3.2.6 Postižení plic	22
3.2.7 Postižení kardiovaskulární soustavy.....	22
3.2.8 Vzácné formy a komplikace	22
4 MOŽNOSTI LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY	23
4.1 Přímé metody	23
4.1.1 Izolace parazita	23
4.1.2 Buněčné kultury.....	23
4.1.3 Histologie a cytologie	24
4.2 Imunodiagnostika.....	24
4.2.1 Sabinova – Fieldmanova reakce (dye test)	24
4.2.2 Hemaglutinační reakce	25
4.2.3 Modifikovaný aglutinační test (MAT)	25
4.2.4 Nepřímá imunofluorescence (IFI)	26
4.2.5 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	26

4.2.6	Komplement-fixační reakce (KFR).....	28
4.2.7	Test avidity	29
4.2.8	Western blot.....	29
4.2.9	Imunocytochemie	30
4.3	Molekulární diagnostika	30
4.3.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	30
4.3.2	PCR v reálném čase (real - time PCR)	31
4.3.3	LAMP metoda	31
5	TERAPIE.....	32
6	PREVENCE.....	33
6.1	Všeobecné zásady	33
6.2	Opatření pro ohrožené skupiny.....	33
PRAKTICKÁ ČÁST		34
7	CÍL A ÚKOLY PRÁCE	34
7.1	Hlavní cíl.....	34
7.2	Dílčí cíle.....	34
8	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY	35
9	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	36
10	METODIKA PRÁCE	37
10.1	Detekce protilátek EIA metodou pro IgG	37
10.1.1	Úvod	37
10.1.2	Princip testu	37
10.1.3	Složení soupravy, skladování a expirace	37
10.1.4	Příprava pracovních roztoků.....	38
10.1.5	Zpracování vzorků.....	38
10.1.6	Pracovní postup	39
10.1.7	Validita testu.....	40
10.1.8	Hodnocení výsledků	41
10.1.9	Interference	41
10.1.10	Index avidity	41
10.2	Detekce protilátek EIA metodou pro IgM a IgA.....	42
10.2.1	Úvod	42
10.2.2	Princip testu	42
10.2.3	Složení soupravy, skladování a expirace	42
10.2.4	Příprava pracovních roztoků.....	43
10.2.5	Zpracování vzorků.....	43
10.2.6	Pracovní postup	43

10.2.7	Validita testu.....	44
10.2.8	Hodnocení výsledků	45
10.2.9	Interference a zkřížená reaktivita	45
11	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	46
11.1	Věk pacientů.....	46
11.2	Výsledky dle KFR.....	47
11.3	Výsledky u vyšetření imunoglobulinů	50
11.4	Vyhodnocení výsledků gravidních žen	53
	DISKUZE	55
	ZÁVĚR.....	57
	SEZNAM LITERATURY	58
	SEZNAM PŘÍLOH	61
	PŘÍLOHY	62
	Příloha 1: Povolení sběru informací ve FN Plzeň	62

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Histogram věku pacientů	46
Graf 2: Relativní četnost pohlaví.....	46
Graf 3: Pozitivita podle KFR - celkově	47
Graf 4: Pozitivita podle KFR - pohlaví	48
Graf 5: Hodnocení pozitivních výsledků.....	49
Graf 6: Pozitivita podle IgM a IgA - celkově.....	50
Graf 7: Pozitivita podle IgM a IgA - pohlaví	51
Graf 9: Závislost přítomnosti IgG na hodnotě titru	52
Graf 10: Histogram věku těhotných žen.....	53
Graf 11: Pozitivita podle KFR - Těhotné ženy.....	54
Graf 12: Hodnocení pozitivních výsledků - Těhotné ženy.....	54

SEZNAM ZKRATEK

DNA.....	Deoxyribonucleic Acid
CNS.....	Centrální nervová soustava
MHC	Major histocompatibility complex
HIV	Human Immunodeficiency Virus
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
Ig	Imunoglobulin
PCR.....	Polymerase Chain Reaction
EKG	Elektrokardiogram
ELISA	Enzyme – linked Immunosorbent Assay
MAT.....	Modified Agglutination Test
IFI.....	Indirect Immunofluorescence
KFR.....	Komplement fixační reakce
LAMP	Loop-mediated Isothermal Amplification
dNTP.....	Deoxyribonukleosidtrifosfát
BARF.....	Bones and Raw Food
TMB.....	Tetramethylbenzidine
µm	Mikrometr
µl	Mikrolitr
nm	Nanometr
ml	Mililitr
FN Plzeň	Fakultní nemocnice Plzeň

ÚVOD

Pojem toxoplazmóza je v populaci neodmyslitelně spjat s kočkovitými šelmami, které jsou konečným hostitelem v životním cyklu parazita *Toxoplasma gondii*. Málokdo ale ví, že mezihostitelem se může stát prakticky jakýkoliv teplokrevný živočich. Cest přenosu infekce je celá řada, avšak správnou hygienou a screeningovým vyšetřením lze předejít možným důsledkům. Nejvýznamnější dopad má toxoplazmóza na děti infikovaných matek, kde rozeznáváme mnoho forem onemocnění. Naštěstí existuje řada testů a stanovení pro odhalení nákazy od jednoduchých histologických vyšetření, přes aktuálně používané EIA metody až k velmi komplexním a moderním metodám jako je PCR.

Téma laboratorní diagnostiky toxoplazmózy jsem si zvolila vzhledem k mému velkému zájmu o obor mikrobiologie. Má volba se opírala také o fakt, že jsem se v laické veřejnosti setkávala s nepravdivými informacemi o této problematice, proto jsem se rozhodla vést vlastní výzkum a sepsat dostupné poznatky.

V praktické části mé bakalářské práce se budu věnovat zejména výskytu prvoka *T. gondii* v Plzeňském kraji za rok 2022, kde dále výsledky přehledně zpracuji a vyhodnotím.

TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOLOGIE PARAZITA

1.1 Obecná specifikace

Toxoplazmóza je onemocnění způsobené parazitem, který se nazývá *Toxoplasma gondii*, známý též jako kokcidie kočičí.

T. gondii se může vyskytovat ve třech infekčních stádiích. Prvním z nich je tachyzoit, který je velice invazivní a dokáže se rychle dělit. Dále pomalu se dělicí bradyzoit, obsažen v tkáňových cystách a posledním stádiem je sporozoit, který je odolný vůči vnějšímu prostředí díky jeho uzavření v oocystě. (6)

Buňky infekčního stádia toxoplazmózy jsou 5 μm dlouhé, 2 μm široké a mají tvar půlměsíce se špičatým vrchním koncem. Ohraničeny jsou složitou membránou, nazývanou pelikula. K pelikule je připojen cytoskelet, udržující integritu buňky. *T. gondii* dále obsahuje orgány jako: jádro, mitochondrie, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, ribozomy a specifickou organelu zvanou apikoplast, která obsahuje vlastní kruhovou DNA. V mikroskopu lze pozorovat také oocysty, kulaté útvary s jemnými skvrnami, velké asi 12 - 13 μm , které po sporulaci obsahují dvě sporocysty, vyplňující většinu buňky. V každé ze sporocyst se vyskytují čtyři sporozoity. (6) (18)

1.2 Taxonomie

T. gondii je eukaryotická buňka. Patří do podkmene výtrusovců neboli apicomplexa, třídy conoidasida a podtřídy kokcidie. Dále do řádu eucoccidiorida a podřádu eimeriorida. Jelikož se *Toxoplasma gondii* v meziphostitelích množí asexuálně a sexuální množení probíhá pouze v definitivním hostiteli, byla zařazena do čeledi sarcocystidae a podčeledi toxoplasmatinae. Rod, do kterého parazit náleží, se nazývá toxoplasma. (18)

1.3 Životní cyklus

V životním cyklu toxoplazmy dochází ke střídání pohlavního rozmnožování a nepohlavní replikace. Pohlavní rozmnožování se může uskutečnit pouze ve střevních buňkách konečného hostitele, jimiž jsou kočkovité šelmy. Bradyzoity se nejprve asexuálně pomnoží a poté dochází k tvorbě gamet. Oplodněné oocysty se vylučují s trusem ve velkém množství (více než 100 milionů). Ve vnějším prostředí se oocysty mění na sporulované cysty, obsahující sporozoity, schopné přežít mimo tělo hostitele delší dobu. Tímto stádiem se může infikovat tzv. mezihostitel. V těle mezihostitele dochází pouze k nepohlavní replikaci. Sporozoity se uvolní z vazby na sporocysty a ve střevním epitelu se diferencují na tachyzoity. Tachyzoity mají velkou schopnost replikace v jakémkoliv druhu buňky a šíří se tak po celém těle. Z tachyzoitu se dále vyvíjí bradyzoit a dochází ke vzniku tkáňových cyst, které osidlují hlavně svalovinu a CNS. Pokud dojde k požití syrového masa takto infikovaného živočicha, tkáňové cysty praskají, uvolňují se bradyzoity a v enterocytech se diferencují zpět na invazivní tachyzoity. (6), (18)

2 EPIDEMIOLOGIE TOXOPLAZMÓZY

Prevalence toxoplazmózy v české populaci se pohybuje mezi 25 – 30 % tzn., že téměř třetina populace se ve svém životě již s infekcí setkala. Výskyt v některých částech světa je často až 80% (Jižní Amerika). Jak již bylo zmíněno, mezihostitelem není jen člověk, ale dalších přibližně 300 druhů teplokrevných živočichů a konečným hostitelem jsou všechny kočkovité šelmy. Nakazit se parazitem je možné přímým kontaktem s oocystami například vdechnutím, pozřením nebo infekcí drobného poranění, dále při konzumaci nedostatečně tepelně opracovaného masa a mléka nakaženého živočicha nebo kongenitálním přenosem z matky na plod, výjimečně dojde k přenosu krevní transfuzí nebo transplantovaným orgánem. U těhotných žen je možné snížit riziko přenosu díky screeningu, který bohužel v České republice není povinný. Akutní forma onemocnění podléhá hlášení Hygienické službě. Incidence v ČR se pohybuje kolem 1 – 2 případů na 100 000 obyvatel ročně. Bylo prokázáno, že venkovský životní styl oproti životu ve městě nemá na získání *T. gondii* vliv. Člověk se může infikovat různými způsoby. (23)

2.1 Alimentární cesta přenosu

Člověk, stejně jako dalších 300 druhů živočichů, je pouze mezihostitel toxoplazmy. K nákaze dochází v situacích, kdy je jedinec vystaven oocystám a to v několika možných případech. Prvním a zároveň nejčastějším typem přenosu je přímý kontakt. Dochází k němu například při čištění kočičí toalety použité kočkou domácí trpící průjmem, který často indikuje infekčnost. Další místa kde lze přijít do přímého kontaktu jsou zahrada, konkrétně hlína nebo dětské pískoviště, kde si, jak je známo, kočky rády zahrabávají své výkaly. Oocysty mohou ulpět také na zelenině. (6)

Potenciální zdroj nemoci je také syrové maso živočicha trpícího toxoplazmózou. Obsahuje totiž tkáňové cysty, které jsou vysoce infekční, avšak dosažením vyšších teplot při jeho zpracování je lze zničit. *T. gondii* se může nakazit téměř kterýkoliv teplokrevný živočich, včetně hospodářských zvířat, jejichž mléko je také zdrojem infekce. Nejběžnější je mléko krav, koz a ovcí, v zahraničních zdrojích je však zmíněno i mléko buvolů, velbloudů a oslů, jakožto prokázaný zdroj toxoplazmózy. Nutno dodat, že nebezpečné je jen to nepasterizované. (4)

2.2 Transplacentární cestou

K tomuto typu přenosu dochází nejčastěji v případech, kdy se žena infikovala parazitem poprvé až v období gravidity nebo těsně před ní. Výjimkou však není ani reinfekce novým sérotypem nebo reaktivace toxoplazmózy. Pokud není toxoplazmóza včas diagnostikována a léčena, hrozí 50% šance nákazy plodu, která může mít za následek vážné zdravotní obtíže (viz. kapitola 4.1.) Bohužel příznaky toxoplazmózy jsou ve většině případů zaměnitelné s běžnými obtížemi doprovázejícími těhotenství, jako např. bolest hlavy, nevolnost, únava aj. Při podezření by se proto měla žena podrobit sérologickému vyšetření. Plod infikovaný v prvních týdnech těhotenství je vážně ohrožen potratem, ale pravděpodobnost přenosu je pouze 17%, naopak ve třetím trimestru je až 70% šance infekce dítěte, ale případná postižení už nemusí být tak výrazná. (11)

2.3 Ostatní způsoby přenosu

Do této skupiny patří vzácné způsoby přenosu a také ty, které ještě nejsou zcela ověřeny a jsou spíše diskutabilní. Byly popsány případy, kdy se jedinci nakazili po bodnutí jehlou a kontaminací oděrky při manipulaci s tachyzoity. Možný je i přenos nemoci krevní transfuzí, pokud nákazu včas neodhalí screeningové vyšetření dárce. (11)

T. gondii může napadnout jakýkoliv orgán a osídlit jej cystami. Při transplantaci tak vzniká riziko přenosu onemocnění z dárce, který se infikoval v minulosti, na příjemce. Pokud příjemce nikdy nepřišel s parazitem do styku, následky mohou být velice vážné. Z dostupných zdrojů vyplývá, že nejčastěji transplantovaný orgán osídlený cystami je srdce. Dále byly zaznamenány přenosy z jater a ledvin.

K nákaze může dojít i při výměně tělesných tekutin mezi dvěma jedinci. V posledních létech se intenzivně studuje možnost přenosu sexuálním stykem. Nejrizikovější je údajně výskyt séropozitivity u sexuálního partnera gravidní séronegativní ženy. Výskyt toxoplazem ve spermatu byl prokázán u některých živočichů, ale konkrétní důkazy jsou prokázány velmi sporadicky. (6)

3 FORMY ONEMOCNĚNÍ

3.1 Vrozená toxoplazmóza

Vrozená forma toxoplazmózy je vždy spjatá s transplacentárním přenosem a její následky bývají ve většině případů ireverzibilní, dělí se na: inaktivní, aktivní a v recidivě. Poškození dětí je často velice vážné a může končit potratem, předčasným porodem, porodem mrtvého dítěte, porodem těžce postiženého dítěte nebo porodem dítěte, které se nejprve jeví jako zcela zdravé a později dojde k manifestaci onemocnění. Lze pozorovat typický klinický obraz: poruchy CNS, vady očí a kalcifikaci v mozku, avšak toxoplazmóza může postihovat skoro všechny orgány a tkáně. Vrozená toxoplazmóza má afinitu zejména k CNS a očím, v mozku bývají postižené nejrůznější struktury, vzniká např.: hydrocefalus, ependymitis, abscesy ve frontálním laloku a již zmíněné kalcifikace mozku. Tyto patologie mohou doprovázet i vady srdce jako fokální myokarditida. (12)(15)

Klinické příznaky vrozené toxoplazmózy u dětí po narození: cyanóza, horečky, porucha sacího reflexu, dušnost, křeče, hypotermie, tvarové anomálie hlavičky a další.

V minulosti byla v úzké souvislosti s touto formou rozlišována i forma gynekologická (Hubner1974). Úzce souvisí s vrozenou formou toxoplazmózy, konkrétně je zaměřená na fertlní období ženy a stavy spojené s těhotenstvím jako potraty, porody i samotné období gravidity. Může probíhat jako akutní onemocnění, přetrvávat v inaparentním nebo latentním stádiu a v úvahu připadá i aktivace chronického procesu. Klinický obraz je podobně jako u jiných forem velice nespecifický a lze příznaky zaměnit za běžné stavy související s těhotenstvím. Pacientka trpí zvýšenou únavou, bolestmi hlavy, subfebriliemi, exantémem a jinými příznaky připomínajícími chřipku. K diagnostice proto často přispívá screening těhotných, který by měl proběhnout minimálně jednou v době gravidity. Po dohodě infektologů, parazitologů a epidemiologů se v současnosti již nepoužívá. (11)

Obecně toxoplazmóza může způsobit u fertlních žen sterilitu, v případě těhotných i opakované aborty, předčasné porody a porody různě postižených, dokonce mrtvých dětí. V případě vzniku infekce před početím parazit vytváří v organismu tkáňové cysty, které se usadí v děloze a přežívají zde i roky. Nakazit se žena může i v průběhu gravidity rizikovým chováním. Těhotenstvím se může aktivovat chronické stádium nemoci. V případě diagnózy onemocnění je nutné vhodně zvolit léčbu tak, aby neměla teratogenní vliv na plod, ale také aby nedošlo k jeho malformacím. (11)

3.1.1 Vrozená oční toxoplazmóza

Pro vrozenou toxoplazmózu je postižení očí nejtypičtější. Má několik forem: inaktivní po narození, aktivní po narození a recidivující. Rozdíl mezi vrozenou a získanou formou je v množství titru protilátek. Zatímco při kongenitální oční toxoplazmóze je zjizvitelná poměrně vysoká hladina, u získané je znatelně nižší. Tato forma onemocnění se projevuje především strabismem a sníženou ostrotí zrakového vjemu, ovšem málokdy je onemocnění zachyceno včas a poškození zraku je ireverzibilní. Pacienti s vrozenou monosymptomatickou oční toxoplazmózou mají poměrně dobrou prognózu, avšak hrozí recidiva, kdy se parazit může šířit do dalších orgánů. K recidivě může dojít po jakékoliv zátěži pro organismus, jako např.: jiné onemocnění, puberta, těhotenství atd. (5)

3.2 Získaná toxoplazmóza

Tato kategorie zahrnuje mnoho forem toxoplazmózy, je velice obtížné najít tak vhodné dělení. Získanou toxoplazmózu lze proto dělit dle aktivity na: aktivní, inaktivní a recidivující. Dále dle průběhu: akutní, chronická, latentní a stav po proběhlé nemoci. A jako poslední dle místa kumulace patogenu: lymfatická, cerebrospinální, myokarditická, exantematická a oftalmologická. Toxoplazmózou je možné se nakazit různými způsoby. Jak je uvedeno v kapitole o přenosu infekce. Zajímavostí je, že venkovský život nemá značný vliv na četnost onemocnění, i když tito lidé přicházejí do kontaktu s divokými a hospodářskými zvířaty častěji. Ohroženi získanou formou toxoplazmózy jsou i pracovníci v některých profesích, např. v chovech zvířat nebo na jatkách. (11) (18)

Klinický obraz a průběh onemocnění se liší dle jednotlivých forem toxoplazmózy. Stejně jako u vrozené formy může i získaná postihovat skoro všechny tkáně a orgány.

3.2.1 Chronická toxoplazmóza

Toxoplazmóza obecně má vysokou afinitu k CNS, kde se chronicita rozvíjí. Po vniknutí do těla hostitele parazit koluje v krvi, kterou je unesen do blízkosti mozku. Tam poté prochází mozkovým endotelem do kapilárního lůžka a překonává hematoencefalickou bariéru. Imunitní systém na tuto skutečnost reaguje, astrocyty, mikroglie a neurony produkují cytokiny, chemokiny a exprimují MHC antigeny. Uplatňují se také cirkulující imunitní buňky. Tachyzoity parazita přecházejí k tvorbě bradyzoitových cyst, jejichž replikace je pomalá a stěžují ji buňky imunitního systému. I přesto však replikace bradyzoitů ovlivňuje a narušuje spojení neuronů, protože je imunitní systém nedokáže eliminovat, dojit tak může k zánětu mozku a dilataci komor, kde jsou narušeny neuronální struktury vlivem ztráty kontinuity a hustoty nervových vláken. Bradyzoitové cysty jsou typickým znakem chronické formy toxoplazmózy. (11)

3.2.2 Oční toxoplazmóza

Stejně jako u vrozené formy oční toxoplazmózy je i u získané poměrně obtížná diagnostika, která se opírá především o klinický obraz a specifický nález v oku: zánět sklivce, bílá fokální retinitida, zánětlivá oční hypertenze, retinální vaskulitida atd. Příznakem je rozmazané vidění, bolest oka nebo jeho zarudnutí. K odhalení onemocnění může přispět i PCR nebo stanovení titru IgG protilátek. Oční toxoplazmóza může postihnout buď jen jedno oko, nebo v ojedinělých případech i obě. Pokud se onemocnění neléčí, končí slepotou. (5) (12)

3.2.3 Nervová forma toxoplazmózy

Nervová forma onemocnění úzce souvisí s imunosupresí a obecně s nedostatečností imunitního systému, typická je pro pacienty s HIV/AIDS a novorozence s vrozenou toxoplazmózou. Dělí se buď na akutní, subakutní a chronickou formu nebo dle lokalizace změn: meningeální forma, encefalitidy, myelitidy a postižení periferních nervů. Mezi projevy patří hlavně bolest hlavy, horečka, fokální neurologické příznaky a letargie. V případě postižení CNS parazitem se rozvíjí akutní meningoencefalitida, která přispívá ke vzniku nekroticko-hemoragických ložisek. Tyto ložiska později kalcifikují a ničí tak mozkový parenchym. Dále se může vyskytnout hydrocefalus, který vzniká jako následek zánětlivé reakce v likvorových cestách. Pacienty s meningoencefalitidou ohrožují i vedlejší komplikace související s psychickým zdravím, jako např.: obsedantně-kompulzivní porucha, schizofrenie, epilepsie a hluboké deprese se sebevražednými sklony. Obecně encefalitida způsobená *T. gondii* má za

důsledek halucinace a paranoi. Může být postižena i mícha, buď v souvislosti s encefalitidou, nebo samostatně. (14)

3.2.4 Uzlinová forma toxoplazmózy

Společně s oční toxoplazmózou se jedná o nejčastější a nejtypičtější formu získaného onemocnění. Postihuje především podkožní mízní uzliny v oblasti krku a vzniká lymfadenopatie. Pacient si může povšimnutí zduřelých uzlin, zvýšené tělesné teploty nebo má jiné obtíže jako malátnost a ztrátu výkonu, nemoc může doprovázet i exantém nebo hepatosplenomegalie. K hnisání uzlin nikdy nedochází. Další komplikace jako např. myokarditidy nebo jaterní poškození jsou vzácné. V krevním obrazu je možné pozorovat lymfocytózu a monocytózu. Uzlinová forma toxoplazmózy je benigní onemocnění, a proto je léčba v časných stádiích poměrně snadná a účinná. Bohužel většina případů unikne diagnostice a spontánně vymizí nebo přejde do chronicity. Chronická forma se projevuje zejména únavou a jinými nespecifickými obtížemi. Stav je zpravidla provázen velkým vzestupem protilátek. (11)

3.2.5 Abdominální forma toxoplazmózy

Tuto formu lze popsat buď obecně jako abdominální (břišní), anebo je možné jednotlivé orgánové postižení toxoplazmózou rozdělit do vlastních skupin na: toxoplazmovou enterokolitis, jaterní poškození a mezenteriální lymfadenitis. Enterokolitidy se projevují zejména hlenovitými průjmy, někdy s příměsí krve a dyspeptickým syndromem. U enterokolitid je nevýhodou, že projevy s ní spojené se mohou vyskytovat pouze jako odpověď na léčbu toxoplazmózy a nemusí nutně znamenat samotné napadení střev parazitem.

Napadení jater toxoplazmózou lze dokázat v materiálu získaného biopsií s následným využitím imunofluorescenčních technik. Tato forma se vyskytuje většinou u kongenitální toxoplazmózy, kde dochází k rozsevu parazita po celém organismu a poškodit játra může i pouze v řádu týdnů. Léčba bývá většinou úspěšná.

Postižené mohou být v rámci dutiny břišní i jiné orgány, např.: slezina a pankreas. Nevýhodou u této formy je obtížná diagnostika, protože příznaky se nápadně podobají jiným, běžnějším chorobám např.: infekční mononukleóze nebo bakteriálním infekcím: salmonelóze, shigelóze. Symptomy abdominální toxoplazmózy mohou být: bolesti břicha, zvracení, nechut' k jídlu, nauzea, hepatosplenomegalie, ikterus, zduření mezenteriálních uzlin a dyspeptické potíže. (11)

3.2.6 Postižení plic

Plicní forma toxoplazmózy se vyskytuje téměř výhradně u imunokompromitovaných pacientů, tj. po transplantaci, HIV/AIDS pozitivní, hematologické malignity, a je velmi vzácná u imunokompetentních jedinců, u kterých dochází ke vzniku pneumonie. Postižení plic obvykle vzniká jako multisystémové onemocnění s jinou přidruženou komplikací. Mezi klinické příznaky patří horečka, kašel, dušnost, krev ve sputu aj. Onemocnění má tendenci přecházet do chronicity. Při léčbě je stěžejní pozorování titrů specifických protilátek a také je vhodné provést rentgen plic. (13)

3.2.7 Postižení kardiovaskulární soustavy

Podobně jako ostatní orgány může toxoplazma napadnout i kardiovaskulární systém a způsobit tak řadu obtíží. Nejčastěji je tato forma doprovázena postižením jiného orgánu nebo orgánové soustavy např. Uzlin. Příznaky mohou být: únava, bolest hlavy, lymfadenopatie, bolest na hrudi, dušnost nebo tachykardie. U pacientů se srdeční formou toxoplazmózy je patrná výrazná arytmie při vyšetření EKG. Rozvíjí se také myokarditida nebo perikarditida, možný je však výskyt i obou chorob najednou. Závažnost komplikace se odvíjí od intenzity zánětlivé reakce, vznikající v důsledku infiltrace myocytů a jejich možné nekrózy. Kardiovaskulární forma toxoplazmózy je vzácná a doposud málo prozkoumaná, následky mohou být však vážné a v malém procentu smrtelné. (19)

3.2.8 Vzácné formy a komplikace

Postižení svalů a kloubů u toxoplazmózy není běžné, ale také se v některých případech může vyskytnout. Ve svalech pozorujeme například myositidy a u kloubů se objevuje artralgie. Dále do této skupiny patří dermatologické projevy, které mohou být ve formě exantémů a jiných vyrážek. Parazit byl také nalezen v histologických preparátech zhotovených z tubulů a glomerulů ledvin, lze tedy hovořit o jakési ledvinové formě toxoplazmózy. (11)

4 MOŽNOSTI LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY

4.1 Přímé metody

4.1.1 Izolace parazita

Diagnostika toxoplazmózy může být provedena naočkováním vzorku krve, mozkomíšního moku, lymfatické uzliny a dalších tělních tekutin a tkání do pobřišnicové dutiny imunosuprimované myši. Pomocí fázové kontrastní mikroskopie lze poté prokázat přítomnost či absenci tachyzoitů v peritoneální tekutině přibližně 6 – 10 dnů po inokulaci myši. Vzorek je fixován metanolem a následně obarven metodou dle Wrighta, Giemsky nebo May-Grunwalda. Parazita je možné pozorovat v jeho typickém tvaru půlměsíce, s granulární membránou, modře obarvenou cytoplasmou a červeným jádrem. (1)

V případě, že naočkujeme myši krví novorozence infikovaného toxoplazmózou od matky v prvních týdnech od jeho narození, pozitivní nález dosahuje 75 %. S prodlevou jednoho měsíce od odběru vzorku, se hodnoty pohybují pouze okolo 52 %. Nevýhodou této metody je její vysoká náchylnost na kontaminaci a nutnost specializovaného personálu. (1)

4.1.2 Buněčné kultury

Dnes jsou hojně užívány pro diagnostiku a izolaci parazita *in vitro* a velmi významnou roli hrají i ve výzkumném odvětví, např. Při zkoumání interakce mezi hostitelem a parazitem, molekulární a genetickou charakteristikou jednotlivých kmenů a při vývoji léků a vakcinačních přípravků. Toxoplazma byla již izolována z mozkomíšního moku a plic u pacientů se získanou imunodeficiencí. Buněčné kultury se také dají využít u diagnostiky oční formy toxoplazmózy. (1)

Při určování tachyzoitů z biopsií nebo tělních tekutin v buněčných kulturách dochází k destrukci buněčné monovrstvy, což souvisí s počátečním pomnožením tachyzoitů v patientském vzorku. Senzitivita detekce parazita je zejména v případě oční formy velmi vysoká až 91% oproti např. metodě ELISA se 67 %. (1)

4.1.3 Histologie a cytologie

Histologie a cytologie se běžně neužívají jako metody pro diagnostiku parazita, avšak při onemocnění můžeme pozorovat změny v lymfatických uzlinách a polymorfní buněčné populace. Lymfatické uzliny mají zachovanou architekturu. Sinusy se zde však vyskytují fokálně rozšířené monocytoidními B buňkami. Jedná se o velké buňky, ostře ohraničené, s tmavě zbarvenými jádry a čistou cytoplasmou. Dále nalézáme reaktivní folikulární hyperplázii a nepravidelné shluky epiteloidních histiocyťů na okrajích zárodečných center. Medulární provazce mohou obsahovat plazmatické buňky a imunoblasty, Toxoplazmové cysty se také v ojedinělých případech objevují, avšak jedná se o cca 1 % případů. (1)

Cytologické vlastnosti jsou založené na aspirační biopsii tenkou jehlou. V případě nákazy jsou detekovatelné polymorfní buněčné populace jako např. Lymfocyty různých velikostí a shluky epiteloidních histiocyťů tzv. mikrogranulomy. Vzácně se mohou vyskytovat parazitické cysty. (1)

4.2 Imunodiagnostika

4.2.1 Sabinova – Fieldmanova reakce (dye test)

Tato metoda byla popsána již v roce 1948 a je doposud uznávána jako standard při diagnostice toxoplazma specifických protilátek. Sérum pacienta se míchá s živými tachyzoity v suspenzi a následně se přidá barvicí roztok methylenové modři. V případě, že se v patientském séru vyskytuje protilátka proti toxoplazmě, jsou tachyzoity jejím vlivem lyzovány a nadále nejsou schopny na svém povrchu vázat barvivo. Výsledek je odečítán pod mikroskopem a u pozitivního nálezu je vzorek čirý. Pokud se ve vyšetřovaném séru protilátka proti parazitovi nevyskytují, jsou tachyzoity schopné na svém povrchu udržet methylenovou modř a vzorek je jí obarven. Za negativum tohoto testu je považováno použití živých tachyzoitů, které mohou být při nesprávném zacházení potencionálně nebezpečné pro pracovníky laboratoře a také fakt, že tento test vyžaduje speciální infrastrukturu pro údržbu parazita. (1)

4.2.2 Hemaglutinační reakce

Roku 1957 byla pro sérodiagnostiku zavedena reakce nepřímé (pasivní) hemaglutinace, popsána panem Jacobsem. Principem je předběžné navázání rozpustného antigenu na erythrocyty, jakožto biologický nosič. Povrch krvinky je nutno upravit, kvůli správnému fixování antigenu. Pro tento účel je používán tanin, jehož působením se zvětšuje adsorpční schopnost červených krvinek. Takto senzibilizované krvinky jsou poté aglutinovány v případě přítomnosti protilátek. V minulosti bylo běžné používat pro tento test zkumavky a lidskou krev s Rh negativním faktorem. Postupem času se však přešlo na plastové destičky a beraní krvinky. Hemaglutinační reakce je velmi praktická, rychlá a velmi citlivá, je vhodné ji kombinovat s nepřímou imunofluorescencí. Dále může být užitečná při diagnostice vrozené toxoplazmózy, protože identifikované protilátky jsou (mimo jiné) třídy IgG. V roce 1991 byla standardizována metoda na průkaz IgM protilátek s citlivostí 98 % a specifitou 95 %. (1)

4.2.3 Modifikovaný aglutinační test (MAT)

Tento test je principem velmi podobný hemaglutinační reakci. Jedná se o velice citlivou a specifickou sérologickou metodu k detekci IgG protilátek proti toxoplazmě zejména u zvířat. Úskalím MAT je malá dostupnost komerčních kitů a antigenu derivovaného z tachyzoitů a falešně negativní výsledky, které mohou vznikát v časně, akutní fázi infekce. Tachyzoity jsou standardně pro tuto metodu izolovány z myší, dále jsou fixovány formaldehydem v mikrotitračních destičkách s přidaným zředěným sérem. V případě pozitivity se tvoří tenká vrstva aglutinace. U negativních vzorků vzniká na dně jamky kompaktní sediment, který je tvořen vysráženými tachyzoity. (1) (2)

4.2.4 Nepřímá imunofluorescence (IFI)

Jedná se o citlivou, semi-kvantitativní, rychlou metodu, která slouží především k detekci protilátek třídy IgM a IgG. Test vykazuje vyšší přesnost, je-li přizpůsoben na specifické protilátky. Testované vzorky reagují s tachyzoity, které jsou fixovány na podložním sklíčku a představují antigen. Dojde-li ke kontaktu s protilátkami, které jsou přítomny v patientském séru, vznikne komplex antigenu a protilátky. Na tento komplex následně nasedá sekundární protilátka značená fluoresceinem. Výsledek reakce je odečten ve speciálním fluorescenčním mikroskopu. V případě positivity nálezu lze pozorovat jasné, žluto - zelené fluoreskování. Pokud je vzorek negativní, fluorescence se nevyskytuje a viditelné jsou pouze červené buňky. Barva se v některých případech může mírně lišit, vždy záleží na použitém fluorochromu. (1)

Nesmírnou výhodou této metody je možnost odlišení tříd imunoglobulinů, což může být užitečné v případě, kdy je třeba odlišit časné stádium infekce.

4.2.5 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA je jednou z nejvíce užívaných imunochemických metod současnosti. Má hned několik možných variant a lze ji použít při kvalitativním i kvantitativním stanovení. Byla vyvinuta roku 1971 Petrem Perlmannem a Evou Engvallovou ve Švédsku.

Metoda je založena na interakci antigenu a protilátky, přičemž vždy jedna z komponent reakce je uchycena na pevné fáze, což bývá nejčastěji mikrotitrační destička o 96 jamkách. Dostupné jsou také 384 - jamkové. V případě průkazu *Toxoplasmy* slouží jako antigeny tachyzoity a interagují s imunoglobuliny v patientském séru.

Přímá ELISA

Toto uspořádání je z níže uvedených to nejjednodušší a je nejlepší možností pro stanovení imunitní odpovědi. Antigen je inkubovaný na pevném povrchu a zde dochází k jeho navázání, následuje promytí. Dále se do jamky přidá enzymaticky značená protilátka, která se zde inkubuje s antigenem a dochází k jejich interakci, nenavázanou protilátku je třeba odstranit promytím. Nakonec při inkubaci dochází k reakci enzymu se substrátem a vzniklá změna se detekuje. Přímou ELISU lze použít jak ke kvantitativnímu tak kvalitativnímu stanovení. (16)

Nepřímá ELISA

Jedná se o zřejmě nejvíce užívanou možnost uspořádání. Oproti přímé ELISE se využívá ještě sekundární protilátka a metoda disponuje tak vyšší citlivostí. Nevýhodou může být zvýšený šum v pozadí vlivem zkřížené interakce mezi antigenem a sekundární značenou protilátkou nebo větší časová náročnost. Nepřímý ELISA test je nejvíce vhodný pro stanovení celkové koncentrace imunoglobulinů. (16)

V prvním kroku se antigen inkubuje a dochází k jeho navázání na pevný povrch, nenavázaný antigen se odstraní promytím. V další inkubaci se na povrch antigenu váže primární protilátka, následuje promytí. Dále se na primární protilátku váže sekundární protilátka značená enzymem. Nakonec, po posledním promytí reaguje enzym se substrátem a vzniklý produkt se stanovuje. (16)

Sendvičová ELISA

Název tohoto uspořádání vzniklo kvůli označení detekovaného antigenu protilátkami ze dvou stran. Antigen nesmí být v tomto případě haptenem. Sendvičová metoda se nejvíce vyznačuje svou citlivostí, která je ze všech metod nejvyšší, dále je vhodná ke stanovení komplexních vzorků, není nutná purifikace. (16)

V prvním kroku se na pevný povrch jamky váže jedna z protilátek, nenavázaná se vymývá. Dále se inkubuje v destičce pacientské sérum a dochází k interakci mezi antigenem a imobilizovanou protilátkou. Po promytí se přidá sekundární protilátka značená enzymem, která se naváže na druhý epitop antigenu. Nakonec je jamka promyta a enzym reaguje se substrátem. Detekovat můžeme změnu barvy, popřípadě existují i jiné způsoby detekce, např. Fluorescenční nebo luminiscenční. (16)

Kompetitivní ELISA

Kompetitivní nebo též soutěživá ELISA. Jedná se o uspořádání, kde buď antigen, nebo protilátka soutěží o vazebné místo. Tato metoda je nejvíce užívána pro nepurifikované a komplexních vzorky. Vhodná je také pro hapteny. Na rozdíl od sendvičového uspořádání, kde je množství analytu přímo-úměrné zabarvení jamky, je kompetitivní verze ELISY nepřímou-úměrná. Tzn. Čím větší zabarvení, tím méně stanovované složky ve vzorku.

Nejprve se naváže antigen na dno destičky, následuje promytí. V dalším kroku se přidá stanovovaná protilátka a protilátka značená enzymem. Proběhne inkubace, při které se protilátky naváží na antigeny. Po promytí enzym reaguje se substrátem a nadále se detekuje intenzita zabarvení. (16)

4.2.6 Komplement-fixační reakce (KFR)

Sérologická metoda, která slouží k průkazu přítomnosti imunoglobulinů. Principem, je vazba komplementu na vzniklý komplex antigenu a protilátky. V prvním kroku je nutné odstranit patientský komplement tepelnou inaktivací séra. Dále se vyšetřované sérum inkubuje s antigenem. Vzniklý imunokomplex je smíchán s ředěným komplementem získaným z morčat a váže se na něj. V případě, že komplement není všechen spotřebován, reaguje v druhé fázi s indikátorovým komplexem a dojde k hemolýze. Indikátorový komplex se skládá z ovčích erytrocytů, které mají na svém povrchu navázanou protilátku proti ovčím krvinkám. Vzorek, ve kterém došlo k hemolýze lze označit za negativní a neobsahuje tedy protilátky proti parazitovi. Naopak, pokud hemolýza nenastala a došlo ke spotřebě komplementu v první fázi, jedná se o pozitivní nález, protože ve fázi druhé nebyl aktivován indikátorový komplex. Výsledek, je dále upřesněn pomocí titru protilátky, tj. v jakém nejvyšším zředění patientského séra lze detekovat protilátky. KFR je v dnešní době již nahrazována metodou ELISA, kvůli neschopnosti metody určit třídu imunoglobulinů. (24)

4.2.7 Test avidity

Avidita je definována jako síla interakce mezi polyvalentní protilátkou a antigenem. Testem avidity lze tedy zjistit, jak moc silné spojení vznikne mezi specifickou protilátkou a *T. gondii* antigenem. Díky této metodě lze odlišit akutní a chronickou infekci a to tak, že avidita je závislá na čase a mění se, protože po prodloužené nebo opakované expozici antigenu se variabilní oblasti IgG adaptují prostřednictvím selekce B-buněk, které jsou řízené antigenem, tzn. v časných stádiích infekce, je její hodnota nízká a s průběhem se zvyšuje. Nejprve je však nezbytné denaturovat bílkoviny, k tomu může posloužit močovina. Denaturační činidlo zabraňuje tvorbě nebo umožňuje disociaci komplexu antigenu a protilátky s nízkou aviditou a to tím, že naruší jejich vodíkové vazby. Výsledek testu avidity je získán výpočtem, ze vztahu mezi testovaným IgG s denaturačním činidlem a bez něj. Metoda se nejvíce uplatňuje ve screeningu a diagnóze toxoplazmózy u gravidních žen. (7)

4.2.8 Western blot

Jedná se o imunoenzymatickou metodu, jejíž princip je založen na vazbě parazitárních antigenů fixovaných na nitrocelulóзовém papíru se specifickými protilátkami, které jsou přítomné v séru nemocných pacientů. Nejprve je nutné oddělit proteinové antigeny elektroforézou v polyakrylamidovém gelu. Dalším krokem je přenést je a imobilizovat na pevnou fázi, kterou je nitrocelulóзовá vrstva. Tato vrstva musí být nasycena nebo blokována proteinem, který není antigenem, jako je např. bovinní albumin, aby bylo zabráněno nespecifické vazbě protilátek. Poté se přidá druhá protilátka s navázaným enzymem, může jím být alkalická fosfatáza nebo křenová peroxidáza. Sekundární protilátka je připojena k vazebnému místu Fc na primární protilátce po přidání substrátu enzymu. Ve chvíli kdy je substrát přeměněn na produkt, lze indikovat viditelné specifické pásy *in situ*, které značí přítomnost patientských protilátek, které rozpoznaly antigen. Jako biologický materiál pro tuto metodu může být využito sérum a mozkomíšní mok. Western blot má tu výhodu, že dokáže identifikovat specifické antigeny rozpoznávané protilátkami třídy IgG, IgM a IgA u akutních i chronických forem onemocnění a také u imunokompromitovaných pacientů s nízkým titrem protilátek. (1)

4.2.9 Imunocytochemie

Imunocytochemie je metoda, která využívá vzorků tkáně pacienta a detekuje v ní epitopy exprimované antigeny toxoplazmy. K vyšetřované tkáni se přidává primární protilátka, která se s dostatečnou afinitou a specifitou váže na zmíněné epitopy. Dále je použita sekundární protilátka, která se opět specificky váže, tentokrát však na primární protilátku. K celému komplexu se přidá substrát, který indukuje vznik barevné sraženiny v místě vazby epitopu a protilátky. (1)

4.3 Molekulární diagnostika

4.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR poprvé objevil a popsal Kary Mullis roku 1983. Jedná se o metodu, která slouží k rychlému zmnožení určitého úseku DNA. Principem, je opakování replikace specifických sekvencí DNA, díky primerům, které komplementárně nasedají na konce úseků DNA a od nichž probíhá syntéza. Primery jsou krátké řetězce oligonukleotidů (18 – 25 bází), které je třeba softwarově navrhnout, protože musí splňovat určité podmínky, jako např., že nesmí dojít k výrazné komplementaritě mezi oběma primery nebo v rámci jedné sekvence. Samotná syntéza probíhá za přítomnosti termostabilní DNA polymerázy. Nejčastěji využívaná je tzv. Taq polymeráza, syntetizovaná z bakterie *Thermus aquaticus*. Jedná se o jedinečný enzym, který neztrácí svou aktivitu ani při teplotách blížících se ke 100°C. Dalšími komponenty reakce jsou MgCl₂, což je kofaktor DNA polymerázy, reakční pufr, který zajišťuje vhodné prostředí pro reakci, aditiva sloužící ke stabilizaci polymerázy a zvýšení specifity primeru a dNTP. (1)

Samotná reakce má několik navazujících fází: denaturace, annealing a elongace. Při denaturaci je DNA zahřívána na teplotu kolem 94 - 98°C po dobu 20 – 30 sekund a dojde tak k narušení vodíkových můstků mezi vlákny dvoušroubovice. Vznikají dvě jednořetězové molekuly DNA. Ve fázi nazývané annealing, se vysoká teplota snižuje na 50 - 65°C a díky tomu jsou schopné primery nasedat na specifická místa DNA. Nakonec při elongaci vzniká nový úsek DNA, komplementární k původní molekule, teplota se v této fázi pohybuje okolo 72 - 80°C. Přístroj, který takto dokáže měnit teploty během krátké chvíle, se nazývá termocykler. Všechny tyto kroky se postupně, cyklicky opakují. Obvykle pro získání sekvence původní molekuly DNA stačí 30 cyklů. (1)

Gen, který se nejvíce používá pro diagnostiku Toxoplazmy je B₁ s 35 kopiemi v genomu parazita, následované oblastí REP o 529 párech bazí. PCR je nejvíce užitečná v případě akutních infekcí u plodu, nebo u imunokompromitovaných pacientů např. s AIDS. Bohužel senzibilita této metody se pohybuje v širokých rozmezích, kvůli různé době infekce, široké škále vzorků a nárokům a podmínkám na jejich skladování. Také není přesně určený primer. Pro metodu PCR lze využít: sérum, periferní krevní mononukleární buňky, mozkomíšni mok, moč nebo amniovou tekutinu. (1)

4.3.2 PCR v reálném čase (real - time PCR)

Princip této metody je založen na sledování přibývajícího produktu v jednotlivých cyklech pomocí fluorescenční sondy. Pomocí známých koncentračních standardů lze real – time PCR kvantifikovat. Biologickým materiálem, ve kterém byla úspěšně pomocí real – time PCR izolována *T. gondii* je: plná krev, mozkomíšni mok a plodová voda. Metoda je velice užitečná při určování progresu onemocnění a posuzování účinnosti léčby. (1)

4.3.3 LAMP metoda

LAMP je zkratka pro: Loop mediated isothermal amplification, volně přeloženo jako: izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou. Metoda slouží k amplifikaci nukleových kyselin za izotermálních podmínek, tzn. za stálé teploty, která bývá kolem 60 - 65°C. Pro tento účel může posloužit inkubátor nebo hybridizační pec. LAMP je velice citlivý, rychlý a vyznačuje se vysokou specifitou. Amplifikace DNA vychází z neustálé reprodukce dvou reakcí, což vyústí v prodlužování struktury, která má formu smyčky. V reakci je využita DNA polymeráza s párem vnitřních a vnějších primerů. Vnitřní primery iniciují reakci LAMP a vnější hybridizují báze a tím zahajují syntézu DNA s přemístěním vlákna, čímž je tvořena smyčková struktura. (1) (21)

LAMP metoda je citlivější než PCR, ale ne tolik, aby se vyrovnala real-time PCR. Specifičnost je 100%. Výhoda metody je zároveň jejím úskalím, kvůli vysoké senzitivitě hrozí výskyt falešně pozitivních výsledků, je proto nutná přísná kontrola kvality.

5 TERAPIE

Vzhledem k tomu, že pro imunokompetentního člověka nepředstavuje parazit *Toxoplasma gondii* větší riziko, je léčba indikována pouze ve specifických případech a to tehdy, jedná – li se o oční formu onemocnění nebo postižení útrobních orgánů. Toxoplazmózu léčíme i u imunokompromitovaných jedinců, gravidních žen a dětí do pěti let věku. Vysoké riziko představuje i kongenitální forma, proto nasazujeme léčbu při jejím prokázání nebo v případě důvodného podezření. (8)

Schéma léčby toxoplazmózy u gravidních žen a v případě kongenitální formy se celosvětově velmi liší, avšak obecné principy a většinou i podávané přípravky bývají obdobné. V graviditě se léčba zahajuje podáním spiramicinu, který má vysokou afinitu k placentě a redukuje riziko přenosu. Pokud byl plod již infikovaný parazitem, vysazujeme spiramicin a podáváme pyrimethamin v kombinaci se sulfadiazinem a acidum folinicum. (3)

6 PREVENCE

U sérologicky negativních gravidních žen a u populace s imunodeficiencí je dodržování preventivních opatření nezbytné, protože se jedná o dvě nejvíce ohrožené skupiny. V případě těhotných je nutné alespoň jednou v rámci prvního trimestru provést sérologické vyšetření. Avšak většina dále uvedených příkladů ochrany proti nákaze je platná pro celou populaci.

Na každého se vztahují obecná opatření, týkající se zvýšené hygieny a správného nakládání s potenciálně infekčními živočichy a předměty.

6.1 Všeobecné zásady

Vzhledem k tomu, že vakcína proti toxoplazmóze pro lidi ani zvířata neexistuje, je nejlepší ochranou prevence. V případě sdílení domácnosti s kočkou je doporučeno její toaletu čistit a dezinfikovat každý den, aby nedošlo k rozvinutí oocyst do infekčního stádia. Kočka, které je dovolen volný pohyb venku, má výrazně vyšší riziko infekce toxoplazmózou oproti té, která je omezena na vnitřní prostory. Hrozí totiž konzumace nakaženého ptáka nebo hlodavce. Stejně riziko s sebou nese i v dnešní době moderní BARF, což je výživa domácích zvířat syrovým masem, které může být zdrojem infekce. Doporučuje se tedy kočkám podávat pouze tepelně zpracované, popř. komerční krmivo. Z nepasterizovaného mléka a syrového masa se konzumací může patogen přenést i na člověka, proto je třeba úprav při teplotách vyšších než 70° C. (12) (23)

Oocysty v půdě mohou ulpět na zelenině, vhodné je ji pečlivě omýt od hlíny, stejně jako ruce, které přišly s půdou do kontaktu. Při jakékoliv práci na zahradě je obecně doporučeno se chránit rukavicemi. (12) (23)

6.2 Opatření pro ohrožené skupiny

V případech, kdy může být nákaza toxoplazmou zdraví ohrožující a v domácnosti se vyskytuje kočka je nutné péči o ni přenechat člověku, který nespadá do ohrožené skupiny, popřípadě zvážit její odstranění z domácnosti. (12)

PRAKTICKÁ ČÁST

7 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

7.1 Hlavní cíl

Zjištění prevalence protilátek proti *T. gondii* v dodaném souboru vzorků v Plzeňském kraji za rok 2022.

7.2 Dílčí cíle

1. Zjistit počet pozitivních výsledků ve sledovaném souboru a statisticky je zpracovat.
2. Zjistit počet pozitivních výsledků u gravidních žen a statisticky je zpracovat.
3. Porovnat získané výsledky.
4. Přiblížit problematiku toxoplazmózy s popisem laboratorního stanovení.

8 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

Bude provedeno více vyšetření u žen nebo u mužů?

Budou protilátky proti *T. gondii* v populaci s věkem přibývat?

Které imunoglobuliny přibližně kopírují výsledky vyšetření celkových protilátek?

9 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Sledované vzorky byly získány od pacientů z Plzeňského kraje, Především ve FN Plzeň, ale také v nemocnici Klatovy, Stod a z ordinací vybraných praktických lékařů. Sběr dat proběhl v roce 2022. Zahrnuti jsou zde muži a ženy všech věkových kategorií včetně gravidních v celkovém rozsahu 683 pacientů. Ke stanovení byla použita enzymoimuno analýza (EIA) a komplement fixační reakce (KFR). Výsledky byly následně interpretovány jako titry protilátek a u vybraných pacientů byly stanoveny hladiny imonoglobulinů IgG, IgM a IgA.

10 METODIKA PRÁCE

10.1 Detekce protilátek EIA metodou pro IgG

10.1.1 Úvod

Imunoenzymatická souprava slouží k diagnostice a screeningu parazita *Toxoplasma gondii* stanovením IgG protilátek v biologickém materiálu. Přímá detekce *T. Gondii* není pro rutinní diagnostiku dostupná, vhodnou možností pro detekci infekce je sérologie. Stanovení celkových protilátek metodou KFR je považováno za screeningovou metodu. Specifické protilátky tříd IgA, IgE, IgM a IgG se stanovují metodou ELISA, popřípadě lze výsledek konfirmovat imunoblotem. Protilátky třídy IgG dosahují maxima v séru 6 měsíců po začátku onemocnění a jsou detekovatelné mnoho let po infekci. Stanovením jejich vazebné avidity lze přesněji určit stadia onemocnění. (21)

10.1.2 Princip testu

Souprava umožňuje detekci specifických protilátek třídy IgG ve vzorcích metodou EIA. Sendvičový typ (tj. pevná fáze s navázaným specifickým antigenem - protilátka z testovaného vzorku - značená protilátka). Značená protilátka neboli konjugát je frakce zvířecího imunoglobulinu proti lidskému IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou. Peroxidázová aktivita se měří za použití substrátu obsahujícího TMB. Pokud je TMB pozitivní, zmodrá. Celá reakce se zastaví stop roztokem a modrá se změní na žlutou. Intenzita žluté barvy se měří pomocí fotometru při vlnové délce 450 nm a je úměrná koncentraci specifických IgG protilátek přítomných ve vzorku. (21)

10.1.3 Složení soupravy, skladování a expirace

Souprava obsahuje:

- MICROPLATE: potažená destička o velikosti 12 x 8 jamek s navázaným antigenem.
- CONTROL – CAL 1: negativní kontrola neboli kalibrátor 1. Jedná se o roztok, který neobsahuje specifické lidské protilátky. Již dodán v pracovním ředění.
- CUTOFF CAL 2: cutoff neboli kalibrátor 2. Jedná se o roztok obsahující specifické lidské protilátky. Již dodán v pracovním ředění.

- CONTROL + CAL 3: pozitivní kontrola neboli kalibrátor 3. Tento roztok obsahuje specifické lidské protilátky a je dodáván již v pracovním ředění.
- CONJUGATE: konjugát, roztok, který obsahuje imunoglobulin zvířecího typu proti lidskému IgG a je značený peroxidázou. Dodán již v pracovním ředění.
- DILUENT 5: ředící roztok vzorků 5, jedná se o pufr, který obsahuje stabilizátory bílkovin, již v pracovním ředění
- SUBSTRATE 2: TMB – Complete 2. Tento roztok je jednosložkový substrát, který obsahuje TMB nebo peroxid vodíku v pracovním ředění.
- WASH 20x: Promývací roztok neboli 20krát koncentrovaný pufr.
- STOP: zastavovací roztok. Jedná se o roztok kyseliny v pracovním ředění.
- AVIDITY: avidní roztok – stabilizovaný roztok močoviny.

Skladování a expirace: Soupravu je třeba skladovat při teplotě +2 °C až +8 °C. Pokud jsou dodrženy skladovací podmínky, je platná doba expirace uvedená na obalu soupravy. Po otevření se doporučuje soupravu spotřebovat do 3 měsíců. Soupravu je třeba chránit před mrazem. (21)

10.1.4 Příprava pracovních roztoků

Promývací roztok byl naředěn v poměru 1:20 tj. 1 díl roztoku a 19 dílů destilované vody. Za předpokladu, že se v lahvičce s promývacím roztokem objeví krystaly solí, je nutné odstranit je zvýšenou teplotou ideálně ve vodní lázni. Takto připravený naředěný roztok je stabilní jeden týden při teplotě +2 °C až +8 °C.

Ostatní roztoky, které jsou součástí soupravy, jsou již naředěné na požadovanou koncentraci. (21)

10.1.5 Zpracování vzorků

Před zpracováním, je vhodné ředící roztok i samotné vzorky šetrně a důkladně promíchat.

Vzorky je nutné naředit v poměru 1:101 ředícím roztokem vzorků a vše důkladně promíchat.

10.1.6 Pracovní postup

Použité reagensy byly vytemperovány na laboratorní teplotu a poté důkladně promíchány. V případě, že by v rámci stanovení nebyly využity všechny stripy, je doporučeno je skladovat v hermeticky uzavřeném původním obalu se sušidlem při teplotě +2 °C až +8 °C. Destičku je třeba uchovat na suchém místě. (21)

1. Byly připraveny pracovní roztoky (viz. kapitola 10.1.4) a vzorky (viz. kapitola 10.1.5).
2. Kontroly (kalibrátory) a zpracované vzorky byly nadávkovány dle schématu.

Semikvantitativní vyhodnocení v indexu pozitivity (IP)

- Jamka A1 byla ponechána prázdná, jedná se o blank.
- Do jedné jamky bylo napipetováno 100 µl Negativní kontroly (Kalibrátor 1).
- Do dvou jamek bylo napipetováno 100 µl CUT-OFF (Kalibrátor 2).
- Do jedné jamky bylo napipetováno 100 µl Pozitivní kontroly (Kalibrátor 3).
- Do zbývajících jamek bylo pipetováno 100 µl vzorků.

Kvantitativní vyhodnocení (v jednotkách IU/ml)

- Jamka A1 byla ponechána prázdná, jedná se o blank.
- Do jedné jamky bylo napipetováno 100 µl Negativní kontroly (Kalibrátor 1).
- Do dvou jamek bylo napipetováno 100 µl CUT-OFF (Kalibrátor 2).
- Do dvou jamek bylo napipetováno 100 µl Pozitivní kontroly (Kalibrátor 3).
- Do dvou jamek bylo napipetováno 100 µl Kalibrátoru 4.
- Do zbývajících jamek bylo pipetováno 100 µl vzorků.

3. Destička byla zakryta víčkem a nechána inkubovat jednu hodinu při 37 °C.

4. Obsah jamek byl odstraněn a pětkrát promyt promývacím pracovním roztokem. Jamky se zaplnily po horní okraj. V závěru byla jamka zbavena přebytečné kapaliny důkladným poklepem o povrch pokrytý savým materiálem.
5. Do všech jamek bylo dávkováno 100 μ l konjugátu. Vynechána byla pouze jamka A1.
6. Destička byla zakryta víčkem a nechána inkubovat jednu hodinu při 37 °C.
7. Obsah jamek byl odstraněn a pětkrát promyt promývacím pracovním roztokem. Jamky se zaplnily po horní okraj. V závěru byla jamka zbavena přebytečné kapaliny důkladným poklepem o povrch pokrytý savým materiálem.
8. Do všech jamek bylo dávkováno 100 μ l jednosložkového substrátu TMB – Complete. V potaz bylo vzato zvýšené riziko znečištění.
9. Destička byla zakryta víčkem a nechána inkubovat 20 minut při teplotě 37 °C na temném místě.
10. Reakce se zastavila přidáním 100 μ l STOP roztoku, pipetována do jamek ve stejném pořadí a ve stejných intervalech jako substrát.
11. Do 30 minut od zastavení reakce byla stanovena intenzita zabarvení roztoků v destičce pomocí fotometru při vlnové délce 450 nm.

10.1.7 Validita testu

Test je platný, pokud:

- Je absorbance blanku menší než 0,150.
- Je absorbance Negativní kontroly (Kalibrátor 1) menší než polovina průměru absorbance CUT-OFF (Kalibrátor 2).
- Je průměrná absorbance CUT-OFF (Kalibrátor 2) v rozmezí 0,200 – 0,800.
- Je absorbance Pozitivní kontroly (Kalibrátor 3) větší než 1,5 násobek průměrné absorbance CUT-OFF (Kalibrátor 2).
- Je absorbance Kalibrátoru 4 větší než absorbance Pozitivní kontroly (Kalibrátor 3).

10.1.8 Hodnocení výsledků

Pro zhodnocení výsledků byl vypočítán tzv. index pozitivity IP. Do čitatele se dosadila naměřená absorbance vzorku a do jmenovatele průměrná absorbance CUT-OFF, naměřena v téže sérii vyšetření. Za předpokladu, že index pozitivity je menší než 0,9, interpretujte výsledek jako negativní. V rozmezí 0,9 – 1,1, lze výsledek považovat za hraniční a od 1,1 a výše se jedná o výsledek pozitivní. V případě naměření hraničních hodnot je zapotřebí test opakovat za 2 – 6 týdnů za použití nově odebraného vzorku s ohledem na specifika onemocnění. (21)

10.1.9 Interference

Souprava byla testována s potencionálně interferujícími látkami a bylo zjištěno, že: bilirubin neovlivňuje výsledek, není-li překročena koncentrace 0,4 mg/ml. Triacylglyceroly interferují při více než 20 mg/ml, hemoglobin 2,5 mg/ml a výsledky může zkreslit i biotin vyskytující se při 3500 ng/ml a více. (21)

10.1.10 Index avidity

Úvod: Avidita protilátky popisuje sílu vazby mezi antigenem a protilátkou. Pro primární infekci se nejprve tvoří protilátky s nízkou aviditou. Během infekce dozrává imunitní odpověď organismu a zvyšuje se avidita protilátek. Během latentní fáze onemocnění jsou protilátky vysoce avidní a při sekundární infekci nebo reaktivaci paměťové B buňky okamžitě produkují protilátky IgG. Měřením vazebné avidity IgG protilátek lze přesněji určit stadium infekce a je dobrým doplňkem sérologické diagnostiky.

Princip testu: Stanovení avidity protilátky je založeno na principu, že vazba mezi antigenem a protilátkou je narušena Avidním roztokem (roztok močoviny). Protilátky s nízkou aviditou jsou Avidním roztokem uvolněny z vazby antigenu a vymyty. Naopak vysoce avidní protilátky většinou zůstávají navázány na antigen i po expozici roztokem. Síla vazby je vyjádřena indexem avidity (IAv), který určuje, kolik protilátky (v procentech) zůstalo navázáno na antigen po inkubaci s Avidním roztokem. Praktické stanovení spočívá v provedení modifikovaného postupu ELISA s použitím Avidního roztoku ve srovnání se standardním postupem ELISA. Stanovení avidity IgG se provádí pouze na IgG pozitivních vzorcích. (21)

10.2 Detekce protilátek EIA metodou pro IgM a IgA

10.2.1 Úvod

Imunoenzymatická souprava slouží k diagnostice parazita *Toxoplasma gondii* stanovením IgM a IgA protilátek v biologickém materiálu. V případě diagnostiky akutní toxoplazmózy, mají protilátky tříd IgM, IgA a IgE klíčovou roli. IgM je velice citlivý marker akutní infekce a může přetrvávat v těle více než rok. Protilátky IgA je možné zachytit 6 – 9 měsíců po akutní infekci. (20), (22)

10.2.2 Princip testu

Souprava využívá metodu EIA, typ capture (tj. zvířecí protilátka vázaná na pevnou fázi proti lidskému imunoglobulinu třídy IgA/IgM - protilátka z testovaného vzorku - tracer, tj. specifický antigen se značenou protilátkou). Značená protilátka je myší monoklonální protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou proti povrchovému proteinu p30 *Toxoplasma gondii*. Peroxidázová aktivita se měří za použití substrátu obsahujícího TMB. Pokud je TMB pozitivní, zmodrá. Všechny reakce se zastaví STOP roztokem a vyšetřovaná kapalina změní svou barvu z modré na žlutou. Intenzita žluté barvy se měří fotometrem (vlnová délka 450 nm), je úměrná koncentraci specifické protilátky přítomné ve vzorku. (20), (22)

10.2.3 Složení soupravy, skladování a expirace

Souprava obsahuje:

- MICROPLATE: potažená destička o velikosti 12 x 8 jamek s navázanou protilátkou.
- CONTROL –: negativní kontrola. Jedná se o roztok, který neobsahuje specifické lidské protilátky. Již dodán v pracovním ředění.
- CUTOFF: Jedná se o roztok, který obsahuje specifické lidské protilátky v hraničním ředění. Již dodán v pracovním ředění.
- CONTROL +: pozitivní kontrola. Tento roztok obsahuje specifické lidské protilátky a je dodáván již v pracovním ředění.
- TRACER: tracer je pufr stabilizující bílkoviny, které obsahují antigen *T. gondii* a konjugát. Tento roztok je dodáván v pracovním ředění
- DILUENT 5: ředící roztok vzorků 5, jedná se o pufr, který obsahuje stabilizátory bílkovin, již v pracovním ředění

- SUBSTRATE 2: TMB – Complete 2. Tento roztok je jednosložkový substrát, který obsahuje TMB nebo peroxid vodíku v pracovním ředění.
- WASH 20x: Promývací roztok neboli 20krát koncentrovaný pufr.
- STOP: zastavovací roztok. Jedná se o roztok kyseliny v pracovním ředění.

Skladování a expirace: Soupravu je třeba skladovat při teplotě +2 °C až +8 °C. Pokud jsou dodrženy skladovací podmínky, je platná doba expirace uvedená na obalu soupravy. Po otevření se doporučuje soupravu spotřebovat do 3 měsíců. Soupravu je třeba chránit před mrazem. (20), (22)

10.2.4 Příprava pracovních roztoků

Promývací roztok byl naředěn v poměru 1:20 tj. 1 díl roztoku a 19 dílů destilované vody. Za předpokladu, že se v lahvičce s promývacím roztokem objeví krystaly solí, je nutné odstranit je zvýšenou teplotou ideálně ve vodní lázni. Takto připravený naředěný roztok je stabilní jeden týden při teplotě +2 °C až +8 °C.

Ostatní roztoky, které jsou součástí soupravy, jsou již naředěné na požadovanou koncentraci.

10.2.5 Zpracování vzorků

Před zpracováním, je vhodné ředicí roztok i samotné vzorky šetrně a důkladně promíchat.

Vzorky je nutné naředit v poměru 1:101 ředicím roztokem vzorků a vše důkladně promíchat.

10.2.6 Pracovní postup

Použité reagenty byly vytemperovány na laboratorní teplotu a poté důkladně promíchány. V případě, že by v rámci stanovení nebyly nevyužity všechny stripy, je doporučeno je skladovat v hermeticky uzavřeném původním obalu se sušidlem při teplotě +2 °C až +8 °C. Destičku je třeba uchovat na suchém místě. (20), (22)

1. Byly připraveny pracovní roztoky (viz. kapitola 10.2.4) a vzorky (viz. kapitola 10.2.5).
 2. Kontroly a zpracované vzorky byly nadávkovány dle schématu.
- Jamka A1 byla ponechána prázdná, jedná se o blank.

- Do jedné jamky bylo napipetováno 100 µl Negativní kontroly.
 - Do dvou jamek bylo napipetováno 100 µl CUT-OFF.
 - Do jedné jamky bylo napipetováno 100 µl Pozitivní kontroly.
 - Do zbývajících jamek bylo pipetováno 100 µl vzorků.
3. Destička byla zakryta víčkem a nechána inkubovat jednu hodinu při 37 °C.
 4. Obsah jamek byl odstraněn a pětkrát promyt promývacím pracovním roztokem. Jamky se zaplnily po horní okraj. V závěru byla jamka zbavena přebytečné kapaliny důkladným poklepem o povrch pokrytý savým materiálem.
 5. Do všech jamek bylo dávkováno 100 µl Traceru. Vynechána byla pouze jamka A1.
 6. Destička byla zakryta víčkem a nechána inkubovat jednu hodinu při 37 °C.
 7. Obsah jamek byl odstraněn a pětkrát promyt promývacím pracovním roztokem. Jamky se zaplnily po horní okraj. V závěru byly jamky zbaveny přebytečné kapaliny důkladným poklepem o povrch pokrytý savým materiálem.
 8. Do všech jamek bylo dávkováno 100 µl jednosložkového substrátu TMB – Complete. V potaz bylo vzato zvýšené riziko znečištění.
 9. Destička byla zakryta víčkem a nechána inkubovat 20 minut při teplotě 37 °C na temném místě.
 10. Reakce se zastavila přidáním 100 µl STOP roztoku, pipetována do jamek ve stejném pořadí a ve stejných intervalech jako substrát.
 11. Do 30 minut od zastavení reakce byla stanovena intenzita zabarvení roztoků v destičce pomocí fotometru při vlnové délce 450 nm.

10.2.7 Validita testu

Test je platný, pokud:

- Je absorbance blanku menší než 0,150.

- Je absorbance Negativní kontroly menší než polovina průměru absorbance CUT-OFF.
- Je průměrná absorbance CUT-OFF v rozmezí 0,200 – 1,000.
- Je absorbance Pozitivní kontroly větší než 1,5 násobek průměrné absorbance CUT-OFF.

10.2.8 Hodnocení výsledků

Pro zhodnocení výsledků byl vypočítán tzv. Index pozitivity IP. Do čitatele se dosadila naměřená absorbance vzorku a do jmenovatele průměrná absorbance CUT-OFF, naměřena v téže sérii vyšetření. Za předpokladu, že index pozitivity je menší než 0,9, interpretujte výsledek jako negativní. V rozmezí 0,9 – 1,1, lze výsledek považovat za hraniční a od 1,1 a výše se jedná o výsledek pozitivní. V případě naměření hraničních hodnot je zapotřebí test opakovat za 2 – 6 týdnů za použití nově odebraného vzorku s ohledem na specifika onemocnění. (20), (22)

10.2.9 Interference a zkřížená reaktivita

Soupravy byly testovány s potencionálně interferujícími látkami a bylo zjištěno, že: bilirubin neovlivňuje výsledek, není-li překročena koncentrace 0,4 mg/ml. Triacylglyceroly interferují při více než 20 mg/ml, hemoglobin 5 mg/ml a výsledky může zkreslit i biotin vyskytující se při 3500 ng/ml a více.

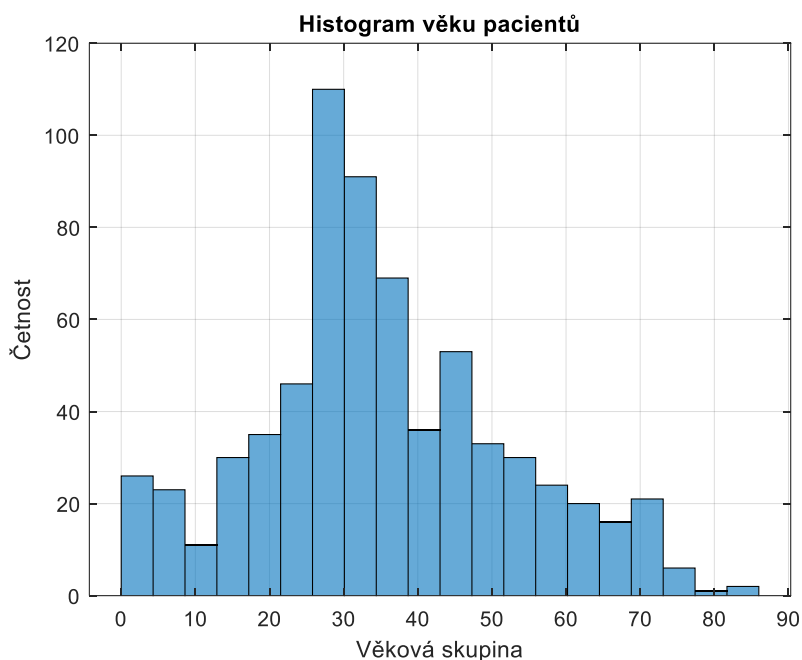
U soupravy na stanovení IgA byla v jednom případě z 23 zjištěna zkřížená reaktivita, kdy test vyšel pozitivně v přítomnosti ANA nespecifických protilátek. Tento totožný jev byl zachycen i při testování soupravy pro IgM na zkříženou reaktivitu, u IgM vyšel pozitivní výsledek i u *Treponema pallidum* a to v jednom případě ze šesti. (20), (22)

11 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

11.1 Věk pacientů

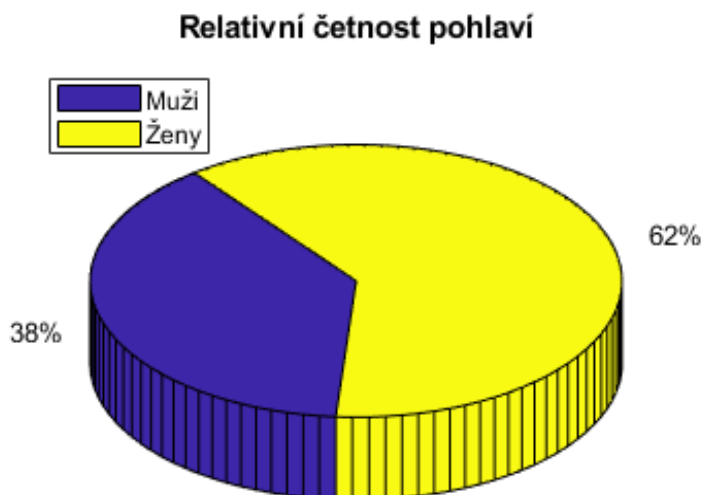
Graf zachycující rozmanitost zkoumaného souboru s ohledem na věk pacientů. V grafu jsou zahrnuti ženy i muži, celkem 683 pacientů.

Graf 1: Histogram věku pacientů



Graf zachycující četnost pohlaví ve zkoumaném souboru. Muži 262 (38%) ženy 421 (62%).

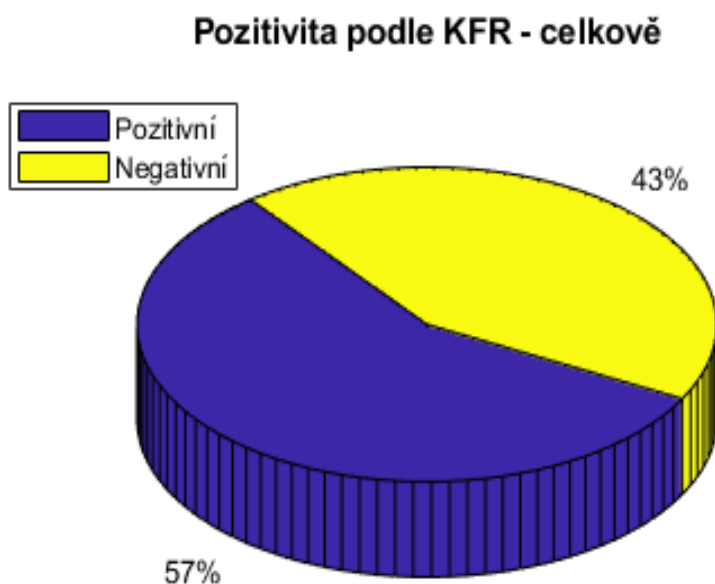
Graf 2: Relativní četnost pohlaví



11.2 Výsledky dle KFR

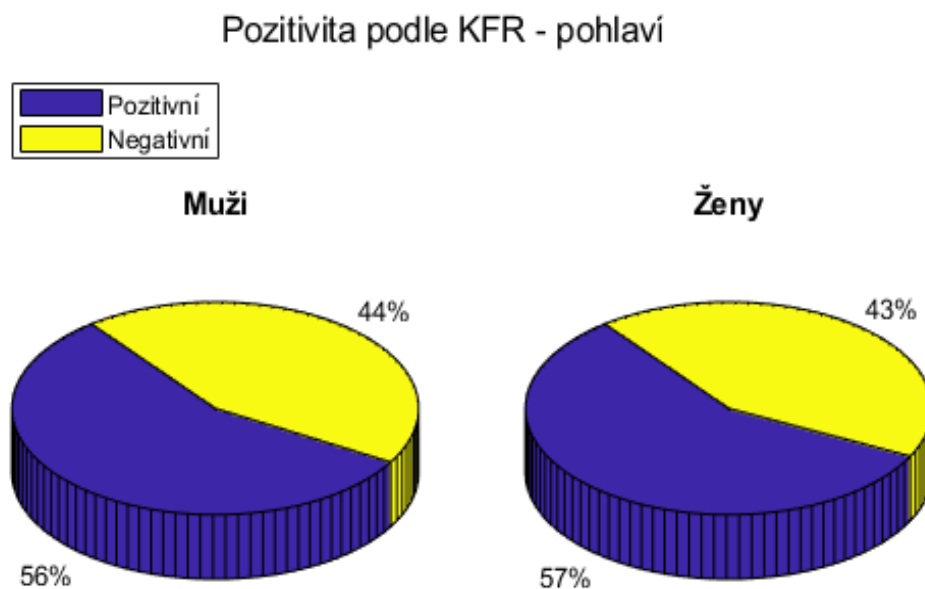
Celkový soubor obsahoval 578 pacientů, z čehož metodou komplement – fixační reakce, vyšlo 43% pacientů jako pozitivní tj. 328 a 57% výsledků negativních, tedy zbylých 250.

Graf 3: Pozitivita podle KFR - celkově



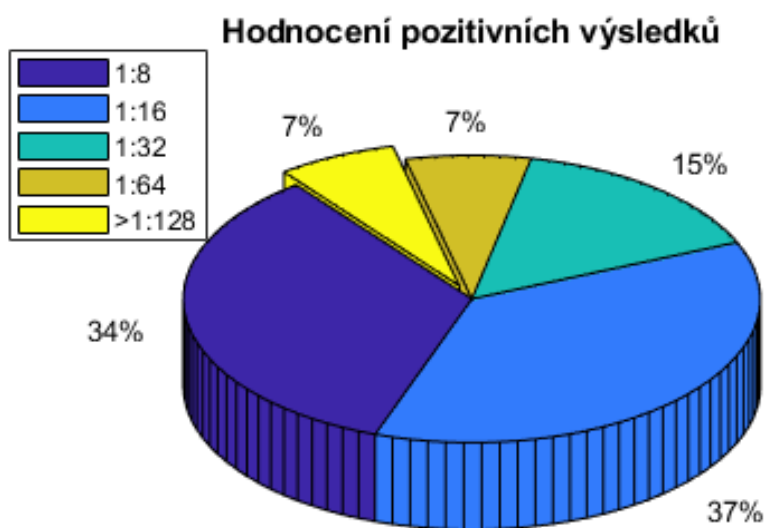
V následujícím grafu jsou výsledky zpracovány obdobně metodou KFR, jsou však rozdělené dle pohlaví na muže a ženy, kde pozorujeme pozitivitu u mužů 56% tedy 128 pozitivních pacientů a 44% negativních tj. 100. U žen 200 výsledků vyšlo pozitivně (57%) a 150 mělo výsledek negativní (43%).

Graf 4: Pozitivita podle KFR - pohlaví



Metoda KFR umožňuje ověřovat závažnost onemocnění vzhledem k zjištěnému titru protilátek. K vyhodnocení tohoto grafu bylo z celkového souboru využito 328 (pozitivní výsledky). Titr protilátek 1 : 8 mělo 112 pacientů (34%), 1 : 16 mělo 121 (37%), 1 : 32 mělo 50 (15%), titr 1 : 64 vyšel pouze 23 pacientům (7%) a 1 : 128 a více mělo 22 (7%).

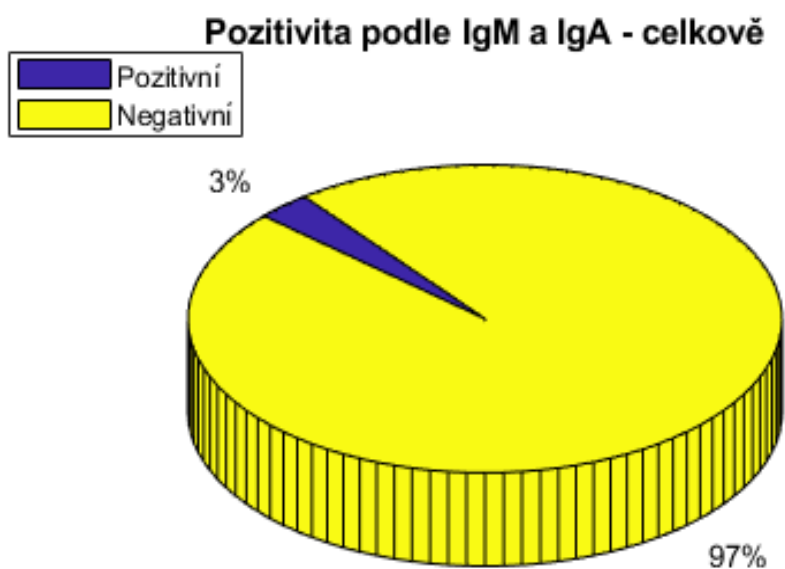
Graf 5: Hodnocení pozitivních výsledků



11.3 Výsledky vyšetření imunoglobulinů

Graf znázorňující akutní průběh onemocnění ze souboru 441 výsledků. Z čehož pacientů s negativním výsledkem bylo 428 tedy 97% a akutním průběhem onemocnění bylo postiženo pouze 13 pacientů (3%).

Graf 6: Pozitivita podle IgM a IgA - celkově



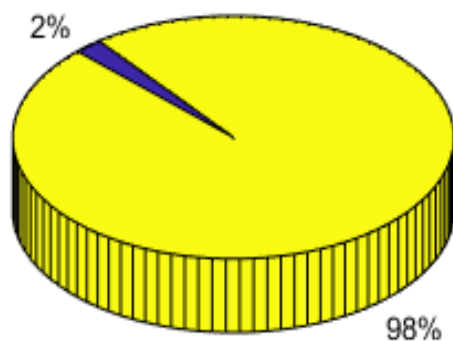
Obdobně byl sestrojen i následující graf, ovšem s ohledem na pohlaví. U mužů bylo zjištěno 194 (98%) negativních výsledků a 4 (2%) výsledky pozitivní v akutní fázi. U žen 247 (97%) negativní a 6 (3%) pozitivních výsledků v akutní fázi.

Graf 7: Pozitivita podle IgM a IgA - pohlaví

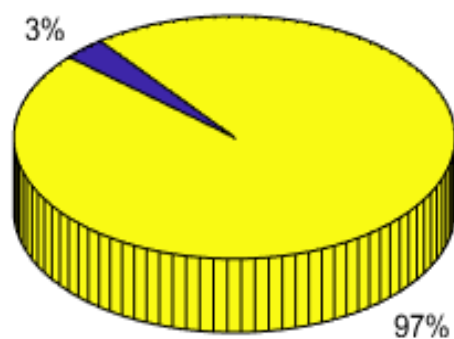
Pozitivita podle IgM a IgA - pohlaví



Muži

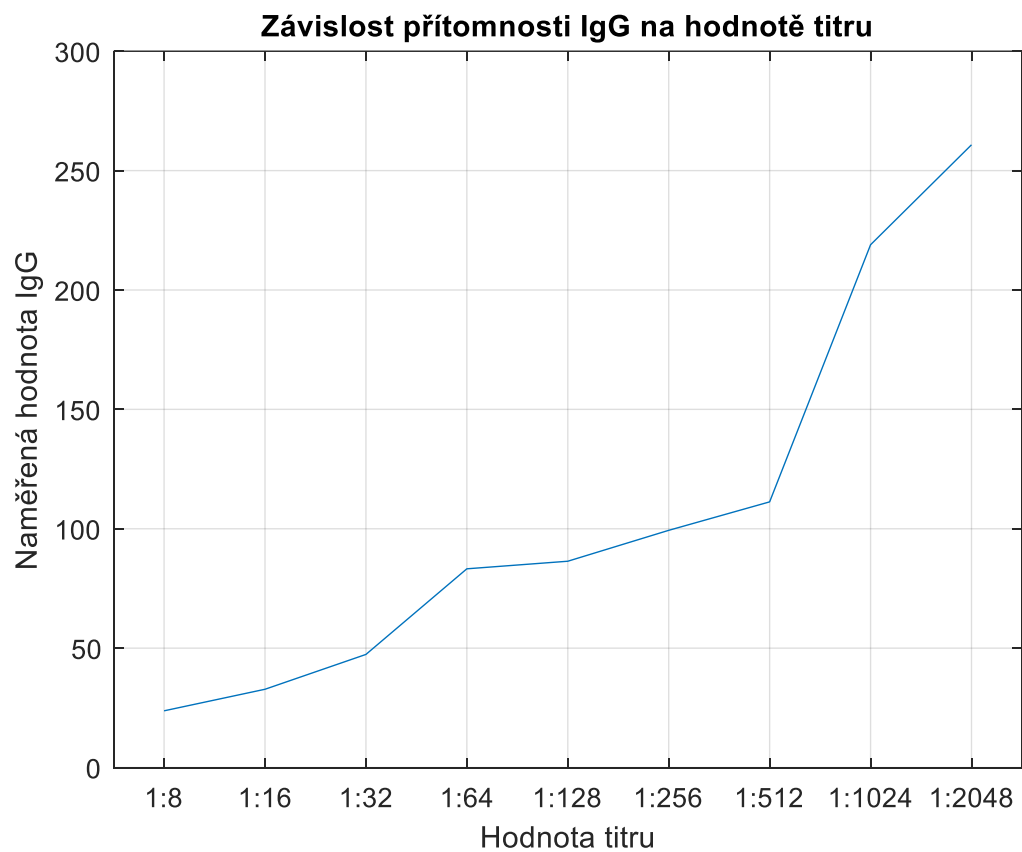


Ženy



V tomto grafu je vyobrazena závislost IgG na titru protilátek, kde je patrná přímá úměra.

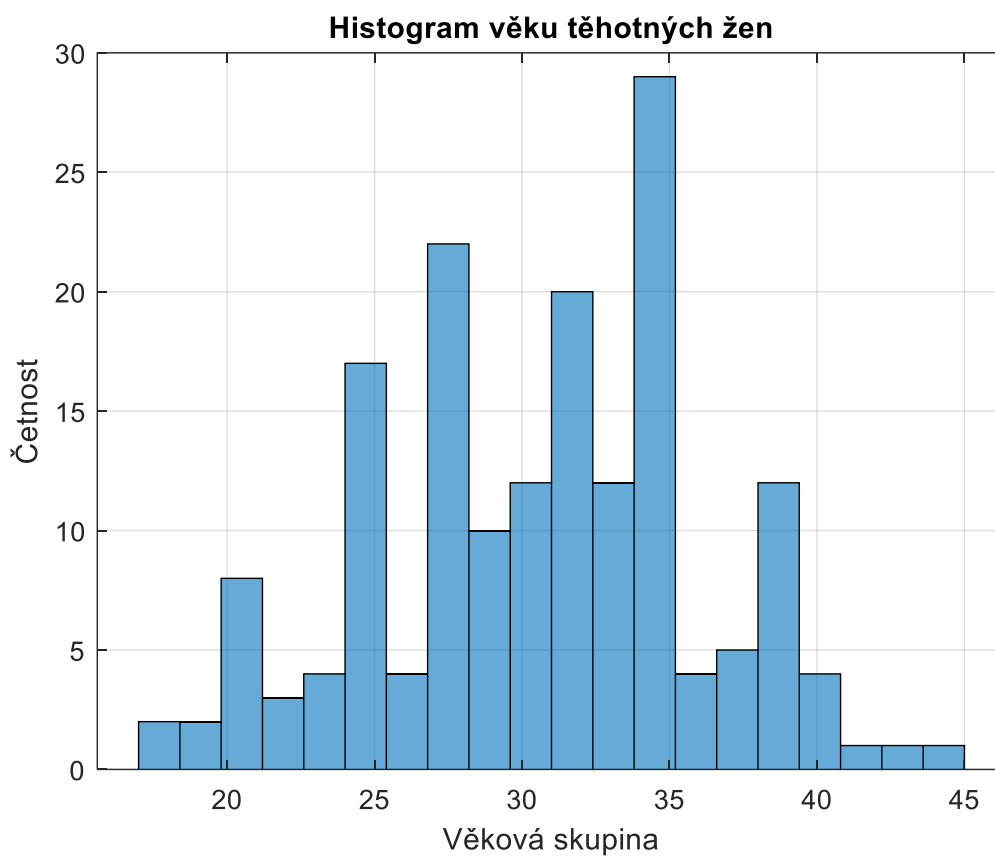
Graf 8: Závislost přítomnosti IgG na hodnotě titru



11.4 Vyhodnocení výsledků gravidních žen

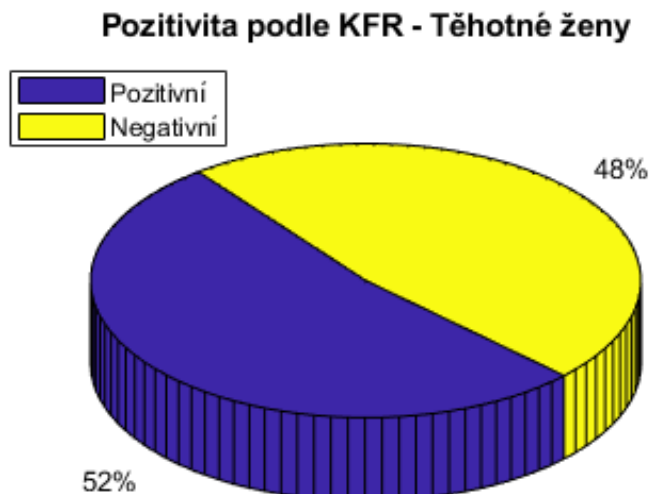
Z celkového souboru bylo vyfiltrováno 173 těhotných žen (25,3% ze všech stano-
vení) v průměrném věku 30 let.

Graf 9: Histogram věku těhotných žen



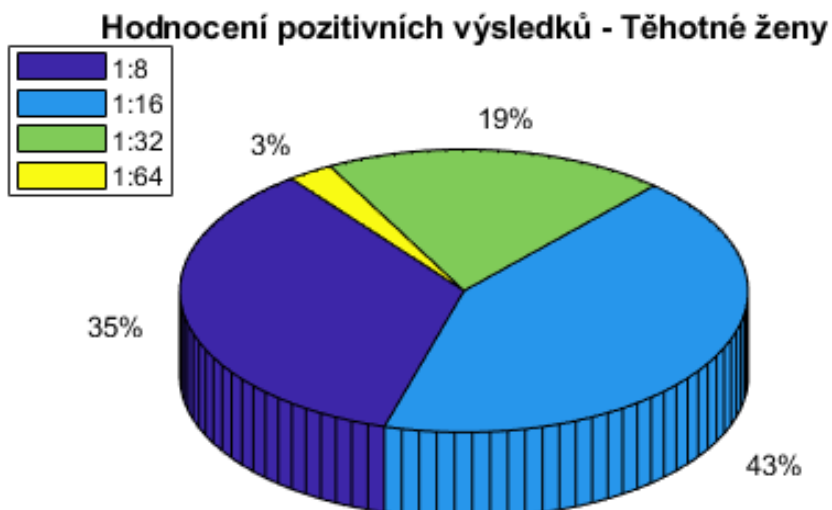
Ze 173 těhotných žen, byla pozitivita metodou KFR zjištěna u 77 (52%) pacientek a negativní výsledek mělo 70 (48%) vyšetřených. U zbylých těhotných nebyla metoda KFR využita.

Graf 10: Pozitivita podle KFR - Těhotné ženy



Metodou KFR byl u gravidních, pozitivních žen (77) stanoven i titer protilátek, z grafu je patrné, že titer 1 : 8 mělo 27 (35%) pacientek, titer 1 : 16 mělo 33 (43%) pacientek, titer 1 : 32 mělo 15 (19%) pacientek a titer 1 : 64 pouze 2 (3%) pacientky. Akutně probíhající onemocnění se v mém souboru nevyskytlo.

Graf 11: Hodnocení pozitivních výsledků - Těhotné ženy



DISKUZE

Hlavním cílem mé bakalářské práce bylo zjistit jaká je prevalence protilátek proti *T. gondii* v Plzeňském kraji za rok 2022. Je třeba zdůraznit, že vyšetření protilátek a jejich případná pozitivita nemusí být vždy důkaz onemocnění pacienta. Nízké titry v KFR nám pouze říkají, že člověk byl infikován v minulosti. Takže z našeho pohledu jsou i nízké titry hodnoceny jako pozitivní výsledek, ale není to aktuální důkaz nemoci.

Z celkového souboru 683 pacientů bylo metodou KFR vyšetřeno 578 vzorků, z čehož 328 (43%) mělo pozitivní výsledek. V grafu č. 1 je vyobrazen věk pacientů, vyplývá z něj, že průměrný věk je 35 let. Obdobný je graf č. 8, který zachycuje věk pouze těhotných žen. Zde se průměrný věk pohybuje okolo 30 let. Důvodem takto nízkého průměrného věku je právě vyšetření gravidních, a žen ve fertilním věku. Jak bylo již v teoretické části zmíněno, toxoplazmóza v graviditě může mít velice vážný dopad na plod a těhotné jsou proto řazeny do rizikové skupiny a je u nich doporučen screening, alespoň v prvním trimestru. U 105 vzorků nebyla reakce KFR provedena.

Výsledky získané metodou KFR zachycuje i graf č.4, kde jsou výsledky rozděleny na pozitivní a negativní a odděleny dle pohlaví. Pozitivní výsledek mělo 128 mužů tj. 56% a 200 žen tedy 57%. Negativní pak 100 mužů (44%) a 150 žen (43%). Na těchto výstupech je velmi zřetelně vidět, že onemocnění toxoplazmózou není na pohlaví vůbec závislé. I přes fakt, že žen bylo v souboru nepatrně více než mužů, výsledky v procentech pro obě pohlaví se shodují. Metoda komplement fixační reakce udává také titr protilátek, ze kterého je možné zjistit, zda je onemocnění akutní a probíhá aktuálně v čase stanovení nebo zda se pacient setkal s onemocněním v minulosti. Tyto informace zachycuje graf č. 5. Pozitivní výsledky interpretujeme od titru 1:8 a pravděpodobně akutní průběh od 1 : 128. Titr 1 : 8 mělo v mém souboru 112 pacientů (34%), 1 : 16 - 121 (37%), 1 : 32 - 50 (15%), titr 1 : 64 vyšel pouze 23 pacientům (7%) a 1 : 128 a více mělo 22 (7%).

Zda se jedná o aktuálně probíhající onemocnění lze určit také stanovením protilátek tříd IgM a IgA. Vyšetřeno touto metodou bylo celkem 441 pacientů, kdy 428 z nich mělo negativní výsledek tj. 97% a akutní průběh se potvrdil pouze u 13 (3%), tyto informace zachycuje graf č. 6. V grafu č.7, jsou poté tyto výsledky dále rozděleny mezi muže a ženy, kdy u mužů bylo 194 (48%) negativních a 4 (2%) pozitivních, tedy akutních případů. Obdobně se v procentech pohybovaly i výstupy u žen kdy 247 (97%) mělo výsledek negativní a pouze 6 (3%) pozitivní. U 242 patientských sér nebyly ELISA reakce provedeny.

Dále jsem zkoumala závislost titru protilátek zjištěné metodou KFR s množstvím protilátek IgG, kde je velmi zřetelně patrná přímá úměra, tzn. čím vyšší titr protilátky, tím vyšší hodnota IgG v séru pacienta.

V souboru výsledků se vyskytovalo 173 gravidních žen. Metodou KFR bylo vyšetřeno 147 pacientek. Sérologicky negativních bylo 70 žen tedy 48% a pozitivních 77 (52%). Tyto výsledky jsou vyobrazeny v grafu č. 8. U pozitivních byly vyšetřeny titry protilátek, kde se titr vyšší než 1 : 128, značící akutní průběh nevyskytoval. Titr 1 : 8 mělo 27 gravidních tj. 35%. Dále 1 : 16 – 33 (43%), 1 : 32 – 15 tj. 19% a titr 1 : 64 měly pouze 2 pacientky, tedy 3%. Zvýšenou pozornost prevenci by měly věnovat především těhotné ženy se sérologicky negativním výsledkem.

Dalším cílem bylo přiblížit a popsat problematiku toxoplazmózy a její diagnostiky. Tomuto tématu jsem se věnovala především v teoretické části této bakalářské práce, kde jsem popsala nejen biologii, životní cyklus a cesty přenosu parazita, ale věnovala jsem několik kapitol i formám onemocnění. Velmi podrobně jsem rozebrala také možnosti laboratorní diagnostiky, od metod využívaných v minulosti až po ty, které se pro svou náročnost ať již technickou, či finanční v praxi nevyužívají. Stručně jsem zmínila také terapii a preventivní opatření, zejména pro ohrožené skupiny.

ZÁVĚR

V teoretické části mé bakalářské práce jsem úspěšně splnila cíl přiblížit problematiku toxoplazmózy a popsat metody laboratorní diagnostiky. Z odborné literatury vyplynula závažnost onemocnění *T.gondii* pro děti gravidních žen, které jsou parazitem infikovány a pro imunokompromitované jedince. V dnešní době jsou již dostupné screeningové metody, nejvíce užívané EIA a KFR se vyznačují svou spolehlivostí a přesností v rámci laboratorní diagnostiky. Stěžejní pro správnou diagnózu a následnou léčbu bývá však spojení výsledků vyšetření a klinického obrazu. Pro ohrožené skupiny je důležité věnovat zvýšenou pozornost prevenci a onemocnění ideálně předejít.

V praktické části je již z prvních výsledků patrné, že zkoumanému souboru dominovaly ženy ve fertilním věku. Dále jsem věnovala zvýšenou pozornost výsledkům pocházejících od gravidních žen a pečlivě je vyhodnotila

I přes fakt, že je toxoplazmóza poměrně dobře popsané téma, zůstávají některé otázky nezodpovězené a vybízejí tak k dalším výzkumům.

SEZNAM LITERATURY

1. AKYAR, Isin (Editor). *Toxoplasmosis*. London : InTechOpen , 2017. ISBN 978-953-51-3270-7.
2. AL-ADHAMI, Batol H., a další. *Food and Waterborne Parasitology*. Ottawa : Elsevier, 2016. Sv. 2. ISSN 2405-6766.
3. BOŠTÍK, Pavel, a další. *Pediatric pro praxi*. Olomouc : Solen, s.r.o, 2016. Sv. 17. ISSN 1213-0494.
4. BOUGHATTAS, Sonia. *Frontiers. Detection of Toxoplasma gondii in raw caprine, ovine, buffalo, bovine, and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR methods in Iran*. [Online] 2015. [Citace: 18. Prosinec 2022.] https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00215/full?fbclid=IwAR0e0ju4BZsW3EaZk8ZUtcN_GLOqjVh5k59nn0BAxE5DgoM-QXHmZRUeWj4.
5. CAR-BLANCHARD, Mary a CLARK, Valerie K. Moshedi eye center. *Ocular Toxoplasmosis - Eye Infection*. [Online] 2022. [Citace: 5. Prosinec 2022.] https://www.moshedieyecenter.com/patient-education/ocular-toxoplasmosis-eye-infection-464/?pesource=622&fbclid=IwAR1iTGkTGIAxI6bYFTsclJZYMmEy2PEpwewKCJ_Of0mo5GK-iLJDdjwZFCA.
6. GANGNEUX, Florenc Robert a DARDÉ, Marie-Laure. *Clinical Microbiology Reviews*. Washington : American Society for Microbiology, 2012. Sv. 25. ISSN: 0893-8512.
7. GARNAUD, C., FRICKER-HIDALGO, H. a EVENGARD, B. *Clinical Microbiology and Infection*. Basel : Elsevier, 2020. Sv. 26. ISSN: 1470-9465.
8. GELENEKY, Markéta, KODYM, Petr a PRÁŠIL, Petr. *Infektologie.cz. Doporučený postup pro diagnostiku a léčbu toxoplazmózy*. [Online] 7. listopad 2019. [Citace: 22. září 2022.] <https://infektologie.cz/DoporToxo17.htm>.
9. GOERING, Richard V., Hazel M. DOCKRELL, Mark A. ZUCKERMAN, Ivan M. ROITT a Peter L. CHIODINI, JULÁK, Jaroslav. *ed. Mimsova lékařská mikrobiologie. 5. vydání*. Praha : Triton, 2016. ISBN 978-80-7387-928-0.

10. JÍRA, Jindřich. *Lékařská protozoologie: protozoální nemoci*. Praha : Galén, c2009. ISBN 978-80-7262-381-5.
11. KOUBA, Karel, JÍRA, Jindřich a HÜBNER, Jiří. *Toxoplazmóza*. Praha : Avicenum, zdravotnické nakladatelství, 1974.
12. MACHALA, Ladislav, KODYM, Petr a ČERNÝ, Rudolf. Interní medicína pro praxi. *Toxoplazmóza*. [Online] 2005. [Citace: 15. Prosinec 2022.] <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2005/03/03.pdf?fbclid=IwAR1LEFJKRevsOKLXWtzFBqHPKioeED4yANxewpqBVHFUVuBrrq9HmC50y0E>.
13. MURRAY, John F., a další. *Murray & Nadel's textbook of respiratory medicine 5th ed.* Philadelphia : Saunders Elsevier, 2010. ISBN 978-1-4160-4710-0.
14. SEIDL, Zdeněk. *Neurologie pro studium i praxi, 2., přepracované a doplněné vydání*. Praha : Grada Publishing, a.s., 2015. ISBN 978-80-247-5247-1.
15. TESINI, Brenda L. MSD MANUAL professional version. *Congenital Toxoplasmosis*. [Online] Merck Sharp & Dohme Corp., 2023. [Citace: 3. Únor 2023.] https://www.msmanuals.com/professional/pediatrics/infections-in-neonates/congenital-toxoplasmosis?fbclid=IwAR0_rk8aGYyW7xUtDZuWbXFWnXYtWC6cmMN-UICzo4kVq5gAANNUusZsmrc.
16. TOMANEK, Radim. Baria. *Metoda ELISA aspekty jednotlivých uspořádání*. [Online] 10. Květen 2019. [Citace: 14. Prosinec 2022.] <https://www.baria.cz/blog/metoda-elisa-aspekty-jednotlivych-usporadani/?fbclid=IwAR2K4I7-2FPOXzg16aTmxdbyGpaf7XUzdmvOCuTiLcEuc9woKpSa600tu7k>.
17. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno : Neptin, c2010. ISBN 978-80-86850-04-7.
18. WEISS, Louis M. a KIM, Kami. *Toxoplasma Gondii, The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods 2nd ed.* London : Elsevier Ltd., 2013. ISBN 9780123964816.
19. ZHOU, Zier, a další. *Current Problems in Cardiology*. New York : Mosby Inc., 2021. Sv. 46. ISSN 0146-2806.
20. TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. SmartEIA Toxoplasma IgA. 2022.

21. TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. SmartEIA Toxoplasma IgG. 2022.
22. TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. SmartEIA Toxoplasma IgM. 2022.
23. Vitalion. *Toxoplasmóza*. [Online] MAFRA, 2022. [Citace: 16. Listopad 2022.] <https://nemoci.vitalion.cz/toxoplasmoza/>.
24. Vyšší odborná škola zdravotnická a Střední zdravotnická škola Hradec Králové. *KFR (komplement fixační reakce)*. [Online] [Citace: 14. Prosinec 2022.] <https://labmet.zshk.cz/vyuka/KFR-komplement-fixacni-reakce.aspx>.

SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1: Povolení sběru informací ve FN Plzeň

PŘÍLOHY

Příloha 1: Povolení sběru informací ve FN Plzeň



Vážená paní
Kateřina Pacandová
Studentka oboru *Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví*
Fakulta zdravotnických studií, Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví
Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Utvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem a zpracováním anonymizovaných dat a výsledků laboratorních metod, používaných v *Ústavu mikrobiologie (MIKRO) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Laboratorní diagnostika toxoplazmózy*“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vrchní zdravotní laborantka MIKRO souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně provedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb.,** o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené, odborné praxe a pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je pan **Fajfrlík Karel, RNDr., Ph.D., přednosta MIKRO FN Plzeň**.

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chobrová
manažerka pro vzdělávání a výuku NEL2P
zástupkyně náměstkyně pro aš. péči

Útvar náměstkyně pro aš. péči FN Plzeň
tel.: 377 103 204, 377 402 207
e-mail: chobrovas@fnplzen.cz

1. 6. 2022