

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zdravotně sociální fakulta

## **Sérologická diagnostika toxoplasmózy**

bakalářská práce

Autor práce: Eliška Kaasová  
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví  
Studijní obor: Zdravotní laborant

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

Datum odevzdání práce: 3.5.2013

## Abstrakt

Toxoplasmóza způsobená prvokem *Toxoplasma gondii* je jednou z nejrozšířenějších kosmopolitně se vyskytujících parazitóz teplokrevných živočichů i lidí. V České republice je jím nakaženo přibližně 30% obyvatelstva. Jejím původcem je intracelulární parazit se složitým fakultativně heteroxenním životním cyklem, který zahrnuje několik vývojových stádií.

Infekce u většiny zdravých jedinců probíhá inaparentně, popřípadě se slabými klinickými příznaky. Avšak velké komplikace nebo dokonce smrt může způsobit infekce nebo reaktivace latentní formy infekce u lidí s imunodeficiencí. Při akutní primoinfekci žen v prvním trimestru těhotenství může vážně poškodit vyvíjející se plod. Tomu lze předcházet včasnou detekcí parazita screeningovým vyšetřením těchto rizikových skupin.

Laboratorní diagnostika využívá dvou základních metod průkazu toxoplasmózy, a to buď přímým nebo nepřímým průkazem. Přímé metody jako je mikroskopický průkaz parazita nebo izolace *Toxoplasmy gondii* na laboratorních zvířatech se běžně v praxi nevyužívají. V posledních letech se do popředí dostávají metody molekulární biologie zaměřené na přímý důkaz nukleové kyseliny parazita v biologickém materiálu. Tyto metody jsou vysoce specifické i senzitivní a poskytují rychlý výsledek. Z těchto molekulárních metod své uplatnění v laboratořích nachází polymerázová řetězová reakce (PCR).

Metody nepřímého průkazu se zakládají na detekci specifických stop, zanechaných v organismu infekčním agens. Mezi nimi se v rutinním provozu většiny laboratoří v České republice nejvíce využívá sérologických metod. Základním principem je reakce antigenu a protilátky. Podle vyšetřených protilátek lze určit, zda je nákaza v akutní či chronické fázi a o jaký typ toxoplasmózy se jedná. Za „zlatý standard“ je dodnes považovaný Sabin-Feldmanův test, který byl poprvé využit k sérologickému průkazu toxoplasmózy. Dále byly vyvinuty další testy jako intradermální a imunofluorescenční test, komplement fixační reakce, nepřímá hemaglutinace, mikroprecipitace nebo imunoenzymatické metody.

Metody stanovení nejsou vždy ideální, proto je v rutinní diagnostice potřeba tyto metody různě kombinovat, aby vzájemně vykompenzovaly své nedostatky. Nutné je i vzít ohled na individuální odchylky pacientů a v případě potřeby opakovat stanovení za 2-3 týdny.

K určení diagnózy obvykle nestačí pouhý průkaz protilátek, ani stanovení jejich množství. Zásadní je určit fázi infekce, proto je potřeba dokázat zda se hodnoty jednotlivých tříd imunoglobulinů (popřípadě titrů celkových protilátek) zvyšují, snižují či mají stabilní hodnoty. V určitých případech může být rozhodující avidita IgG.

Primární infekce je v akutní fázi charakterizována strmým vzestupem protilátek třídy IgA a IgM, pozvolněji stoupá hladina IgG. Pro latentní toxoplasmózu je charakteristická nepřítomnost IgA a IgM, protilátky třídy IgG jsou prokazatelné v nízkých až středních hodnotách a přetrvávají celoživotně. Stanovuje se také avidita IgG, kdy se v průběhu infekce postupně vytvářejí stále pevnější vazby IgG s antigenem. To napomáhá určení fáze infekce, což bývá v terapii rozhodující.

Cílem této bakalářské práce je detekovat protilátky proti *Toxoplasma gondii* a vyhodnotit jejich prevalenci pomocí sérologických metod a tyto metody vzájemně porovnat. Soubor vyšetřovaných vzorků pochází z Fakultní nemocnice Plzeň parazitologického a sérologického oddělení, proto je v závěru práce zahrnuto hodnocení výskytu infekce v Plzeňském kraji.

Nejčastěji se v rutinním provozu užívá komplement fixační reakce ke stanovení celkových protilátek, popřípadě se doplňuje stanovením hodnot jednotlivých imunoglobulinových tříd metodou Enzyme-linked immunosorbent assay.

U pacientů s prokázanou toxoplasmovou infekcí pomocí KFR, kdy je titer protilátek 1:8 a vyšší, je potřeba stanovení doplnit o metodu ELISA a tak zjistit hladiny jednotlivých tříd imunoglobulinů. Tato diagnostika se postupně vyvíjela od náročných a složitých postupů směrem k rychlé a plně automatizované diagnostice.

Celkem bylo stanoveno 68 vzorků pacientů s podezřením na toxoplasmózu. Ve sledované skupině byli sledováni muži, ženy i děti. Po zvážení faktorů, které mohou ovlivňovat reakci se na základě KFR vyloučila infekce (negativní výsledek) u 26 osob. U zbylých 43 pacientů byla prokázána pozitivní reakce na přítomnost protilátek. Po

porovnání pozitivních výsledků i nízkých titrů s klinickým stavem pacienta či s hodnotami naměřenými v minulosti se indikovalo stanovení metodou ELISA u 41 vyšetřovaných osob. V konečném důsledku byla za měsíc srpen roku 2012 detekována akutní toxoplasmová infekce celkem u 4 osob.

Klíčová slova: *Toxoplasma gondii*, toxoplazmóza, KFR, ELISA

## **Abstract**

Toxoplasmosis caused by the protozoan *Toxoplasma Gondii* is one of the most widespread parasitic infection in the world, occurring in organism of both warm-blooded animals and humans. Its agent is an intracellular protozoan which life cycle is facultative heteroxen and includes several stages of development. Approximately 30% of population in the Czech Republic is infected.

The majority of healthy individuals have no symptoms, in some cases there are slight clinical signs. However, serious health complications or even death may be caused either by infection or reactivation of the latent form of infection among people with immunodeficiencies. Toxoplasmosis can inflict a severe fetal damage when a female is infected for the very first time in the first trimester of pregnancy. This can be prevented by the risk group screening and an early detection of the protozoan.

Laboratory diagnostics use two basic methods in order to prove toxoplasmosis, a direct one and an indirect one. The direct methods such as a microscopic evidence of the protozoan or the isolation of *Toxoplasma Gondii* on laboratory animals are not usually used in practice. In recent years methods of molecular biology focused on the proof of the protozoan's nuclear acid in the biological material come to the fore. These methods are highly specific as well as sensitive. Therefore rapid results are provided. As regards these methods, mainly polymerase chain reaction (PCR) is used commonly in labs.

The methods of indirect evidence are based on the detection of specific traces left by the infectious agent in human organism. Among them, serological methods are the most commonly used ones in the routine operation in the majority of laboratories in the Czech Republic. A basic principle is reaction between antigen and antibody. It is possible to determine whether the infection is in acute or chronic phase and what type of infection it is. Sabin-Feldman's test has been considered as a "gold standard" until these days. This test was utilized for serological evidence of toxoplasmosis for the first time. Then other tests were made. That includes intradermal and immunofluorescent tests, complement fixation test, indirect hemagglutination, microprecipitation or immunoenzymatic methods.

Methods of evidence are not always optimal, therefore it is necessary to combine various methods in routine diagnostics in order to mutually compensate their imperfections. Individual deviations of patients must be also taken into consideration and repeat testing in 2 or 3 weeks if it is necessary.

The mere evidence of the presence of antibodies is not usually sufficient for diagnosis. Determination of the phase of infection is essential, therefore it is needed to prove if the value of each class of immunoglobulins (or titers of all antibodies) increases, decreases or if they have a stable value. In some cases the avidity IgG may be crucial.

The primary infection in acute phase is characterized by a sharp rise of antibodies of IgA and IgM class, the level of IgG rises slowly.

Latent toxoplasmosis is characterized by the absence of IgA and IgM, IgG are found in low and medium levels and they persist throughout the life. The IgG avidity is also determined by tests, when bindings between the IgG and antigen become increasingly stronger in the course of infection. This facilitates determination of the phase of infection, which is usually relevant in the therapy.

The aim of this bachelor thesis is to detect antibodies against *Toxoplasma Gondii* and to evaluate their prevalence by using serological methods. And finally, these methods will be compared. The patient samples originate from the department of parasitology and serology of Fakultní nemocnice Plzeň, therefore there is an evaluation of the incidence of infection in Pilsen region.

The complement fixation test is the most commonly used in routine operation for determination of the total level of antibodies or this test is supplemented by determination of levels of individual immunoglobulin classes by using the Enzyme linked immunosorbent assay.

If there is the evidence of infection of toxoplasma by using KFR and the antibody titer is 1:8, it is necessary to supplement the determination by ELSA method to ascertain the level of immunoglobulin classes. This diagnosis has gradually developed from demanding and complex procedures towards fast and fully automated diagnosis.

In total, 68 samples of patients with suspicion of toxoplasmosis were determined. The monitored group includes men, women and children. After consideration of the factors which may influence the reaction and on the basis of KFR, the infection of 26 persons was eliminated (negative results). The remaining 43 patients had a positive reaction for the presence of antibodies. After comparing the positive results and low titers with the clinical state of the patient or with the values measured in the past, the determination by the method of ELISA was indicated among 41 persons. The final result for August 2012 was the detection of acute toxoplasma infection of 4 people.

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis, KFR, ELISA

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne (datum)

.....

(jméno a příjmení)



## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala RNDr. Karlu Fajfrlíkovi, Ph.D. za poskytnutí laboratoře, cenné informace, připomínky a ochotu, s jakou mi napomáhal, abych byla schopna vypracovat mou bakalářskou práci. Dále bych chtěla poděkovat všem laborantkám ve FN Plzeň Bory na oddělení sérologie a parazitologie, které mi ve všem vyšly vstříc s neuvěřitelnou snahou a trpělivostí. Děkuji!

# Obsah

<i>Úvod</i> .....	13
<i>1. Současný stav</i> .....	14
<i>1.1 Toxoplasma gondii</i> .....	14
<i>1.1.1 Historie</i> .....	14
<i>1.1.2 Taxonomie</i> .....	15
<i>1.1.3 Morfologie</i> .....	15
<i>1.1.4 Životní cyklus</i> .....	18
<i>1.2 Epidemiologie a prevence</i> .....	20
<i>1.3 Imunologie</i> .....	21
<i>1.4 Klinický obraz</i> .....	24
<i>1.4.1 Kongenitální infekce</i> .....	24
<i>1.4.1.1 Viscerální forma</i> .....	25
<i>1.4.1.2 Cerebrální forma</i> .....	25
<i>1.4.1.3 Forma vrozených poruch</i> .....	26
<i>1.4.1.4 Vrozená oční toxoplasmóza</i> .....	26
<i>1.4.2 Akvirovaná infekce</i> .....	26
<i>1.4.2.1 Uzlinová (lymfoglandulární) forma</i> .....	27
<i>1.4.2.2 Neurotoxoplasmóza</i> .....	27
<i>1.4.2.3 Získaná oční toxoplasmóza</i> .....	28
<i>1.4.2.4 Exantémická (septikemická) forma</i> .....	28
<i>1.4.3 Vliv na psychiku hostitele</i> .....	28
<i>1.5 Terapie</i> .....	30
<i>1.6 Laboratorní diagnostika</i> .....	31
<i>1.6.1 Přímé metody</i> .....	32
<i>1.6.1.1 Mikroskopie</i> .....	32
<i>1.6.1.2 Izolační pokus</i> .....	33
<i>1.6.1.3 Molekulárně-genetické metody</i> .....	33
<i>1.6.2 Nepřímé metody</i> .....	34
<i>1.6.2.1 Sabinova-Feldmanova reakce</i> .....	35
<i>1.6.2.2 Imunofluorescenční test</i> .....	35

1.6.2.3	<i>Western blot</i> .....	36
1.6.2.4	<i>Avidita</i> .....	36
2.	<i>Cíle práce</i> .....	37
3.	<i>Metodika</i> .....	38
3.1	<i>Biologický materiál</i> .....	38
3.2	<i>Komplement fixační reakce (KFR)</i> .....	38
3.2.1	<i>Princip metody</i> .....	39
3.2.2	<i>Laboratorní vybavení</i> .....	39
3.2.3	<i>Reagencie a příprava roztoků</i> .....	40
3.2.4	<i>Kontroly</i> .....	41
3.2.5	<i>Pracovní postup</i> .....	42
3.2.6	<i>Hodnocení</i> .....	43
3.3	<i>ELISA</i> .....	43
3.3.1	<i>Princip metody</i> .....	44
3.3.2	<i>DSX - automatický ELISA systém</i> .....	44
3.3.3	<i>Reagencie a příprava roztoků</i> .....	46
3.3.4	<i>Pracovní postup</i> .....	46
3.3.5	<i>Hodnocení</i> .....	47
4.	<i>Výsledky</i> .....	48
4.1	<i>Interpretace výsledků</i> .....	48
4.1.1	<i>Akutní fáze</i> .....	48
4.1.2	<i>Latentní fáze</i> .....	49
4.2	<i>Vlastní výsledky</i> .....	50
5.	<i>Diskuze</i> .....	52
6.	<i>Závěr</i> .....	58
7.	<i>Seznam použitých zdrojů</i> .....	59

## Seznam použitých zkratek

AIDS – syndrom získaného selhání imunity  
APC – antigen prezentující buňka  
CD – Cluster Designation  
CNS – centrální nervová soustava  
ČR – Česká republika  
DNA – deoxyribonukleová kyselina  
DSD – dodecylsulfát sodný  
ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay  
HIV – virus lidské imunitní nedostatečnosti  
HS – hemolytický systém  
IgA (M,G) – imunoglobulin A (M,G)  
IL – interleukin  
INF – interferon  
iNOS – indukovatelná syntetáza oxidu dusnatého  
KFR – komplement fixační reakce  
MHC – hlavní histokompatibilní komplex  
NK – negativní kontrola  
NRL – národní referenční laboratoř  
PCR – polymerázová řetězová reakce  
PK – pozitivní kontrola  
SZÚ – státní zdravotní ústav  
TCR – receptor T buněk  
Th – pomocný T lymfocyt  
QC – kontrola správnosti provedení testu

## Úvod

I když je pokrok ve výzkumu parazita *Toxoplasma gondii* značný a spousta otázek kolem něj je zodpovězena, stále ohrožuje určité skupiny lidí na životě. To je jeden z důvodů, proč jsem si ke zpracování bakalářské práce vybrala právě téma sérologická diagnostika toxoplasmózy.

Tato antropozoonóza způsobená prvokem *Toxoplasma gondii* je kosmopolitně rozšířena. U imunokompetentních osob probíhá akutní infekce inaparentně, popřípadě se slabými klinickými projevy, proto nebývá často správně rozpoznána. Tento průběh infekce či reaktive latentní infekce může způsobit těžké zdravotní komplikace nebo dokonce smrt u rizikových skupin.

Včasná detekce a případné nasazení účinné léčby je proto rozhodující pro zdravotní stav napadených osob. Způsobů diagnostiky toxoplasmózy je mnoho ale v České republice je průkaz založen především na sérologických metodách.

Tato práce je po zvážení náročnosti, dostupnosti a rychlosti metod zaměřena na vyšetření titru celkových protilátek metodou komplement fixační reakce (KFR) a identifikaci jednotlivých tříd protilátek metodou Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).

# 1. Současný stav

## 1.1 Toxoplasma gondii

### 1.1.1 Historie

Parazit byl objeven v roce 1908 vědci Nicolle a Manceuax z Pasteurova ústavu v Tunisku u severoafrického hlodavce gundiho saharského (*Ctenodactylus gundi*) a pojmenovali ho *Toxoplasma gondii*. Nezávisle na nich v témže roce izoloval toxoplasmu z mozku králíka Splendor v Brazílii. Později byla prokazována i u dalších teplokrevných živočichů.

Důležitým bodem ve výzkumu byl objev českého oftalmologa Dr. Josefa Janků, který jako první popsal toxoplasmu ve vztahu s onemocněním člověka. V roce 1923 pozoroval cystické útvary v histologických řezech poškozené sítnice zemřelého dítěte s hydrocefalem, mikroftalmem a kolobomem žluté skvrny. (1,2,3,4,5)

Komplement fixační reakci do diagnostiky zavedli Nicolau a Tabela roku 1937 a postupně ji zdokonalili Warren se Sabinem. Základy sérologických metod na průkaz toxoplasmových protilátek položili v roce 1948 Sabin a Feldman, když popsali Sabin-Feldmanův test (dye test), který je dodnes považován za „zlatý standard“. V témže roce Frenkel detekoval toxoplasmovou infekci intradermálním testem, ve kterém použil toxoplasmový antigen toxoplasmin. Postupně byly zavedeny další sérologické metody jako imunofluorescenční test (Goldman, 1957), nepřímá hemaglutinace (Jakobs a Lunde, 1957), mikroprecipitace a aglutinační reakce. (2)

V letech 1969-1970 byl objasněn složitý vývojový cyklus parazita, kterému předcházely pokusy Dubeye (1967) o přenos toxoplasmózy vajíčky kočičí škrkavky (*Toxocara cati*). Tím poukázal na význam kočky jako definitivního hostitele. Zároveň to vedlo ke zjištění, že k přenosu může dojít i jiným způsobem než kočičími výměty a posléze objevení dalších vývojových stádií. (1,6)

### 1.1.2 Taxonomie

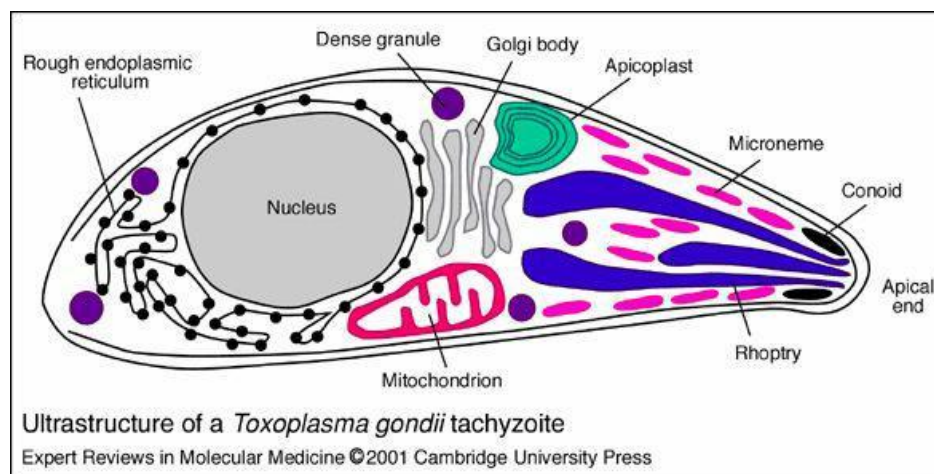
Systematická klasifikace prvoka *Toxoplasma gondii* nebyla vždy jednoznačně určena. Například v roce 1954 byla *Toxoplasma* zařazena Westphanem z důvodu její biologické a patogenní podobnosti do čeledi *Trypanosomidae* nebo byla roku 1956 vytvořena samostatná třída *Toxoplasmea*. (1)

V současnosti je *Toxoplasma* taxonomicky zařazena do říše *Protozoa* (prvoci), kmene *Apicomplexa* (výtrusovci), který je charakterizován určitou buněčnou strukturou, uspořádáním organel a cytoskeletového komplexu na apikálním konci buňky, třídy *Coccidea* (kokcidie), řádu *Eimeriida*, čeledi *Eimeriidae*, rod a druh *Toxoplasma gondii*. (1,2)

### 1.1.3 Morfologie

Rodový název *Toxoplasma* je odvozený z řeckého slova toxon (oblouk, luk) pro typický rohlíkovitý tvar vegetativní formy parazita. (1,2,) Mohou se vyskytovat ve třech různých stádiích vývoje: bradyzoiti, tachyzoiti a sporozoiti. (7, 8).

Třívrstevný obal buňky je složen z vnější buněčné membrány a vnitřního membránového komplexu. Na povrchu buňky je celistvost membrány přerušena na anteriorním pólu polárním prstencem, uprostřed mikropórem a na posteriorním pólu přerušením vnitřního membránového komplexu. Dva apikální prstence nasedají na konoid, který je složený z mikrotubulů. Konoidem procházejí rhoptrie (toxonomy) až k plasmolemě. Dále se v buňce nachází mikronemy, plastidová organela apikoplast, jádro obsahující jádérko, endoplasmatické retikulum s ribosomy, mitochondrie, Golgiho komplex a u tachyzoitů denzní tělíska (granule).



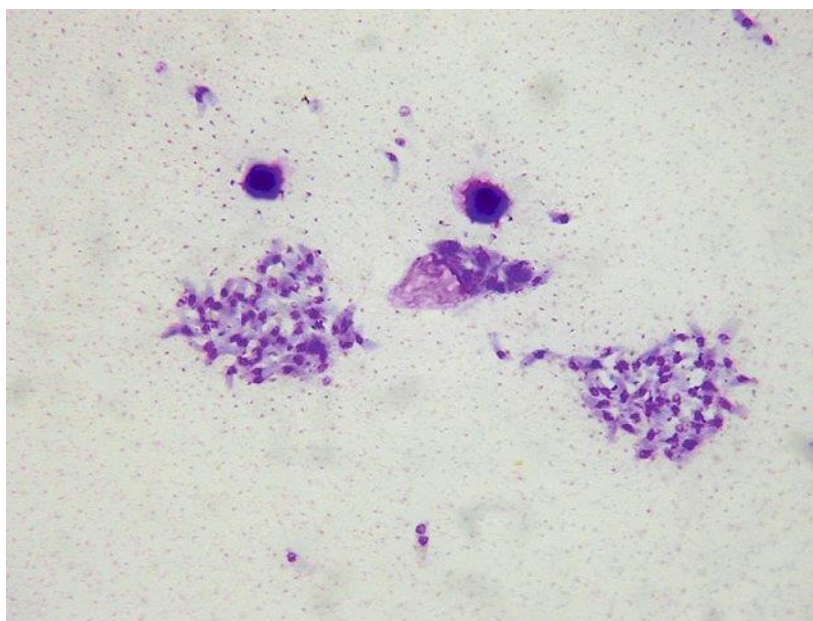
Obr.č.1: ultrastruktura tachyzoitů

(Zdroj: (33) )

Pohyb zesiluje toxoplasmě infekčnost, únikové aktivity a migraci membránami. Pohybuje se pomocí cytoskeletu klouzavým pohybem, nemá k tomu uzpůsobené jiné orgány, proto využívá interakcí vnitřního membránového komplexu a mikrotubulů. Konoid je poháněn aktinmyosinovým motorem. Sekrece proteinu za účasti vápníku zesiluje rychlost pohybu.

Tachyzoit (též trofozoit či endozoit) je vegetativní forma, která má půlměsícovitý tvar a velikost 4-8 x 2-3  $\mu\text{m}$ . Na jednom konci je kuželovitě zúžený a na druhém zaoblený. Kulovité jádro je uloženo spíše centrálně a obsahuje jadérko. Během akutní infekce nebo při reaktivaci latentní infekce můžeme najít v hostitelské buňce útvar, který se nazývá pseudocysta. Obsahuje až 32 tachyzoitů a dochází zde k jejich množení. Po rozpadu pseudocysty kolují tachyzoiti v tělních tekutinách a napadají další buňky hostitele, kde tvoří rozetovité útvary. Na podnět adaptivní imunity hostitele se mění na intracelulární formu zvanou bradyzoit. K této konverzi dochází pomocí  $\text{INF-}\gamma$ , který aktivuje makrofágy a stabilizuje cystické formy. Molekulární podstata encystace nebyla do dnešní doby zcela vysvětlena.





Obr. č.2: shluky tachyzoitů

(Zdroj: <http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id17383/?taxonid=133040>)

Bradyzoit (cystozoit) má morfologickou stavbu podobnou tachyzoitům. Parazitoformní vakuola v hostitelské buňce je vyplněna stovkami až tisíci bradyzoitů a označuje se jako tkáňová cysta (zoitocysta). Je to klidová forma kulovitého či oválného tvaru o velikosti 15 – 300  $\mu\text{m}$ . Je obklopena silnou, hladkou a elastickou membránou, která je odolná proti mechanickému tlaku i proti působení trávicích mechanismů. Nejčastěji se vyskytuje v CNS a kosterní svalovině, ale může být v podstatě ve všech tkáních a orgánech. V této formě může *Toxoplasma* přežít a pomalu se množit v těle hostitele, stabilizována jeho imunitním systémem pravděpodobně po celý život jako latentní infekce. Reaktivace onemocnění je charakteristická konverzí bradyzoitů v tachyzoity.

Sporozoiti mají velikost 1,5 x 6  $\mu\text{m}$ . Mají organely typické pro infekční druhy kokcií, jako jsou rhoptrie, mikronemy, denzní granule, konoid, mitochondrie a lipidová a amylopektinová zrna. Obsahuje apikoplast neboli multimembránovou vakuolu. Sporozoti jsou obsaženi po čtyřech ve sporocystách a dvě vejčité sporocysty jsou umístěny uvnitř oocysty, což je konečné infekční stádium pohlavního cyklu

parazita vylučované definitivním hostitelem. Vysporulovaná oocysta izosporového typu (tetrazoická a bisporická) má velikost 14 x 11  $\mu\text{m}$ . Jsou velmi odolné a přežívají až 18 měsíců. (1,4,5,9,10,11)



Obr.č.3: Oocysta

(Zdroj: <http://zoobergognone.blogspot.cz/2011/04/speciale-prevenzione-parassiti-interni.html>)

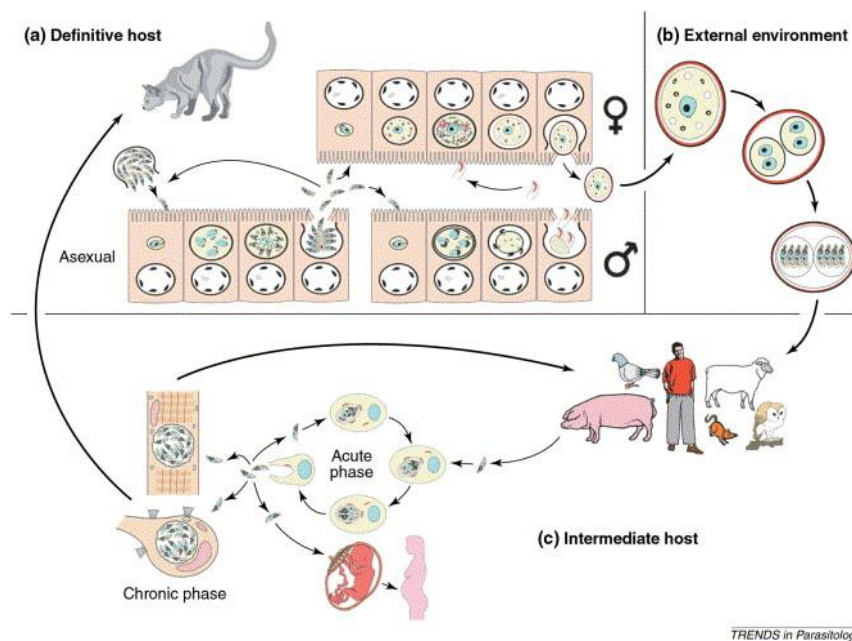
#### 1.1.4 Životní cyklus

Má fakultativně heteroxenní (dvouhostitelský) životní cyklus, který zahrnuje několik forem vývojových stádií. Charakteristické je střídání definitivního hostitele, kterým bývá nejčastěji kočka domácí (ale může jím být jakákoli kočkovitá šelma) a mezihostitele, kterého představují všechny druhy teplokrevných živočichů (savci, ptáci) i lidí. (5,7,8,11).

Pohlavní (izosporová, gametická, kokcidiová, endogenní...) fáze rozmnožování probíhá ve střevním traktu definitivního hostitele. K vývoji dochází především v ileu na vrcholcích střevních klků v enterocytech mezi kutikulou a jádrem. Při první fázi mnohonásobného množení schizogonii (merogonii) se ve vývojové formě několika generací mnohojaderných schizontů vytváří zpravidla 16 - 18 jednojaderných merozoitů, kteří pronikají do dalších buněk. Během další fáze gametogonie dochází ke změně merozoitů na nezralá sexuální stádia (gametocyty). Ještě před vytvořením stěny

oocysty se pohyblivé mikrogamety z lumen střeva dostanou do makrogamety. Musí překonat parazitoforní vakuolu a hostitelskou buňku. K tomu slouží pohyb za pomoci chemotaktických mechanismů. Poté dochází k oplození (ke splynutí gamet), tím pádem i ke vzniku nové oocysty, která z nakažené buňky vypadne. Tomuto procesu se říká sporogonie. K exogenní sporulaci na oocysty dochází až ve vnějším prostředí mimo trávicí trakt definitivního hostitele, který je vylučuje jednou za život po dobu několika týdnů obvykle za doprovodu průjmů. Oocysty se však už nemnoží. K další replikaci dochází až při diferenciaci v tachyzoity nepohlavním rozmnožováním.

Nepohlavní neboli vegetativní fáze rozmnožování tachyzoitů (rychle se množící formy) probíhá ve tkáních mezihostitele i definitivního hostitele a označuje se jako endodygonie. Nejprve dochází k excystaci vysporulované oocysty na sporozoity, kteří pronikají do střevních buněk. Tam se dělí jádro a posléze i všechny zbylé buněčné orgány. Vzniknou dva dceřiní jedinci, kteří se uvolní z mateřské buňky a ta se rozpadne. Na ni navazuje další fáze gametogonie nebo opět endodygonie. (1,4,5,10,11,12)



Obr.č.4: Životní cyklus

(Zdroj: (33) )

## 1.2 Epidemiologie a prevence

Zdrojem nákazy jsou infikované kočky nebo kočkovité šelmy, které se nachází v období aktivního vylučování oocyst nebo jakýkoliv teplokrevný obratlovec sloužící *Toxoplasma gondii* jako mezipositel.

Vstupní branou infekce jsou veškeré sliznice (především ty lépe dostupné z povrchu těla), střevní trakt, porušená kůže, placenta a ojediněle i respirační trakt. Inkubační doba se pohybuje v rozmezí 10 dnů až 3 týdnů.(13)

K nákaze může dojít alimentární cestou přenosu konzumací nedostatečně tepelně upraveného masa, ale i mléčných výrobků obsahujících tkáňové cesty nebo pozřením oocyst na zelenině, rostlinách a v půdě. Další možnou cestou je fekálně-orální přenos, kontaktně (například styk poraněné kůže s půdou) nebo transplacentárně. Vzácněji se infekce může přenést kapénkami, spojivkovým vakem, kožními oděrkami, při pokousání zvířetem, případně i postransfúzně.(3,5,9,14) Jelikož je nákaza rozšířena kosmopolitně, lze za rizikový faktor považovat i cesty do tropických a subtropických zemí. (8) Známý je i lokální výskyt infekce v Kanadě, kde se roku 1995 lidé nakazili infikovanou vodou z obecního vodovodu (15).

Při přenosu z matky na plod dochází v první fázi k pomnožení trofozoitů v placentě a ve druhé za 4 – 6 týdnů přestupuje na plod. (3) V České republice je kongenitální toxoplasmóza spíše raritou a vyskytuje se asi u dvou promile neléčených gravidních žen. (16)

Podle statistik prováděných SZÚ je v České republice infikováno latentní toxoplasmózou celkem 32,1 % obyvatel, 34,1 % dospělých žen a 26,3 % mužů. (5,17) Je prokázáno, že vyšší výskyt infekce je u obyvatel venkova než u osob bydlících v městských aglomeracích. Například v Praze bylo zjištěno 24,8 % a na venkově 41,7 % pozitivních testů na toxoplasmózu. Pravděpodobně to souvisí s rozdílným životním stylem. (3,5) V závislosti na potravinových zvyklostech se prevalence obyvatelstva také liší. Séropozitivita je častější v zemích (Francie téměř 90 %), kde lidé více

konzumují nedostatečně tepelně zpracované maso. (16) U HIV pozitivních pacientů je prevalence onemocnění poněkud vyšší, a to 42,7 % u žen a u mužů 42,8 %. (18)

V prvních letech výzkumu HIV byla mozková forma toxoplasmózy jednou z hlavních příčin úmrtí pacientů s AIDS. V dnešní době se snižuje její výskyt převážně v rozvinutých zemích z důvodu zavedení účinné léčby. (19)

K zamezení šíření infekce je nutné dodržovat jistá preventivní opatření. Mezi primární patří dodržování osobní hygieny, zejména po kontaktu se syrovým masem, dostatečná tepelná úprava pokrmů a pečlivě omytá zelenina a ovoce. Nákaza oocystami z kočičích výkalů není příliš častá vzhledem k tomu, že její infekčnost trvá 7-18 dní. Přesto by se kočky neměly krmit syrovým masem. Jediná kočka může vyloučit až 100 miliónů oocyst. Hlavně těhotné ženy by měly patřičně dodržovat hygienické návyky vzhledem k možnosti poškození plodu. (5,8,9,20) Předcházet této cestě přenosu lze pravidelným čištěním kočičího záchodu a používáním ochranných pomůcek nebo důsledným mytím rukou při práci na zahradě nebo dětských pískovištích. (19)

Mezi sekundární prevencí můžeme zahrnout vyšetření protilátek pracovníků při vstupní prohlídce do zaměstnání, kteří se profesně stýkají se zvířaty (veterináři, pracovníci masokombinátů a zoologických zahrad,..). Screening všech gravidních žen a následné sledování těch séronegativních by snížilo riziko kongenitální infekce. Také zavedení profylaktické léčby imunodeficitních pacientů by zabránilo reaktivaci, popřípadě manifestaci onemocnění. (16) Dodržování preventivních opatření má smysl u séronegativních imunodeficitních pacientů. (19)

Každé nové onemocnění by mělo být hlášeno a statisticky evidováno. Nejúčinnější prevencí je informovanost veřejnosti o tomto problému a screening gravidních žen.

V některých rozvinutých zemích s vysokým výskytem toxoplasmózy je zavedena povinná preventivní sérologická diagnostika toxoplasmózy u gravidních žen. (16)

### **1.3 Imunologie**

Průnik patogenu do organismu hostitele způsobí vždy obranou reakci. Imunitní systém člověka používá v boji proti toxoplasmóze humorální, ale především buněčnou

složku imunity. (13) Nejdříve se aktivuje antigenně nespecifická (vrozená, neadaptivní), později antigenně specifická (získaná, adaptivní) imunita. *Toxoplasma gondii* je schopna vyvolat onemocnění a unikat kontrole imunity pomocí únikových mechanismů jako je imunosuprese nebo antigenní variabilita. (21)

Účel je zabránit průniku parazita do organismu, popřípadě ho eliminovat nebo alespoň omezit šíření infekce. (22)

Mechanismy vrozené imunity jsou zprostředkovány neutrofily a trombocyty. Zásadní význam pro imunitní odpověď hostitele na počátku infekce má zvláště INF- $\gamma$ .

Jedním z prvních projevů imunitní reakce je přestup neutrofilů z periferní krve do infikovaných tkání. *Toxoplasma gondii* může pronikat do neutrofilů, a odolávat intracelulární degradaci (tím uniká fagocytóze). Infikované neutrofily zpomalují dělení toxoplasem. K tomu samému účelu slouží i destičkový aktivační faktor (PAF), který je produkován při aktivaci trombocytů. Projevem infekce je přítomnost zvýšeného počtu  $\gamma\delta$ T-lymfocytů a účast NK buněk na stimulaci makrofágů k produkci IL-1, IL-12 a INF- $\gamma$  (5, 21)

*Toxoplasma gondii* jako intracelulární parazit indukuje v těle hostitele převážně imunitní reakci typu Th1, která tvorbou INF- $\gamma$  vede k aktivaci makrofágů. Dojde k pohlcení parazita aktivovanými makrofágy. Některé hydrolytické fragmenty pocházející z toxoplasem se váží na MHC gp II (hlavní histokompatibilní komplex, glykoproteiny II. třídy) a tyto komplexy se exprimují na povrchu makrofágů. Aby byly tyto komplexy rozeznány Th buňkami pomocí TCR (povrchový receptor T-lymfocytů) a vytvořil se dostatečně pevný kontakt obou buněk, je potřeba kostimulačního signálu. Ten vznikne vazbou receptoru CD 28, receptoru pro IL-12 a dalších povrchových adhezivních a signalizačních molekul. Důsledkem těchto vazeb je pomnožení specifického klonu a diferenciaci na efektorové Th1 buňky.

Th1 produkuje cytokin IFN- $\gamma$ . Jeho vlivem dochází k aktivaci dalších makrofágů, kteří produkují enzym iNOS (indukovatelná syntetáza oxidu dusnatého) a jeho působením dochází k produkci oxidu dusnatého s baktericidními mechanismy. Plazmatické buňky vlivem interferonu- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) syntetizují IgG2, který se dobře váže na Fc receptor makrofágů a tím je aktivuje. Aktivované makrofágy poté mnohem lépe

likvidují intracelulární parazity a obecně stimulují lokální zánět, který napomáhá k potlačení infekce.

Další mechanismus podílející se na obranyschopnosti hostitele zprostředkovávají Th2 buňky, které byly předem stimulovány rozeznáním antigenu na povrchu profesionální antigen prezentující buňky (APC, hlavně dendritické buňky) za přítomnosti IL-4. Th2 produkcí cytokinů (hlavně IL-4, IL-5, IL-6) a přímým kontaktem přes TCR, kostimulační receptor CD 40 a adhezivní molekuly spolupracuje s B-lymfocyty. Tato interakce vede k pomnožení B-lymfocytů a jejich diferenciaci v plazmatické buňky, které produkují imunoglobuliny proti *Toxoplasmě gondii*. (22)

Protilátky se objevují od 2. týdne po infekci a maximálních hodnot dosahují po 3 měsících. Postupně se jejich titer snižuje a v nízkých hodnotách přetrvává po celý život. (4)

Onemocnění mohou vyvolat ty mikroorganismy, které jsou schopny uniknout imunitním mechanismům (intracelulární paraziti unikají mechanismům fagocytózy) nebo je překonat. Jedním z únikových mechanismů toxoplasem, který brání lyzozomálním enzymům ji poškodit, je inhibice fúze parazitoforní vakuoly s lyzozomy. Dalším mechanismem je neschopnost tachyzoitů aktivovat alternativní cestu komplementu (21,22)

## **1.4 Klinický obraz**

Rozeznáváme dvě základní formy toxoplasmózy a to kongenitální (vrozenou) a akvirovanou (získanou). Jsou rozdílné průběhem i klinickými příznaky. (1,2,5,11,16)

Podle orgánové lokalizace ji lze dělit na formy: cerebrální, oční, uzlinovou, viscerální, neurologickou, exantémickou a formu postižení vnitřních orgánů. Díky pantropii má toxoplasmóza velice obsáhlou symptomatologii. (5,13) Při této infekci dochází k multiorgánové diseminaci, ale bývá nejvíce postižen pouze jeden systém. (3)

### **1.4.1 Kongenitální infekce**

Kongenitální toxoplasmóza je klinicky nejzávažnější. Vzniká důsledkem transplacentárního přenosu primoinfekce ženy v těhotenství nebo těsně před otěhotněním. (3) Pokud se žena nakazila během svého života před graviditou a nachází se v latentní fázi infekce, vytvořila si jistou formu imunity, která snižuje možnost další infekce na minimum, a proto se nepovažuje za nebezpečnou.

Až v 50% případů znamená neléčená toxoplasmová primoinfekce matky v graviditě transplacentární přenos infekce na plod. (16) Míra poškození plodu je přímo závislá na době kdy dojde k nakažení matky. Avšak neznamená to, že dítě musí být v každém případě poškozené. Čím dříve k primoinfekci matky dojde, tím je riziko přenosu na plod přes placentu a následné poškození dítěte větší. Pokud k ní dojde, může způsobit plodové anomálie a spontánní abortus. (5)

Nákaza v prvním trimestru sebou nese nejvyšší riziko přenosu na plod (< 10 %) (16). Ve druhém a třetím trimestru se rozsah poškození a riziko abortu progresivně snižuje, ale plod je náchylnější k akvirování infekce.

Důsledkem kongenitální toxoplasmózy mohou být psychomotorické, eventuelně mentální retardace, demence či epileptický syndrom. (3) Podle příznaků je možné kongenitální toxoplasmózu roztrždit do několika forem. (1)



### 1.4.1.1 Viscerální forma

Vyskytuje se poměrně vzácně a odpovídá stádiu generalisované infekce. Dochází k rozsevu parazitů ve vnitřních orgánech plodu. Děti se rodí většinou předčasně s poruchami dýchání, žloutenkou, otoky, krvácením do kůže a jsou cyanotické. Lze zjistit pneumonii, myokarditis a hepatosplenomegalie. Později se mohou projevovat poruchy CNS. (1,5)

### 1.4.1.2 Cerebrální forma

Odpovídá subakutnímu průběhu infekce s omezením lokalizace parazitů na mozek a zrakový orgán. Klinický obraz je charakteristický pod pojmem Sabinova tetřada, která zahrnuje chorioretinitidu, hydrocefalus, křeče a mozkové kalcifikace. Zpravidla jde o okluzivní hydrocefalus, kdy lebka získává na objemu, jako následek uzávěru postraních komor nebo Sylviova akvaduktu proliferující granulomatózní ependymitidou. Charakteristický je „příznak zacházejícího slunce“, kdy dochází ke stlačení očního bulbu dolů a dopředu. Následkem je zmizení okraje duhovky pod dolní víčko. Rozvinutá cerebrální forma má i přes komplexní léčebnou péči většinou maligní průběh a smrt nastává do několika dnů až týdnů.(1,3,5)



Obr.č.5: Novorozenec s hydrocefalem

(Zdroj: <http://www.pathobio.sdu.edu.cn/sdjsc/engparabook/ch084.htm>)

### **1.4.1.3 Forma vrozených poruch**

Odpovídá subakutnímu nebo chronickému stádiu mozkové formy toxoplasmózy. Není natolik závažná. Dítě přežívá jen s patrnými poruchami neurologického nebo tělesného vývoje. Léčba má na tyto příznaky příznivý účinek. (1,5)

### **1.4.1.4 Vrozená oční toxoplasmóza**

Hlavním příznakem této formy je většinou jednostranná chorioretinitis. Zpravidla se projeví v prvním až druhém roce života. Nejčastěji se chorioretinitis rozpozná jako zánětlivé ložiskové onemocnění v oblasti žluté skvrny. Bývá postižena sítnice i cévnatka. Můžeme nalézt atrofickou jizvu (pseudokolobom) jako výsledný stav těžkého nekrotizujícího procesu. Toxoplasmové ložisko je ohraničené, bělavé (následek atrofie a destrukce cévnatky), oválného nebo kulovitého tvaru se skvrnami pigmentu. (1,5)

## **1.4.2 Akvirovaná infekce**

Touto formou toxoplasmózy se mohou postnatálně nakazit děti, adolescenti i dospělé osoby. (5) Asi u 80 – 90 % osob nakažených toxoplasmózou probíhá akutní infekce asymptomaticky. Jediným důkazem může být detekce antitoxoplasmových protilátek. Pokud se infekce projeví, má pouze nespecifické klinické příznaky jako je zvýšená teplota, chřipkovitý stav, bolest hlavy, únavnost nebo zduření mízních uzlin. (16) Tento průběh může být nebezpečný u gravidních žen, kdy může dojít k poškození či smrti plodu. I tuto formu lze dělit dle nejvýraznějších klinických projevů. (3,23)

### **1.4.2.1 Uzlinová (lymfoglandulární) forma**

Nejčastější klinický projev toxoplasmózy je charakteristický chřipkovými příznaky s lymfadenopatií. (24) Vyskytuje se převážně u mladých lidí. Asi 10 % všech zánětů mízních uzlin je způsobeno toxoplasmózou. (16)

Lymfatické uzliny se při akutní fázi zvětšují někdy i po dobu několika týdnů i měsíců. Jsou měkké, hladké, pevné, nebolestivé, volně pohyblivé, bez otoku, horkosti a bez zarudnutí. Nedochozí k hnisání ani tvorbě píštělí. Nejčastěji se jedná o zvětšené uzliny na krku a šíjí, za ušním boltcem a na zadním okraji kývačů. Lymfoglandulární toxoplasmóza bývá spojena se syndromem chronické únavy navazující na lymfadenopatii. (5)

Onemocnění má dobrou prognózu a během několika týdnů dojde k ústupu klinických příznaků a přestupu do latentní fáze infekce.

Komplikovaný průběh není běžný ale pokud nastane, může dojít k poškození vnitřních orgánů, které se projevuje jako myokarditida, pneumonie, hepatitida. Znamé je i poškození CNS encefalitidou nebo polyradikuloneuritidou. K takovému průběhu dochází většinou u osob s imunodeficitem. (3)

### **1.4.2.2 Neurotoxoplasmóza**

U nemocných generalizovanou toxoplasmózou můžeme pozorovat symptomy poškození CNS prokazatelné nálezem encefalitických změn. Může se projevovat jako izolovaná meningitida, meningoencefalitida a encefalitida. (1)

Toxoplasmová encefalitida se objevuje nejčastěji u imunodeficitních osob a u pacientů s HIV představuje nejčastější příčinu poškození CNS. Většinou se jedná o reaktivaci latentní formy infekce. Onemocnění se projevuje postupně a pomalu. Nejprve se projeví horečka, bolest hlavy, nauzea, poté nastoupí křeče, poruchy hybnosti, mentální poruchy a projevují se ložiskové neurologické příznaky s obrnami mozkových nervů. (5)

### **1.4.2.3 Získaná oční toxoplasmóza**

Oční forma probíhá při akutní nebo recidivující infekci. Projevuje se zhoršením zraku nebo výpadky zorného pole. (3) Na počátku onemocnění dochází k obrnám okohybných svalů. Při exogenní infekci nebo jako následek celkového onemocnění vzniká konjunktivitida. (1) Manifestuje se jako nitrooční zánětlivé onemocnění, nejčastěji jako zadní ložisková uveitida (7 – 15 % uveitid je způsobeno toxoplasmovou infekcí). To vede k fotofobii. Charakteristický obraz představuje ložisková chorioretinitida, která výjimečně může vést ke vzniku sekundárního odchlípení sítnice. Lokalizuje se nejčastěji v oblasti žluté skvrny, popřípadě v okolí větších cév. Oční forma toxoplasmózy má sklon k častým recidivám a tvorbě atrofické, pigmentované jizvy při hojení. V časně fázi infekce může být jediným příznakem získané oční toxoplasmózy retinální vaskulitida a přidružená zánětlivá reakce. (5)

### **1.4.2.4 Exantémická (septikemická) forma**

Počátek onemocnění se projevuje nauseou, bolestmi svalů a kloubů, postupně se objevuje makulopapulózní exantém. Při rozvinuté infekci je postiženo více orgánů současně, s doprovodem horečnatých stavů. Exantémická forma se vyskytuje vzácně ale její průběh bývá často maligní. (1)

## **1.4.3 Vliv na psychiku hostitele**

Pravděpodobně původním smyslem této schopnosti parazita ovlivňovat chování je snaha přenést toxoplasmu z mezihostitele (často hlodavci) do definitivního hostitele, jímž je nejčastěji kočka. Tento přenos je možný pouze prostřednictvím predace a tak je manipulační aktivita parazita na hostitele přikládána zvýšení pravděpodobnosti ulovení mezihostitele šelmou.

I když člověk není přirozenou potravou šelem, je jeho manipulace parazitem neproduktivní, avšak způsobuje určité projevy tohoto působení. *Toxoplasma gondii* je

schopna indukovat specifické změny chování svého mezipřenosce. Nedávné výsledky srovnávacích studií ukázaly, že některé psychologické faktory infikovaných osob s latentní toxoplasmózou vykazují změny oproti nenakažené populaci. Rozdíly v projevu lze najít i mezi pohlavím. Například muži pozitivní na infekci méně ochotně respektují sociální pravidla a normy, zato jsou více podezřívaví a žárlivější. Ženy jsou více otevřené a bezstarostné. (25,26)

## 1.5 Terapie

V současnosti jsou léky dostupné na českém trhu zaměřeny na léčbu akutní fáze infekce. Při přechodu do latentní fáze ztrácí léky své účinky, proto je důležité zahájit případnou terapii co nejdříve. (16)

Je nutné zvážit zda je u konkrétního pacienta terapie nutná, jaká chemoterapeutika nasadit a určit jejich dávkování. Při plánování terapie musíme brát v úvahu stav imunity, pohlaví a věk. (3) Prokázaná akutní toxoplasmová infekce u gravidních žen, při kongenitální toxoplasmóze novorozenců a kojenců, oční formě (toxoplasmové chorioretinitidě) a u imunodeficitních pacientů je indikací k terapii. Naopak terapie není nezbytná u imunokompetentních osob. Zvážit by se měla léčba u žen plánujících těhotenství. Například neléčená nebo špatně léčená mozková toxoplasmová infekce je vždy smrtelná (3,16,19)

Účinné je perorální podávání pyrimethaminu v kombinaci se sulfadiazinem a spiramycin. Popřípadě je možná náhrada jinými antibiotiky či chemoterapeutiky. (5,9)

Spiramycin je makrolidové antibiotikum a užívá se u uzlinových forem toxoplasmózy či u zajišťovací terapie těhotných žen, u kterých nebyla prokázána infekce plodu. (3,9)

Sulfazidin je antimikrobiální chemoterapeutikum. Je to zlatý standard v kombinační terapii toxoplasmózy, při léčbě mozkové a oční formy toxoplasmózy, u suspektní infekce plodu a jako sekundární profylaxe. Přesto není v ČR běžně dostupný..

Pyrimethamin je inhibitor dehydrofolátreduktázy a v dnešní době nejúčinnějším dostupným antimalarikem, který dobře proniká do CNS. Je vhodný jak pro udržovací, tak pro útočnou léčbu. Naopak nevýhodou je jeho myelotoxicita, kterou je nutné mírnit. K tomu je zapotřebí současné podávání Acidum folinicum, což je derivát kyseliny listové, který je schopen zrušit blokádu dihydrofolátreduktázy.

Jako alternativa například u alergických pacientů se může použít klindamycin, azitromycin, klaritromycin, atovaquon, dapson, rifabutin, doxycyklin nebo 5-fluorouracil. (3,19) Klindamycin se doporučuje užívat u oční formy infekce. (5)

## 1.6 Laboratorní diagnostika

Laboratorní diagnostika využívá dvou základních metod průkazu toxoplasmózy, a to buď přímým nebo nepřímým průkazem. (1,13, 26)

Účelem diagnostiky je zjistit, zda je pacient infikován, popřípadě v jaké fázi infekce se nachází. Je nutné zvážit do jaké kategorie vyšetřovaná osoba patří a popřípadě zvolit optimální diagnostickou metodu. U imunokompetentních osob s podezřením na toxoplasmózu postačují metody méně citlivé. Naopak u novorozenců, kteří nemají plně rozvinutou tvorbu protilátek nebo u imunodeficitních pacientů, kde je produkce protilátek omezena na minimum, je nutné zvolit vysoce citlivé metody.

V současné době mají velké zastoupení v diagnostice toxoplasmózy metody enzymatické imunoanalýzy a jejich modifikace (ELISA, ELISA capture), metody proteinové analýzy (Western blot) a molekulárně-biologické metody (PCR, real-time PCR).

Rutinní diagnostika v České republice je založena především na sérologických metodách, protože přímý průkaz parazita je obtížný. Nejčastěji se využívá kombinace základních vyšetření metodou komplement fixační reakce, popřípadě nepřímé imunofluorescence pro detekci celkových antitoxoplasmatických protilátek a doplňujících imunoenzymatických metod a jejich modifikací pro stanovení jednotlivých tříd imunoglobulinů.

Laboratoř, kde k diagnostika proběhne, by měla ošetřujícímu lékaři zaslat nejen naměřené hodnoty ale i interpretaci výsledků. (23,24,27,28)

K určení diagnózy napomáhají i fyzikální diagnostické metody jako je monografie, magnetická rezonance, počítačová tomografie, oftalmologické a neurologické vyšetření.  
(2)

## 1.6.1 Přímé metody

Tyto metody se zakládají na detekci samotného infekčního agens v biologickém materiálu. Nález parazita přímými metodami můžeme provést mikroskopicky, jeho izolací nebo detekcí typických parazitárních složek (průkaz nukleových kyselin).

Přímý průkaz parazita lze provést pouze výjimečně, protože materiál ke zpracování se získává se značnými komplikacemi. (24,26)

### 1.6.1.1 Mikroskopie

Mikroskopický průkaz je považován za spolehlivou, rychlou a levnou metodu ale s nízkou citlivostí. Nevýhodou je obtížný chirurgický odběr materiálu (většinou biopsií). Proto se histologické vyšetření využívá spíše pro postmortální diagnostiku. (13,19,26)

Prvoka lze nalézt převážně ve vnitřních orgánech (mozek, mícha, játra, slezina, mízní uzliny, kosterní svalstvo, myokard, střevní stěna). Krev, sputum, stolice, moč a jiné tělní sekrety nemají prakticky žádný význam pro mikroskopické vyšetření. (1)

Histologické preparáty se zhotovují podle druhu materiálu nátěrem, otiskem nebo přenesením řezu části orgánu na podložní sklíčko. (1) Prokázat lze parazita barvením podle Giemsy, hematoxilinem-eosinem nebo imunoperoxidázovým barvením. (5)

Průkaz parazita tímto způsobem lze považovat za správný pouze v případě pozitivního nálezu typických tkáňových cyst. Naděje na záchyt ale není příliš vysoká. Snadno lze zaměnit nález za degenerované buňky hostitele, kvasinkovité organismy nebo jiné prvoky (sarkosporidie). (1)



### **1.6.1.2 Izolační pokus**

Izolace *Toxoplasma gondii* na laboratorních myších je metoda vysoce citlivá. Průkaz na zvířeti se využívá stále méně a za předpokladu, že nelze použít jiných vhodných médiích, nebo je jiná alternativa izolace méně citlivá. (26)

Za normálních podmínek nelze toxoplasmy pěstovat na umělých médiích, je potřeba použít laboratorní hlodavce (běžně albinotické myši), kuřecí embrya či tkáňové kultury. K vyšetření se využívá biologický materiál odebraný za sterilních podmínek. Nesmí se zmrazit, při případném transportu se uchovává při 4°C. Tkáň se homogenizuje v isotonickém solném roztoku a suspenze se vstříkne do břišní dutiny myši. (5) Cílem této metody je pomnožit parazita do takové míry, aby byl prokazatelný mikroskopickou technikou z peritoneálního exsudátu nebo otisků orgánů. (1)

Nevýhodou je časová náročnost, výsledek je dostupný za 2 – 3 týdny. Tato metoda přímého průkazu je postupně vytlačována modernějšími technikami jako je průkaz nukleových kyselin. V ČR se tato metoda provádí v NRL pro toxoplasmózu SZÚ Praha. (10,19,26)

### **1.6.1.3 Molekulárně-genetické metody**

V posledních letech se do popředí dostávají metody molekulární biologie zaměřené na přímý důkaz nukleové kyseliny parazita v biologickém materiálu. Tyto metody jsou vysoce specifické i senzitivní a poskytují rychlý výsledek. Jako biologický materiál na tyto testy se používá sérum, plazma, mozková tkáň či likvor, oční tekutina, plodová voda (2,3).

Zatím nejlépe zavedenou metodou využívající amplifikace hledané DNA je PCR neboli polymerázová řetězová reakce. Je založena na opakování tří cyklů spojených se změnou teploty. Všechny reakce probíhají v jedné zkumavce.

Nejprve dojde k denaturaci dvošroubovice DNA na dvě izolovaná vlákna. Po snížení teploty se připojí ke každému vlákně dva syntetické primery vymezující určitý hledaný úsek DNA. Poslední změnou teploty se primery prodlužují a na každém vlákně

vzniká kopie hledané sekvence. Vzniklé amplikony slouží jako matrice k dalšímu tvoření kopií, které se cyklicky opakuje přibližně třicetkrát. Výsledkem je, že z jedné molekuly DNA vznikne přibližně  $10^9$  kopií. Amplifikovaná DNA se poté prokazuje například elektroforeticky. (26)

V diagnosticky obtížných případech s izolovanou extraneurální manifestací je tato metoda optimální. V současnosti tuto metodu provádí Ústav klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové (PharmDr. L. Plíšková). (19)

### **1.6.2 Nepřímé metody**

Zakládají se na průkazu specifických stop, zanechaných v organismu infekčním agens. (26) V posledních letech se využívá široká škála metod založených především na detekci protilátek. Tyto testy se liší v míře citlivosti, specifiky a prediktivní hodnoty (8). Základním principem sérologických metod je reakce antigenu (cizorodá struktura vyvolávající imunitní odpověď) a protilátky. (29)

Sérologickou diagnostiku toxoplasmózy poprvé použili Sabin a Feldman pomocí neutralizačního testu na průkaz protilátek, který se nazývá Sabin-Feldmanův test. Dále byly vyvinuty další testy jako intradermální test, imunofluorescenční test, komplement fixační reakce, nepřímá hemaglutinace, mikroprecipitace (MPA) nebo aglutinační reakce.

Tato diagnostika se postupně vyvíjela od náročných a složitých postupů směrem k rychlé a plně automatizované diagnostice. (2) Mezi dostupnými diagnostickými testy je sérologie běžně používaná. I když dosahuje vyhovujících výsledků, tak výroba spolehlivých činidel zůstává pracná a nákladná. V současné době je detekce specifických protilátek založena na reakci s toxoplasmovými antigeny, které jsou hromadně vyrobeny buď z peritoneální tekutiny infikovaných myši nebo z tkáňových kultur. (14)

K určení diagnózy obvykle nestačí pouhý průkaz protilátek, ani stanovení jejich množství. Zásadní je určit fázi infekce, proto je potřeba dokázat zda se hodnoty jednotlivých tříd imunoglobulinů (popřípadě titrů celkových protilátek) zvyšují, snižují či mají stabilní hodnoty. V určitých případech může být rozhodující avidita IgG. (24)

Metody stanovení nejsou vždy ideální, proto je v rutinní diagnostice potřeba tyto metody různě kombinovat, aby vzájemně vykompenzovaly své nedostatky. Nutné je i vzít ohled na individuální odchylky pacientů a v případě potřeby opakovat stanovení za 2-3 týdny. (3,24)

V ČR se nejčastěji používá kombinace metod, které se opírají o průkaz specifických protilátek. Je to komplement fixační reakce a ELISA. (5,9,23,28)

### **1.6.2.1 Sabinova-Feldmanova reakce**

Tento test, nazývaný též dye test se v současné době využívá jen ve specializovaných laboratořích. Jelikož je poměrně složitá a nákladná, slouží v současné době pouze jako referenční metoda. (5)

Ke směsi parazitů s inaktivovaným vyšetřovaným sérem se přidá barvivo. Vlivem protilátek dochází ke změně tvaru a barvitelnosti cytoplasmu parazitů. K vizualizaci tohoto jevu se používá barvení preparátu alkalickou methylenovou modří a hodnotí se mikroskopicky. (1)

### **1.6.2.2 Imunofluorescenční test**

Vysoce specifická metoda založená na průkazu protilátek za pomoci značené protilátky fluoresceinem tzv. konjugátu. (29)

Imunofluorescence je reakce při níž je jedna ze složek chemicky označena fluorescenčním barvivem a jejíž výsledek se odečítá pod fluorescenčním mikroskopem. V tomto případě se jedná o modifikaci nepřímé imunofluorescence, která má schopnost prokázat protilátkovou aktivitu jednotlivých tříd imunoglobulinů.

Nevýhodou je zdlouhavé odečítání, nemožnost automatizace a subjektivní hodnocení fluorescence. (26)

### **1.6.2.3 Western blot**

Tato metoda zpřesňuje diagnostiku kongenitální toxoplasmózy. Pomocí této metody lze zjistit zda protilátky v séru patří novorozenci nebo jsou přenesené přes placentu ale patříci matce. Ke stanovení se jako biologický materiál využívají párová séra matka/plod nebo matka/novorozenec.(?)

Jedná se o rozdělení antigenního preparátu na několik složek. Preparát se rozštěpí detergentem (DSD, dodecylsulfát sodný) na jednotlivé glykopeptidy a polypeptidy. Pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu se poté tyto frakce rozdělí. Vzniknou polypeptidové pruhy, které se přenesou na nitrocelulosovou membránu. Ta se rozstříhá na úzké pásy napříč separovaným pruhům a na nich probíhá reakce, která se musí vizualizovat. Tam kde došlo k vazbě antigenu s protilátkou vzniknou barevné proužky. Nález nových epitopů potvrzuje pozitivitu (26)

### **1.6.2.4 Avidita**

Avidita slouží k určení fáze infekce. V počátcích onemocnění se protilátky váží méně pevně k antigenu a v průběhu onemocnění avidita postupně narůstá. Stanoví se například pomocí modifikované metody ELISA. Zjišťuje se do jaké míry je činidlo denaturující proteiny schopno narušit vazbu mezi antigenem a protilátkou. Za diagnostickými účely se zjišťuje avidita specifických protilátek především u izotopu IgG. (29)

## 2. Cíle práce

Stanovila jsem tyto cíle mé bakalářské práce

- Detekovat přítomnost protilátek proti *Toxoplasma gondii*
- Zhodnotit používané sérologické metody
- Porovnat prevalenci protilátek v séru pacientů
- Zhodnotit výskyt onemocnění v Plzeňském kraji

### **3. Metodika**

#### **3.1 Biologický materiál**

Vzorky pacientů s podezřením na toxoplasmózu mi byly poskytnuty ve Fakultní nemocnici Plzeň na oddělení sérologie a parazitologie. Celkem bylo vyšetřeno 69 pacientů v průběhu měsíce srpna roku 2012.

Ke stanovení protilátek byla odebrána srážlivá krev z loketní žíly do zkumavky s krastenem, který zabraňuje uvolňování srážecích faktorů. S materiálem se musí vždy zacházet jako s potencionálně infekčním a dodržovat při zacházení s ním preventivní hygienická opatření. Samozřejmostí je použití jednorázových rukavic a desinfekčních prostředků při odběru.

#### **3.2 Komplement fixační reakce (KFR)**

KFR je základním kvalitativním testem pro stanovení celkových antitoxoplasmických protilátek všech imunoglobulinových tříd ze séra. Umožní určit, zda je či není vyšetřovaná osoba infikována prvokem *Toxoplasma gondii*.

Je i spolehlivým semikvantitativním testem. Ze zjištěného titru protilátek lze usuzovat na fázi infekce. Ideální je sledovat dynamiku tvorby protilátek pro kvalitní stanovení diagnózy. Předpokladem je vyšetření dvou vzorků sér (párových sér) jednoho pacienta. První vzorek je odebrán v počáteční fázi onemocnění, druhý vzorek v době, kdy se předpokládá vytvoření detekovatelné hladiny protilátek (10-15 dnů od prvního odběru). I dynamika titru u pacientů s vyššími hladinami antitoxoplasmických protilátek je důležitá pro posouzení fáze infekce. Signifikantní vzestup titrů (alespoň o 2 ředění) signalizuje akutní toxoplasmózu. Mírný pokles nebo stálá hladina svědčí pro pozdější fázi infekce.

Výhody této metody jsou stabilita výsledků, nízká cena a možnost eliminace případných nespecificky pozitivních nálezů získaných ELISA testem. KFR patří mezi

nejrozšířenější a velmi citlivé sérologické reakce. Detekční limit je 0,1 µg protilátky. V ČR je tato metoda prověřena dlouholetým užíváním. Obecně se doporučuje spíše citlivější chladová modifikace KFR, než alternativní teplá modifikace. (9,24, 30)

### **3.2.1 Princip metody**

KFR je reakce založena na vazbě (fixaci) komplementu v reakční směsi na specifické komplexy antigenu s protilátkou. Testem jsou prokazovány protilátky všech imunoglobulinových tříd. (13, 30)

. Na vytvořený imunokomplex se naváže komplement (morčecí sérum), který se vizuálně ozřejmí přidáním indikátorového neboli hemolytického systému (beraní erythrocyty senzibilizované protilátkou). Při pozitivním nálezu dojde k navázání komplementu na imunokomplex, hemolytický systém zůstane volný a výsledná podoba erythrocytů zůstane bez změny (tzv. zábrana hemolýzy). Pokud je průkaz negativní, volný indikátorový systém se naváže na krvinky a dojde k jejich hemolýze. (26)

Celou reakci lze opticky pozorovat jelikož dojde díky hemolýze beraních erythrocytů k vizualizaci. (13)

### **3.2.2 Laboratorní vybavení**

- skleněné zkumavky
- Mikrotitrační destička
- Mikropipety
- osmikanálová automatická mikropipeta (o objemu 25-50µl)
- stolní centrifuga
- vlhčený termostat 37°C na inkubaci destiček
- chladnička (2 – 8°C) s vlhkou komůrkou
- vodní lázeň 56°C
- sérologická třepačka pro mikrotitrační destičky
- zvětšovací sklo Dynatech

### 3.2.3 Reagencie a příprava roztoků

Pro tuto reakci se využívá komerčně dodávaných souprav od firmy TestLine. Každá tato souprava obsahuje několik komerčně připravených reagentů. Beraní krvinky je nutné si připravit v laboratoři zvlášť, protože nejsou součástí testů. Lyofilizované komponenty je nutné rekonstituovat, jiné reagencie se musí ředit či smíchat.

**Veronalový pufr (Barbitalový)** slouží k ředění roztoků a sér. Dodává se 5x koncentrovaný, tudíž je nutné ho naředit 1 + 4 díly destilovanou vodou.

**Antigen KFR** je purifikovaný lyofilizovaný extrakt z prvoků *Toxoplasma gondii*, který neobsahuje živé parazity. Je vyráběn pomocí tween-etherové extrakce toxoplasem z peritoneálního exsudátu bílých laboratorních myši 3. den po inokulaci. (9,26) Lyofilizát antigenu je nutné nejprve rekonstituovat podle použitého balení (1,0; 0,5 nebo 0,2 ml) destilovanou vodou a poté naředit barbitalovým pufrem na pracovní ředění podle údaje na štítku lahvičky antigenu.

**Komplement** je lyofilizovaný aktivní morčecí komplement. Před použitím se musí rekonstituovat v ředícím roztoku komplementu dodávaném v setu. Poté se nařadí barbitalovým pufrem dle návodu na lahvičce.

**Hemolytický amboceptor (hemolyzín)** je inaktivované lyofilizované králičí sérum s obsahem protilátek proti beraním erytrocytům. Amboceptor se rekonstruuje destilovanou vodou a přidá se do lahvičky „Zásobní roztok amboceptoru“ a tím se předředí roztok 1:100. Následně se doředí na pracovní ředění barbitalovým pufrem.

**Beraní erytrocyty konzervované v Aalseverově roztoku** se musí před použitím 3x promýt v barbitalovém pufru, centrifugovat při 2500 otáčkách, 6 minut. Vytvoříme z nich 3% suspenzi smícháním 1 ml beraních erytrocytů a 33,3 ml veronalového pufru.

**Hemolytický systém** se připraví smícháním stejných objemů amboceptoru a 3% suspenze krvinek. Poté se senzibilizují při 37°C 30 minut ve vodní lázni.

**Negativní sérum** je lidské sérum neobsahující protilátky proti *Toxoplasma gondii*

**Pozitivní sérum** je lidské sérum obsahující protilátky proti *Toxoplasma gondii*



### 3.2.4 Kontroly

Při každém provedení zařazujeme do reakce negativní sérum a pozitivní sérum o známém titru. Provádíme také kontrolu antigenu, komplementu a hemolytického systému a to u každé na dvou jamkách. Ředí se přímo v jamkách mikrotitračních destiček a množství je uvedeno pro jednu jamku.

- **Kontrola komplementu:**  
Napipetuje se 50  $\mu$ l veronalového pufru + 50  $\mu$ l komplementu (antigen nahrazen barbitalovým pufrem)
- **Kontrola antikomplementarity séra:**  
provádí se u každého séra na první jamce (ředění 1:2) 25  $\mu$ l veronalového pufru + 25  $\mu$ l vyšetřovaného (kontrolního) séra + 50  $\mu$ l komplementu
- **Kontrola antigenu:**  
25  $\mu$ l veronalového pufru + 25  $\mu$ l antigenu + 50  $\mu$ l komplementu (zředěný vzorek nahrazen barbitalovým pufrem)
- **Kontrola pozitivního séra: tzv. negativní kontrola (NK)**  
Toxoplasma pozitivní sérum o známém titru se naředí veronalovým pufrem geometrickou řadou 1:8 až 1:2048. Jednotlivá ředění se nakapou po 0,025 ml do jamek plastových destiček. Přidá se 0,025 ml antigenu + 50  $\mu$ l komplementu
- **Kontrola negativního séra: tzv. pozitivní kontrola (PK)**  
0,025 ml Toxoplasma negativního séra ředěného 1:8 + 0,025 ml antigenu + 0,050 ml komplementu
- **Kontrola hemolytického systému: (HS)**  
100  $\mu$ l veronalového pufru (antigen i komplement nahrazen barbitalovým pufrem)

### 3.2.5 Pracovní postup

1. Séra pacientů se rozmrazí a inaktivují se při + 56°C 30 minut
2. Potřebné reagenty se rekonstituují a naředí dle potřeby
3. Mikrotitrační destička položená naležato se popíše hodnotami titrů (1:4 – 1:4096), čísla vzorků (pro každého pacienta je vyhrazena jedna řada) a označíme jamky pro kontroly (zpracujeme dle postupu)
4. Napipetuje se kalibrovanou mikropipetou do všech jamek mikrotitrační destičky 25 µl veronalového pufru
5. Do první jamky se pipetuje 25 µl séra jednoho pacienta
6. Pomocí osmikanálové pipety se séra rozředí přenesením 50 µl obsahu jedné jamky do té následující a pokaždé dobře promícháme opětovným nasátím obsahu jamky pipetou
7. Od třetí jamky se pipetuje 25 µl antigenu
8. Do druhého sloupce destičky se přidá 25 µl veronalového pufru
9. Do všech jamek kromě prvního sloupce se napipetuje 50 µl komplementu
10. Na 30 sekund se destička nechá protřepat na třepačce
11. Vloží se do vlhké komůrky do lednice do druhého dne
12. Připraví se hemolytický systém a pipetuje se ho 25 µl od druhé jamky
13. Na 30 sekund se destička nechá protřepat na třepačce
14. Vloží se do termostatu při teplotě 37°C na 30 minut
15. Pokud krvinky nesesedimentovaly, opakuje se inkubace dalších 30 minut, pokud se usadily, zastaví se reakce vložením destičky do vlhké komůrky v lednici na 2 hodiny
16. Výsledná reakce se odečítá pod zvětšovací sklem

### 3.2.6 Hodnocení

Výsledky testu jsou validní, jestliže kontrolní NK je negativní, kontrolní PK je pozitivní, výsledný titr kontrolní PK se shoduje se stanoveným titrem (toleruje se maximálně o 1 ředění vyšší nebo nižší), kontroly antigenu jsou hodnoceny jako negativní, kontroly komplementu jsou hodnoceny jako negativní a kontroly HS jsou hodnoceny jako pozitivní. Zjištěný titr vzorku je validní, pokud příslušná kontrola antikomplementarity byla hodnocena jako negativní.

Po proběhnutí reakce hodnotíme hemolýzu či sedimentaci beraních erytrocytů v jamkách s ředěnými vzorky. Pokud beraní erytrocyty nezlyzovaly, ale sedimentovaly na dno jamky považuje se reakce za pozitivní. Ve vzorku jsou v příslušném ředění přítomny protilátky proti *Toxoplasma gondii* v detekovatelné hladině. Pokud má celý obsah jamky rovnoměrně červenavou barvu, považuje se reakce za negativní. Protilátky proti *T. gondii* nejsou v příslušně ředěném vzorku přítomny nebo jejich koncentrace je pod detekčním limitem testu. Jako titr protilátek proti *Toxoplasma gondii* se uvádí nejvyšší ředění vzorku, při kterém je KFR pozitivní.

### 3.3 ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay neboli enzymová imunoanalýza na pevné fázi je heterogenní imunoanalytická metoda s vysokou citlivostí. Umožňuje stanovení velmi nízkých koncentrací antigenů nebo protilátek. Jde o velmi přesnou kvantitativní metodu. Například detekční limit pro IgG je 0,5 UI/ml (mezinárodních jednotek). Pro důkaz jednotlivých tříd imunoglobulinů je nejspolehlivější metodou nekompetitivní přímá ELISA pro stanovení IgG a double-sandwich (capture) ELISA pro detekci IgM a IgA. (1,26,31,35)

Výhodou je častá automatizace metody, a tím možnost vyšetření velkého počtu vzorků.

Nevýhodou je poměrná nákladnost přístrojového vybavení, jeho udržování a vysoká cena většiny komerčně vyráběných souprav. Hodnoty naměřené automatickým

přístrojem nelze bezmyšlenkovitě interpretovat, je potřeba kvalifikovaného personálu aby posoudil jednotlivé výsledky v závislosti na klinickém stavu pacienta. (26)

### **3.3.1 Princip metody**

Antigen *Toxoplasma gondii* je imobilizován na stěny mikrotitrační destičky a po přidání ředěného séra se na něj vyšetřované protilátky naváží. V dalším kroku se v případě pozitivních vzorků na tyto imunokomplexy naváží protilátky s kovalentně vázaným enzymem neboli konjugátem, který je schopný vyvolat barevnou reakci. K vizualizaci dochází pomocí vhodného substrátu, který je enzymatickou reakcí převeden na barevný produkt. Intenzita zabarvení se měří spektrofotometricky.

Intenzita výsledného zabarvení je přímo úměrná koncentraci protilátek proti antigenům *Toxoplasma gondii*. (29)

### **3.3.2 DSX - automatický ELISA systém**

DSX od firmy DYNEX je plně automatický otevřený systém pro všechny diagnostické soupravy s použitím mikrotitračních destiček. Lze u něj naprogramovat jednotlivé kroky podle potřeby určitého stanovení v závislosti na požadavcích a doporučení jednotlivých druhů dodávaných diagnostických souprav. Součástí přístroje jsou čtyři inkubátory s možností nastavit na každém z nich jinou teplotu.

Za naprogramování jednotlivých testů, vlastní zadávání a spouštění testů odpovídá programové vybavení Relevation. Obsahuje Assay generator, který umožňuje samostatné zadávání testů pro jednotlivé vzorky přes Worklist. Po spuštění testu se aktuální stav stanovení zobrazuje na monitorovacím okně.

Jednoznačnou identifikaci vzorků zabezpečuje čtečka čárových kódů. Vzorek každého pacienta je označen unikátním kódem. Ve stojanech je možno umístit až 98 vzorků. Dále jsou určeny stojany pro reagentie, standardy, ředící roztoky a špičky. Kontaminaci vzorků je zabráněno použitím jednorázových špiček. Obsahuje nádoby na promývací roztoky a odpadní nádobu.

System automaticky převede vzorek ze zkumavky do mikrotitrační destičky a předředí ho, rozpipetuje kontroly, standardy a reagentie do potřebných jamek, vzorek inkubuje, promývá, měří a interpretuje výsledek.

Analyzátor informuje o chybě pokud dojde k selhání systému či zaznamená nedostatečné množství jakékoli reagentie. Automaticky probíhá i kontrola správnosti provedení testu (QC). System zaznamenává každou vykonanou operaci analyzátoru.



Obr.č.7: automatický analyzátor DSX od firmy DINEX

(Zdroj: <http://www.dynex.cz/System-DSX>)

Komponenty systému:

- Robotické rameno
- Reader - 1 x
- Inkubátory - 4 x
- Promývačka - 1 x
- Vzorky
- Nosič destiček
- Mikrodestičky
- Nádoby promývačky
- Odpad z promývačky
- Čtečka čárového kódu

### 3.3.3 Reagencie a příprava roztoků

Reagencie pro tuto reakci se používají komerčně dodávané od firmy EUROIMMUN. Dodávané mikrotitrační destičky potažené antigeny obsahují 12 oddělených proužků (stripů) a každý obsahuje 8 jednotlivých jamek. Reagencie jsou většinou připravené k použití, kromě koncentrovaného promývacího pufru, který je nutné naředit. Vzorky séra pro analýzu se ředí 1: 101 vzorkovým puftrem. Kalibrační a kontrolní séra jsou již naředěna.

Vždy před použitím se musí roztoky nechat vytemperovat na pokojovou teplotu a řádně promíchat.

- Kalibrační sérum 1, 2, 3
- Pozitivní kontrolní sérum (lidské IgG)
- Negativní sérum (lidské IgG)
- Enzymový konjugát jsou peroxidasou značené králičí protilátky proti lidským IgG
- Vzorkový pufr
- Promývací pufr je dodávaný 10 x koncentrovaný. Požadované množství pufru se čistou pipetou odebere ze zásobní lahve a zředí se 1 : 10 destilovanou vodou.
- Chromogen/substrátový roztok obsahuje tetrametylbenzidin a peroxid vodíku
- Zastavovacím roztokem je 1 N kyselina fosforečná

### 3.3.4 Pracovní postup

V laboratořích provádějících tuto metodu rutinně je metoda ELISA plně automatizována a tyto kroky provádí výše popsáný analyzátor. Tuto metodu je možné provést pomocí ručního pipetování, promývání a inkubace. V takovém případě je pracovní postup uveden níže.

1. 100  $\mu$ l kalibračního séra, pozitivní a negativní kontroly nebo ředěného vzorku séra se přenesou do jednotlivých mikrotitračních jamek

2. Nechá se inkubovat 30 minut při pokojové teplotě
3. Vyprázdní se jamky a následně promyje každou jamku třikrát pomocí 300  $\mu$ l naředěného promývacího pufru
4. Pufr se nechá v jamce působit alespoň třicet vteřin během každého promývacího cyklu a jamka se vyprázdní
5. Kapalina z jamek se řádně odstraní a vyklepe se promývací pufr poklepem desky dnem vzhůru na filtrační papír
6. Napipetuje se 100  $\mu$ l enzymového konjugátu do každé jamky
7. Inkubuje se po dobu 30 minut při pokojové teplotě
8. Opět se promývá každá jamka třikrát stejným způsobem
9. Napipetujte se 100  $\mu$ l roztoku substrátu do každé mikrotitrační jamky
10. Inkubuje se po dobu 15 minut při pokojové teplotě ve tmě
11. Napipetuje se 100  $\mu$ l zastavovacího roztoku do každé jamky v tom samém pořadí , jako byl kapán substrátový roztok
12. Před měřením je nutné mikrotitrační destičku pečlivě protřepat a homogenizovat její obsah
13. Fotometrické měření intenzity barvy by mělo být prováděno při vlnové délce 450 nm a referenční vlnové délce mezi 620 a 650 nm za 30 minut od přidání zastavovacího roztoku

### **3.3.5 Hodnocení**

Pro správnou interpretaci výsledků je nutná kalibrace, která se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách (IU). Využívá se tři kalibračních sér o známé koncentraci, ze kterých se stanoví lineární kalibrační křivka.

Hodnoty extinkce pro kalibrační séra a mezinárodní jednotky určené pro pozitivní a negativní kontrolu musí ležet v hranicích určených pro tyto hodnoty. Jestliže se nedosáhne hodnot určených pro kontrolní séra, mohl by test být nepřesný a proto se musí opakovat.

Horní hranice referenčního rozsahu u neinfikovaných osob (hodnota cut-off) je podle doporučení 10 mezinárodních jednotek na mililitr (IU/ml). Hodnoty vyšší, než je

tato hranice, se považují jako pozitivní, pod touto hranicí jako negativní. Jako vnitřní kontrola pro provedení testu slouží jak pozitivní, tak negativní kontrolní sérum. Tato séra musí být zařazena v každém prováděném testu. Pokud negativní sérum nevychází jako negativní a pozitivní sérum nejeví pozitivní hodnoty, nelze naměřené hodnoty interpretovat a stanovení se musí zopakovat.

Při kvalitativním nebo semikvantitativním vyhodnocení se hodnoty extinkce vzorků sér dosahujících hodnot 10 IU/ml považují za pozitivní. Séra s hodnotami pod touto hranicí se udávají jako negativní. Je možné i jemnější vyhodnocení výsledků (poměry  $> 1,0$  se považují jako pozitivní, poměry  $< 1,0$  jako negativní).

## **4. Výsledky**

### **4.1 Interpretace výsledků**

Správná interpretace výsledků by měla vycházet ze základního vyšetření a následně být ověřena doplňujícími testy. Průběh onemocnění se shoduje s dynamikou titru protilátek. (26)

#### **4.1.1 Akutní fáze**

Je charakteristická klinicky prokazatelným onemocněním a vyznačuje se vysokými titry sérových protilátek. Probíhá 1 – 3 měsíce po nákaze. (1) Inkubační doba trvá 1 – 3 týdny. U více než 95% případů probíhá inaparentně a posléze se manifestuje v latentní infekci. Symptomatický průběh není běžný a často není nákaza správně rozpoznána. (4)

Jako první po nákaze se objevují markery akutní fáze infekce imunoglobuliny IgM a vymizí do 9 měsíců. Není ale výjimkou, aby přetrvávali i několik let (v nízkých hladinách má tyto protilátky po 3 letech až 14% nemocných). Někdy mohou chybět úplně u imunokompromitovaných, u očních forem toxoplasmózy a u novorozenců s kongenitální infekcí.



Dalším ukazatelem akutní fáze infekce jsou imunoglobuliny IgA. Zpravidla vymizí dříve než IgM ale nemusí být vždy produkovány (až v 10% případů nejsou IgA detekovány v akutní fázi infekce). Stanovení této třídy imunoglobulinů je nezbytné ve sporných případech, kdy IgM neposkytuje jednoznačné informace (u gravidních žen se zvýšenou hladinou protilátek a u novorozenců).

Primární infekce je v akutní fázi charakteristická strmým vzestupem IgA a IgM, pomaleji stoupá hladina IgG, přičemž v úplném počátku infekce se nemusí IgG vůbec tvořit. Postupně se onemocnění dostává do tzv. odeznívající (chronické) fáze onemocnění, kdy jsou titry celkových protilátek stabilní nebo klesají. IgG se dlouhodobě udržují ve vysokých hladinách a hodnoty IgM a IgA postupně klesají k hranici citlivosti stanovení.

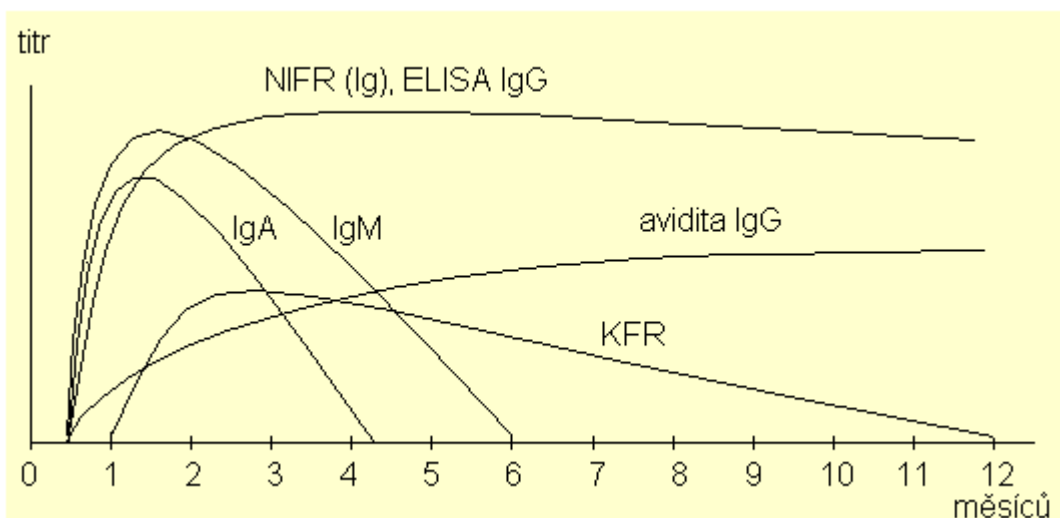
Možná je i reinfekce antigenně odlišným kmenem *Toxoplasma gondii*, při kterém bývá signifikantním znakem vzestup titrů protilátek.

#### **4.1.2 Latentní fáze**

Při této fázi dochází k asymptomatickému průběhu, kdy je infekce prokazatelná sérologickými testy ale v nižších titrech. (1) Probíhá 13 – 38 měsíců po nákaze. Je bez klinických příznaků a již nedochází k přenosu toxoplasmózy z matky na plod. Zůstává však stálá antigenní stimulace, to znamená, že jednotlivci s latentní toxoplasmózou mají obvykle celoživotní antitoxoplasmové protilátky. (19)

Pro latentní fázi infekce, kdy dochází k encystaci toxoplasem do tkání, je charakteristická nepřítomnost IgA a IgM a udržování pouze nízkých, popřípadě středních hladin IgG, které přetrvávají u nakažených osob po celý život.

Jelikož je záchyt toxoplasmózy obtížný a nedochází k němu včas, bývá 90 % záchytu toxoplasmových protilátek znakem latentní (ojediněle chronické) infekce. (23,24,28)

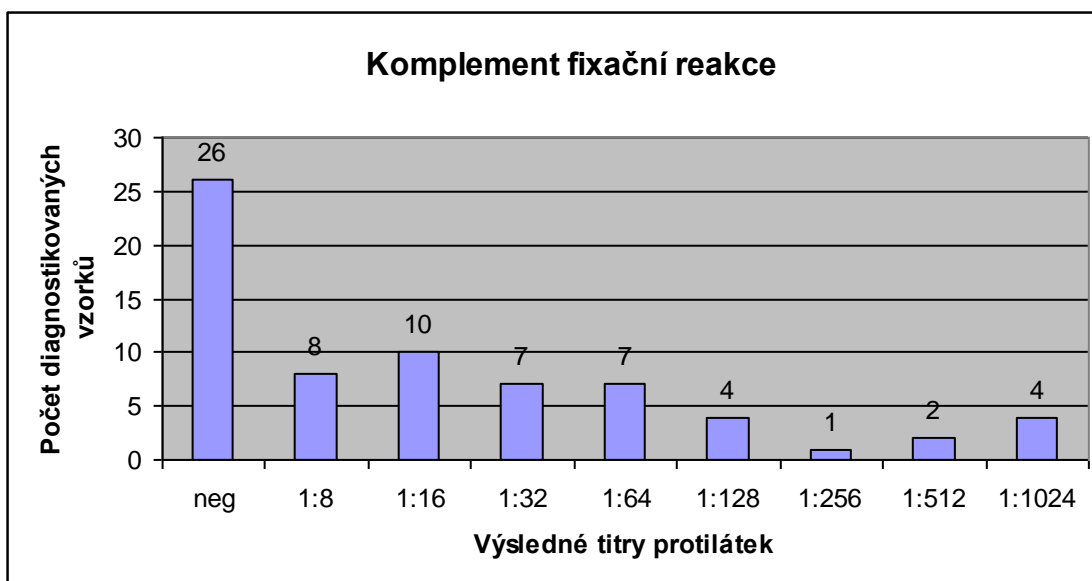


Obr.č.8: Dynamika tvorby protilátek  
(Zdroj: <http://www1.lfl.cuni.cz/~hroz/s/lymfal.htm>)

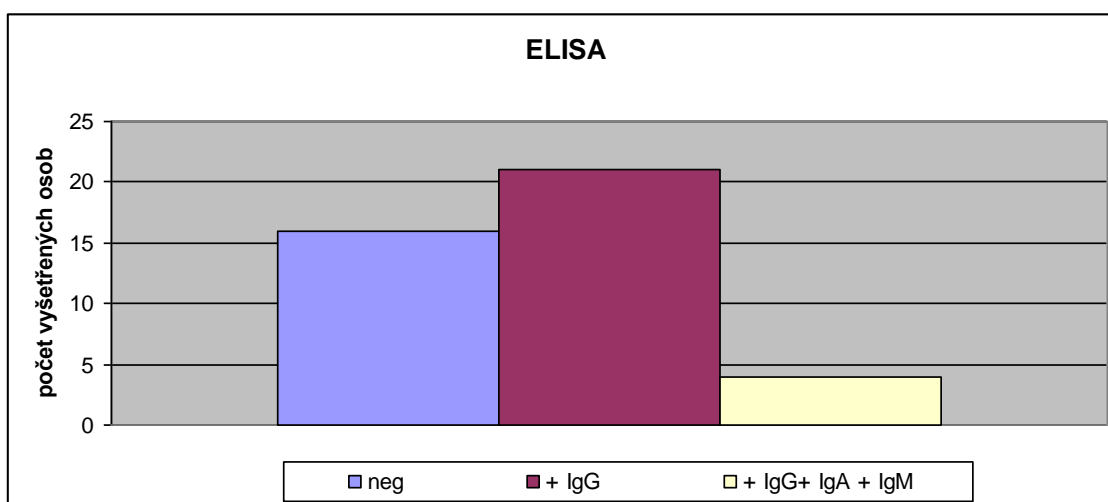
## 4.2 Vlastní výsledky

Ve vyšetřovaném souboru osob podezřelých na toxoplasmózu se vyskytovali muži, ženy i děti především z Plzeňského kraje a popřípadě krajů okolních. Vzoroký sér celkem 69 pacientů mi byly poskytnuty ve Fakultní nemocnici Plzeň během měsíce srpna roku 2012.

Všetchna séra byla vyšetřena nejprve komplement fixačním testem, kdy se vyloučila infekce (negativní výsledek) u 26 osob. U zbylých 43 pacientů byla prokázána pozitivní reakce na přítomnost protilátek. Po porovnání pozitivních výsledků i nízkých titerů s klinickým stavem pacienta či s hodnotami naměřenými v minulosti se indikovalo stanovení metodou ELISA u 41 vyšetřovaných osob.



Metodou ELISA bylo stanoveno 41 vzorků sér. Všechny stanovované třídy imunoglobulinů mělo negativních 16 pacientů. Pozitivní pouze třídu IgG mělo 21 osob. Pozitivita všech vyšetřovaných imunoglobulinových tříd (IgA, IgM a IgG) se detekovala celkem u 4 pacientů.



## 5. Diskuze

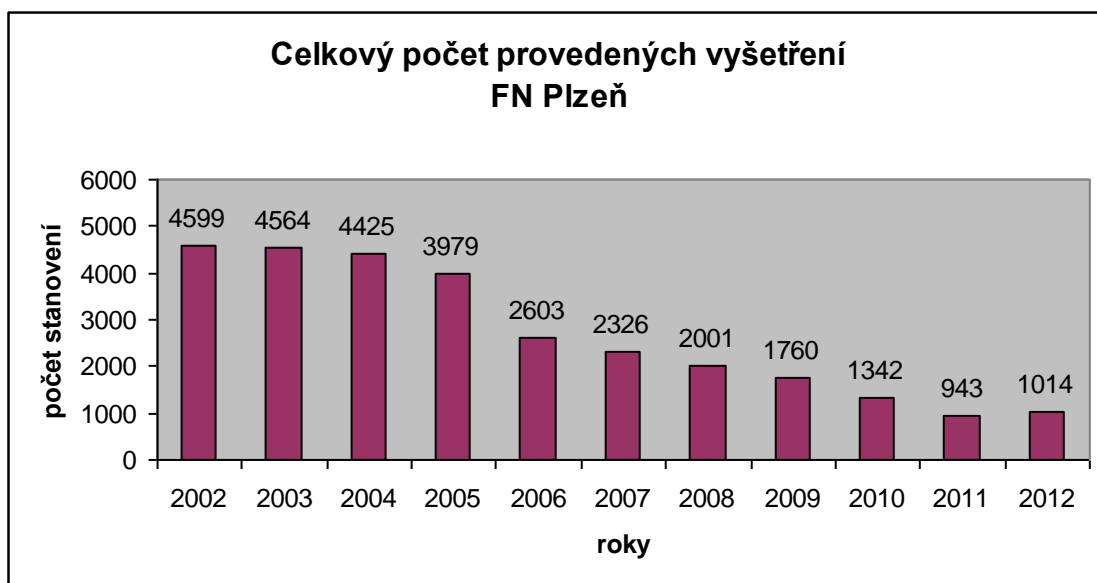
V interpretaci výsledků je nutné dbát na klinický stav vyšetřovaných osob. U imunokompetentních osob lze výsledky klasifikovat klasickým způsobem a lze usuzovat na fázi infekce podle daných pravidel. Takže negativní výsledek znamená, že pacient má sterilní imunitu proti *Toxoplasma gondii*.

Nízké titry KFR 1:8 – 1:16 jsou anamnestické. Znamená to, že pacient pravděpodobně prodělal infekci před několika lety. Pokud je titr vyšší je nutné stanovení jednotlivých tříd imunoglobulinů.

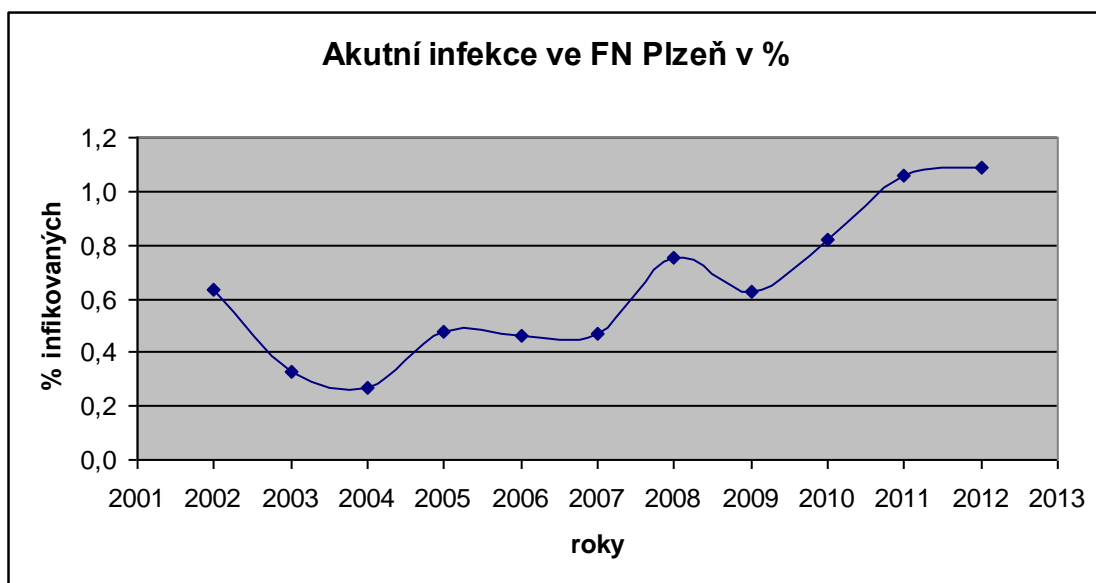
Při akutní infekci se nejčastěji detekují metodou ELISA vysoké hladiny protilátek IgG, IgM i IgA. Nepravděpodobné je, že se při akutní infekci stanoví protilátky IgA a IgM těsně nad hodnotou cut-off. Tyto dvě třídy imunoglobulinů mohou někdy přetrvávat déle jak rok v nízkých hodnotách. Oproti tomu se mohou v nízkých hladinách objevovat i při úplném počátku akutní infekce ale detekce v této fázi je málo pravděpodobná, jelikož jsou klinické projevy většinou slabé nebo vůbec žádné. Rozhodnout se mezi těmito dvěma variantami může napomoci stanovení avidity IgG nebo opakování stanovení za 2-3 týdny a posouzení vzestupu či sestupu titrů protilátek.

Stanoví-li se pouze IgG ve středních hodnotách, svědčí to o odeznívající infekci.

V posledních letech se detekce protilátek proti *Toxoplasma gondii* lineárně snižuje. V grafu jsou znázorněny počty všech vyšetření prováděných ve FN Plzeň za období 2002 až 2012



Jak je vidět na následujícím grafu, neznamená snižování počtu stanovení to, že se toxoplasmóza vyskytuje méně často. Při přepočtení na procentuelní detekci akutní toxoplasmózy lze usuzovat na to, že záchyt akutní infekce je úspěšnější. To je možné díky vyšší informovanosti o této problematice, požadavky na vyšetření jsou podávány cíleně s ohledem na rizikové skupiny a detekce probíhá za pomoci čím dál přesnějších laboratorních metod. Je možné i to, že dochází k častějšímu záchytu akutní infekce s omezením diagnostiky na cílové skupiny, a tím ke snížení počtu celkových stanovení.

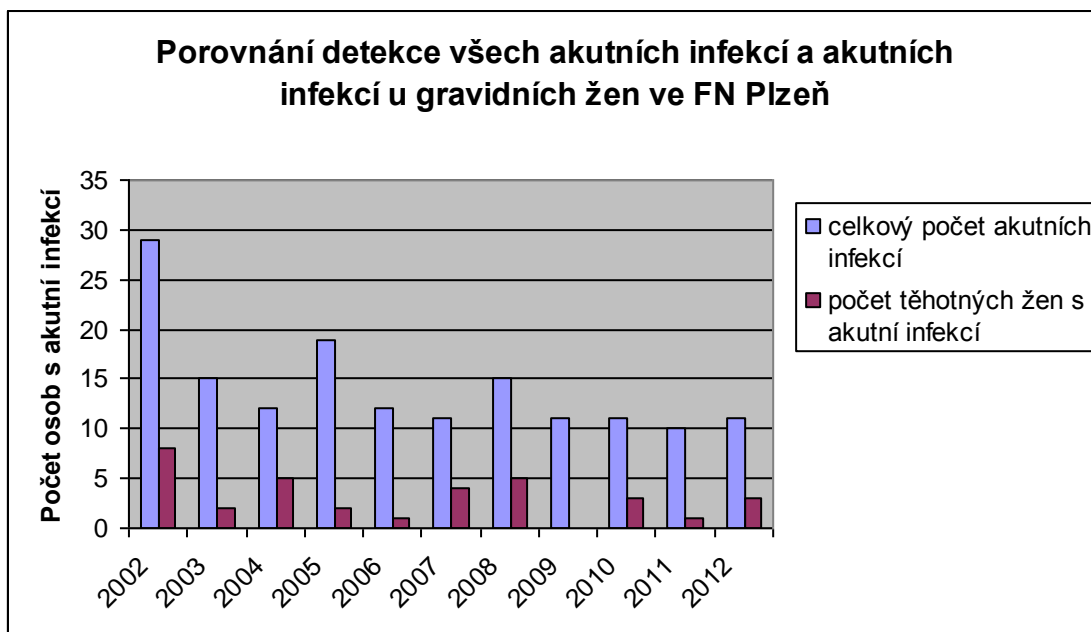


U gravidních žen hrozí průnik tachytoitů přes placentu a vyvolání kongenitální toxoplasmózy. Pro plod může být tato nákaza fatální, proto se v dnešní době dbá zvýšené pozornosti na screening protilátek u rizikových osob. V některých zemích je tato diagnostika zařazena mezi běžné preventivní vyšetření, jelikož poškození plodu lze zabránit včasnou detekcí a nasazením okamžité terapie.

Interpretace výsledků je zde podobná jako u imunokompetentních osob, s tím rozdílem, že se jedná o preventivní opatření s cílem zachytit případnou primoinfekci nebo ze sledování vyřadit ženy s latentní toxoplasmózou, jelikož ta není pro plod nebezpečná.

Pokud se u ženy nedetekují protilátky proti *Toxoplasma gondii* v prvním trimestru těhotenství, je zapotřebí aby žena dodržovala zvýšená hygienická opatření. Tímto nemůžeme vyloučit primoinfekci v dalším průběhu gravidity a je důležité stanovení po třech měsících opakovat.

Pokud dojde v průběhu gravidity k detekci pozitivních titrů KFR, může to znamenat akutní toxoplasmovou infekci. V takovém případě se stanoví IgM a IgA, které v případě vysokých hladin značí akutní toxoplasmózu a musí se bezpodmínečně zahájit terapie. Stanovení se opakuje za 2-3 týdny.



U novorozenců, kteří se narodili ženám s primoinfekcí v graviditě, se musí zjistit, zda byly kongenitální toxoplasmózou nakaženi a zda je zapotřebí zahájit terapii. Největší komplikací je to, že dítě nemusí mít ještě plně rozvinutou tvorbu protilátek. Hladiny protilátek bývají velmi nízké. Až u 50 % novorozenců není plně rozvinuta tvorba IgM. Přesnější je stanovení IgA, které ovšem také nejsou tvořeny u části novorozenců dětí, avšak lze je detekovat častěji než IgM. Podle sérologického stanovení protilátek IgG také nemůžeme potvrdit kongenitální toxoplasmózu, jelikož tato třída imunoglobulinů může být přenesena přes placentu.

Pro detekci kongenitální toxoplasmózy se do reakcí používá méně ředěného séra aby se zvýšila pravděpodobnost záchytu infekčního agens. Za pozitivní se považují i velmi nízké titry protilátek. Je nutné stanovení opakovat za 2-3 týdny a sledovat nejen novorozence ale i matku.

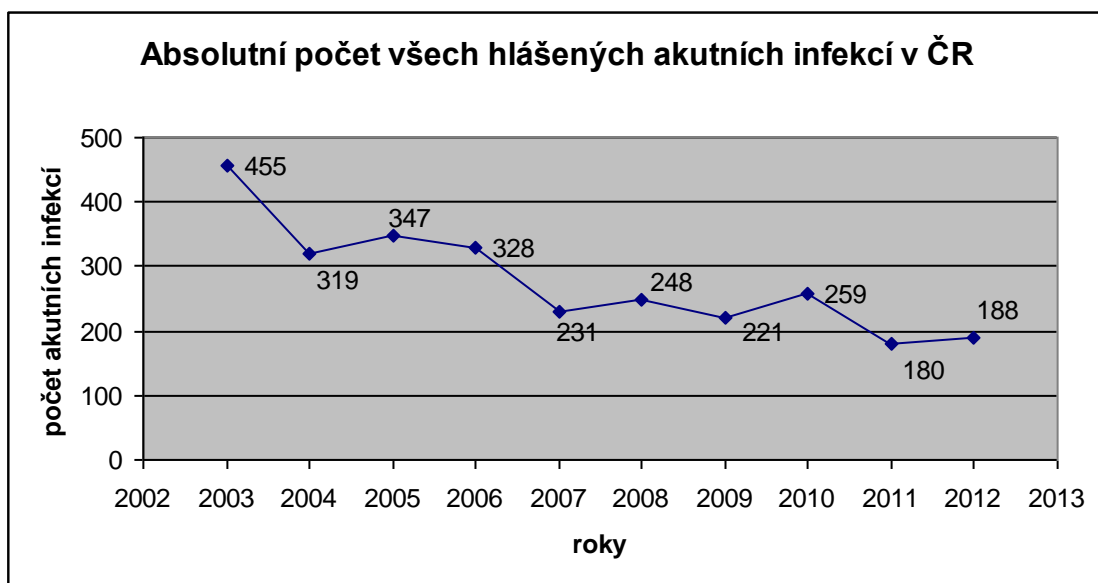
Také při oční toxoplasmóze nemívají vyšetřované protilátky vysoké hodnoty, jelikož oční forma nevyvolává silnou systémovou reakci. Jsou popisovány i případy, kdy při potvrzení této formy toxoplasmózy typickým oftalmologickým nálezem, byly výsledky sérologických testů negativní. Proto i v tomto případě se považují i nízké titry za pozitivní.

Další rizikovou skupinou jsou pacienti při transplantaci. Nebezpečná může být akutní infekce sérologicky negativního příjemce, který se nakazí při transplantaci orgánu obsahujícího tkáňové cysty od dárce s latentní infekcí. Proto je v tomto případě důležité stanovit i latentní toxoplasmovou infekci. Riziko reaktivace infekce sebou nese i imunosupresivní léčba zahájená již před transplantací.

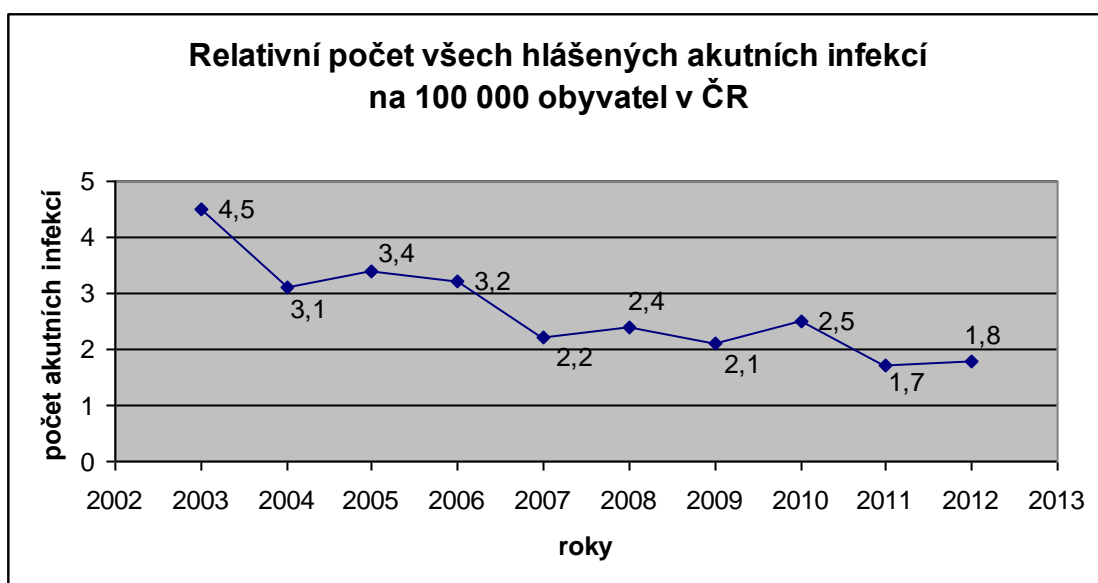
Poslední zvláštní skupinou jsou HIV pozitivní pacienti. Pokud nejsou chráněni chemoprophylaxí, jsou neustále ohroženi reaktivací latentní infekce. Správné posouzení výsledků může mít pro tyto imunodeficitní pacienty letální následek. Jelikož je jejich imunitní systém výrazně poškozen, dochází k nedostatečné tvorbě protilátek a tudíž je jejich detekce obtížná. Výsledky se nemusí vždy shodovat. Může se stát, že jedna metoda detekuje ve vzorku nízké titry protilátek a jiná nikoli. V takových případech se musí považovat za pozitivní nález i velmi nízké hodnoty.

Ve vztahu k těmto různým skupinám je důležité správně diagnostikovat akutní toxoplasmovou infekci. V posledních letech dochází k postupnému snižování výskytu akutních onemocnění. V ČR každá nově diagnostikovaná akutní toxoplasmóza podléhá hlášení. Tyto případy zaznamenává Národní referenční laboratoř pro toxoplasmózu. Podle těchto informací nahromaděných za několik předešlých let můžeme usuzovat na mírný pokles výskytu nově infikovaných osob s akutní infekcí. Dokazují to absolutní počty všech hlášených infekcí, podobně jako relativní hodnoty přepočítané na 100 000 obyvatel.





(Zdroj: NRL pro toxoplasmózu)



(Zdroj: NRL pro toxoplasmózu)

## 6. Závěr

Rutinní diagnostika toxoplasmózy založená na sérologických metodách je prověřena dlouholetou praxí. Automatizace systémů detekujících protilátky sebou nese spoustu výhod. Avšak je potřeba aby výsledky interpretoval zkušený odborník seznámený s touto problematikou a v žádném případě nevydával výsledky samotný analyzátor na základě naměřených hodnot.

Důvodem těchto tvrzení je různorodost skupin ohrožených toxoplasmózou. Infikované skupiny osob mají různé nároky na citlivost zvolené metody, na interpretaci výsledků a případnou terapii. U imunokompetentních osob zcela postačí méně citlivé metody. Naopak u oční formy toxoplasmózy, imunodeficitních pacientů nebo novorozenců s nedostatečně se sérologicky projevující akutní infekcí, je vhodnější použití citlivějších metod.

Vhodnou alternativou v laboratořích by mohlo být rutinní zavedení metody PCR k přímé detekci nukleové kyseliny pocházející z *Toxoplasma gondii*. Tento test má citlivost téměř 100 %. Avšak je to metoda značně nákladná a její uplatnění se teprve vyvíjí. Další možností jak diagnostiku upřesnit je stanovení protilátek metodou Western blot. Výhodou této metody je u kongenitální toxoplasmózy možnost odlišit protilátky IgG matky a novorozence.

Vyšetřování by mělo být postaveno na základních vyšetřovacích metodách, v tomto případě KFR a popřípadě doplněno imunoenzymatickým stanovením metodou ELISA. Při zvážení všech okolností týkajících se různorodosti rizikových skupin, jsou tyto metody vyhovující. Společně s výsledky testů by měla být ošetřujícímu lékaři zaslána i jejich interpretace a především předpokládaná fáze infekce.

## 7. Seznam použitých zdrojů

1. VOTAVA, M., et al. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2006. s. 390. ISBN 80-902896-2-2
2. JÍROVEC, O., *Parazitologie pro lékaře*. Praha: Avicenum, 1977.
3. STRHANSKY, J., et al. *Laboratory Diagnosis of Toxoplasmosis*. Epidemiologie Mikrobiologie Imunologie, 2009, č. 58: s. 51-62
4. HEJNAR, P., *Sérologická diagnostika chlamydiových infekcí a toxoplazmózy*. Interní medicína pro praxi. 2001, č. 7, s. 305-308. ISSN: 1212-7299
5. FLEGR, J., et al. *Rozdíly v osobnostním profilu biologů nakažených a nenakažených T. gondii*. Remedia - Klinická Mikrobiologie, 1999, č. 3(7): s. 268-273. ISSN 1211-7684
6. MACHALA, L., et al. *Doporučený postup diagnostiky a terapie toxoplazmózy u osob s HIV infekcí*. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 2007. č. 13(6): s. 248-252
7. PRÁŠIL, P., *Současné možnosti diagnostiky a terapie toxoplazmózy u HIV negativních pacientů*. Klinická mikrobiologie, 2009. č.15(3): s.83-90
8. MACHALA, L., et al. *Toxoplazmóza*. Interní medicína pro praxi, 2005. č. 7, 3, s. 120–122.
9. HEJNAR, P., *Specifika nepřímé diagnostiky toxoplazmózy a lymeské boreliózy udětí*. Pediatrie pro praxi. 2001. č. 2: s.112-115.
10. FLEGR J., *Interakce parazita s hostitelským organismem. Studium na modelu latentní toxoplazmosy u člověka*. 1999. Habilitační práce. 153 stran.
11. KODYM, P., et al. *Toxoplasmosis in the Czech Republic 1923–1999: First case to widespread outbreak*. International Journal for Parasitology, 2001. č. 31: s.125–132.

12. KODYM, P., et al. Prevalence and incidence of Toxoplasma infection in HIV-positive patients in the Czech republic. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2006. č.53: s.160–161.
13. ASHBURN, D., et al. Do IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of toxoplasma infection in pregnancy? *Journal of Clinical Pathology*, 1998. č. 51: s. 312–315
14. BOWIE, W.R., et al. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet*, 1997. č. 350: s.173–77
15. COZON, G.J.N., et al. Estimation of the Avidity of Immunoglobulin G for Routine Diagnosis of Chronic Toxoplasma gondii Infection in Pregnant Women. *European Journal of Clinical Microbiology*, 1998. č.17: s.32-36
16. KODYM, P., et al. *Evaluation of a commercial IgE ELISA in comparison with IgA and IgM ELISAs, IgG avidity assay and complement fixation for the diagnosis of acute toxoplasmosis.* *Clinical Microbiology and Infection*, 2007. č.13: s.40–47
17. LEBECH, M., et al. Feasibility of neonatal screening for toxoplasma infection in the absence of prenatal treatment. *Lancet*, 1999. č.353: s.1834–37
18. LECORDIER, L., et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Using the Recombinant Dense Granule Antigens GRA6 and GRA1 of Toxoplasma gondii for Detection of Immunoglobulin G Antibodies. *Clinical and Diagnostic Laboratory*, 2000. č.7: s.607–611
19. MONTOYA, J. G. *Laboratory diagnosis of Toxoplasma gondii infection and toxoplasmosis.* *The Journal of Infectious Diseases*, 2002. č.185: s.73-82
20. MONTOYA, J.G., et al. *Toxoplasmosis.* *Lancet*, 2004. č.363: s1965–76
21. PEREIRA-BUENO, J., et al. Evaluation of ovine abortion associated with Toxoplasma gondii in Spain by different diagnostic techniques. *Veterinary Parasitology*, 2004. č.121: s.33–43

22. TENTER, A.M., et al. *Toxoplasma gondii: from animals to humans*. International Journal for Parasitology, 2000. č.30: s.1217-1258
23. FAJFRLÍK, K., et al. Zkušenosti s vyšetřováním těhotných žen na přítomnost protilátek proti *Toxoplasma gondii*. Remedica Klin Mikrobiol, 1998. č.2: s.227–229.
24. KODYM, P., et al. Vyšetřování na toxoplasmózu a interpretace výsledků: komentář k návrhu standardních metodik. Zprávy CEM, 1997. č.6: s.26–29.
25. HOŘEJŠÍ, V., et al. *Základy imunologie*. Triton, 2009. S.140-184. ISBN 9788073872809
26. JÍRA, J. *Lékařská protozoologie: protozoální nemoci*. Praha: Galén, 2009, s. 567
27. LITZMAN, J., et al. *Základy vyšetření v klinické imunologii*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. s. 59. ISBN 978-80-210-4227-8.
28. JÍRA, J. *Imunodiagnostika a epidemiologie toxoplasmózy*. Praha: Academia, 1983. s. 17-44
29. RYŠAVÝ, B. et al. *Základy parazitologie*. 1. vyd. Praha : SPN, 1988. s. 51 - 52
30. VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. vyd. Brno: Neptun, 2005. s. 295 – 308. ISBN 80-86850-00-5.
31. Volf P., et al. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton, 2007, s.92,93
32. TOMAN, M., et al. *Veterinární imunologie*. Praha: Grada, 2000, s.176-178. ISBN 80-7169-727-3
33. FERGUSON D. J. P. *Toxoplasma gondii and sex: essential or optional extra?* Trends in Parasitology, 2002. č.17: s. 356