



FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

**Veronika Trubačová**

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**DIAGNOSTIKA TOXOPLAZMÓZY**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: MUDr. Karel Fajfrlík Ph.D.

PLZEŇ 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny zdroje uvedla v seznamu použité literatury.

V Plzni dne 30.3.2017

.....

vlastnoruční podpis

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Karlu Fajfrlíkovi, Ph.D. za ochotu, cenné rady a informace, které mi poskytnul a také za trpělivost i profesionální přístup.

## **Anotace**

Příjmení a jméno: Trubačová Veronika

Katedra: Teoretických oborů

Název Práce: Diagnostika Toxoplazmózy

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

Počet stran – číslované: 45

Počet stran – nečíslované: 17

Počet příloh: 4

Počet titulů použité literatury: 28

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

### **Souhrn:**

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou onemocnění zvaného toxoplazmóza, které způsobuje prvok *Toxoplasma gondii*. Práce je rozdělena na část teoretickou a praktickou. V první polovině teoretické části se seznamujeme s onemocněním, samotným parazitem a klinickým obrazem, zatímco druhá polovina teoretické části je zaměřena na laboratorní diagnostiku onemocnění založenou především na sérologických metodách. Praktická část obsahuje laboratorní postupy rutinně zavedených metod, které se používají pro detekci toxoplazmových protilátek a dále jsou v této části pomocí grafů zpracována data získaná z fakultní nemocnice v Plzni.

## **Annotation**

Surname and name: Trubačová Veronika

Department: Theoretical Fields

Title of thesis: Diagnostics of Toxoplasmosis

Consultant: RNDr. Karel Fajfrlík, Ph.D.

Number of pages – numbered: 45

Number of pages – unnumbered: 17

Number of appendices: 4

Number of literature items used: 28

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

### Summary:

This Bachelor work is about illness called toxoplasmosis which is caused by element *Toxoplasma gondii*. The work is divided into theoretical and practical section. In the first half of theoretical part we are getting known with the illness, parasite and clinical picture, whereas second half is focused on laboratory diagnosis of the illness primarily based on serological methods. The practical part contains laboratory procedures of routinely introduced methods which are used for detecting toxomoplasmosis' antibodies and in this section can also be found chart data based on data from hospital in Pilsen.

# OBSAH

ÚVOD	9
TEORETICKÁ ČÁST	10
1. HISTORIE	10
2. ŽIVOTNÍ CYKLUS <i>T.GONDII</i>	11
3. MORFOLOGIE PARAZITA	12
3.1 Tachyzoit	12
3.2 Bradyzoit	13
3.3 Sporozoit	13
4. EPIDEMIOLOGIE A PREVALENCE	14
5. PATOBIOLOGIE	16
6. IMUNOLOGIE	18
6.1 Příkladná imunita	18
6.2 Specifická imunita	18
7. KLINICKÝ OBRAZ	20
7.1 Kongenitální forma	20
7.1.1 Cerebrální forma	21
7.1.2 Forma vrozených poruch	21
7.1.3 Vrozená oční toxoplazmóza	21
7.1.4 Viscerální forma	23
7.2 Získaná (akvírovaná) forma	23
7.2.1 Uzlinová (lymfoglandulární) forma	23
7.2.2 Neurotoxoplazmóza	24
7.2.3 Získaná oční toxoplazmóza	25
7.2.4 Septikemická (exantemická) forma	26
7.2.5 Postižení vnitřních orgánů	26
7.2.6 Manipulace hostele prvokem	26
8. LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA	28
8.1 Přímý průkaz	28
8.1.1 Přímý mikroskopický průkaz	28
8.1.2 Isolační pokus na laboratorní myši	29
8.1.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	29
8.2 Nepřímý průkaz	30
8.2.1 Komplement fixační reakce (KFR)	31
8.2.2 ELISA	31
8.2.3 Test IgG avidity	32
8.2.4 Western Blot	32
8.2.5 Sabin-Feldmanův test barvitelnosti	32
8.3 Zobrazovací metody	32
9. TERAPIE	34

PRAKTICKÁ ČÁST	36
10. METODIKA STANOVENÍ	36
10.1 Biologický materiál	36
10.2 Stanovení protilátek <i>T.Gondii</i> pomocí KFR	36
10.2.1 Princip testu KFR	36
10.2.2 Složení soupravy a příprava roztoků	36
10.2.3 Pracovní postup	37
10.2.4 Hodnocení výsledků	39
10.3 Stanovení protilátek <i>T.Gondii</i> metodou ELISA	40
10.3.1 DSX automatický ELISA systém	40
10.3.2 Princip EIA Toxoplasma IgG	40
10.3.2.1 Složení soupravy	40
10.3.2.2 Pracovní postup	41
10.3.2.3 Hodnocení v mezinárodních jednotkách	41
10.3.3 Princip EIA Toxoplasma IgM	42
10.3.3.1 Složení soupravy	42
10.3.3.2 Pracovní postup	42
10.3.3.3 Hodnocení výsledků dle indexu positivity	43
10.3.4 Princip EIA Toxoplasma IgA	43
10.3.4.1 Složení soupravy	44
10.3.4.2 Pracovní postup	44
10.3.4.3 Hodnocení výsledků dle indexu positivity	45
11. ZPRACOVÁNÍ ZÍSKANÝCH DAT	46
11.1 Celkový přehled vyšetření	46
11.2 Výsledky získané metodou KFR	47
11.3 Výsledky získané metodou ELISA	48
11.4 Skutečně pozitivní pacienti	49
11.5 Zpracování výsledků gravidních žen	50
11.6 Zhodnocení positivity u vyšetřovaných skupin pacientů	50
11.7 Počty vyšetření za posledních 6 let ve FN v Plzni	51
12. DISKUSE	52
ZÁVĚR	53
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	54
SEZNAM ZKRATEK	57
SEZNAM TABULEK	58
SEZNAM GRAFŮ	59
SEZNAM PŘÍLOH	60
PŘÍLOHY	61



## ÚVOD

Pro svoji bakalářskou práci, jsem si vybrala téma Diagnostika Toxoplazmózy, nejen protože už jsem se s touto nemocí ve svém okolí setkala ale také pro velice zajímavé biologické vlastnosti, které původce onemocnění má a pro různé možnosti laboratorní diagnostiky. Původcem tohoto onemocnění je prvok *Toxoplasma gondii*, zařazená mezi kokcidie do kmene *Apicomplexa* neboli výtrusovci a patří mezi nejrozšířenější parazity savců. Toxoplazmóza je kosmopolitně rozšířená protozoální nemoc, která patří mezi nejčastější zoonózy v ČR. Toxoplazmóza je značně rozvinuté téma což nám potvrzuje několik tisíc vydaných publikací týkajících se jak diagnostiky, léčby, epidemiologie či vývojového cyklu parazita.

I přes všechny informace zjištěné během několika let, kdy byla a stále je tomuto tématu věnována zvýšená pozornost, se nacházejí případy úmrtí nebo těžkého poškození plodu v případě latentní infekce.

Cílem mé práce je seznámit čtenáře s problematikou týkající se tohoto onemocnění, zhodnocení výskytu nemoci v plzeňském kraji a souhrn používaných metod.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1. HISTORIE

V Tunisku v roce 1908 poprvé popsali původce Charles Nicolle a Luis Herbert Manceaux u hlodavce severoafrické pamyši hřebenoprsté (*Ctedodactylus gundi*) a současně zároveň nezávisle našel v Brazílii Splendor u králíka příznaky paralýzy. Později byla toxoplazmóza nacházena u různých živočichů. V roce 1923 popsal český oftalmolog Josef Janků tkáňové cysty parazita v oku 11 měsíčního chlapce, postiženého hydrocefalem, levostraným mikroftalmem a degenerativními ložisky v oblasti žluté skvrny. Do světového nozologického názvosloví se jméno českého lékaře zapsalo pod názvem nemoc Janků. Jako původce kongenitální encefalidity byl parazit izolován americkými autory A.Wolfem, D.Cowenem a B.H.Paigem. (7)

A.B.Sabin a Harry A. Feldman zavedli první rutinně použitelný sérologický test na toxoplazmózu v roce 1948. V létech 1951 až 1957 se na poznání uzlinové formy (*lymphadenitis toxoplasmotica*) zasloužili J. Ch. Siim z Kodaně a vídeňští badatelé Alexandra Piringerová-Kuchinková a Otto Thalhammer. K objasnění biologického cyklu parazita došlo až v roce 1970 skotským badatelem W. M. Hutchisonem díky objevu fekálních forem. (9)

## 2. ŽIVOTNÍ CYKLUS T. GONDII

Životní cyklus tohoto vícehostitelského parazita je charakterizován směnou definitivního hostitele a mezihostitele. Definitivním hostitelem je kočka domácí a mezi hostitele můžeme řadit různé druhy ptáků, obratlovců a savců včetně člověka. (5,6,24)

Toxoplazmová (vegetativní, nepohlavní) fáze se odehrává ve tkáních mezihostitelů případně definitivních hostitelů. Tato fáze je charakteristická nepohlavním množením tzv. endodyogenesí což je tvorba dvou dceřiných buněk z jedné buňky mateřské, která se následně rozpadne. V organismu mezihostitelů při fázi akutní i chronické dochází k pomnožení agamentních forem parazita a ke vzniku zoitocyst. V případě, že se jedná o kočkovité šelmy dochází k diseminaci do extraintestinálních tkání a tvorbě cyst ve tkáni už několik hodin po nákaze. (4,7)

Izosporová (pohlavní, gametická, kokcidiová) fáze probíhá ve střevním epitelu definitivního hostitele, zejména v ileu. Výsledkem této fáze jsou oocysty izosporového typu, které jsou vylučované do prostředí, kde dlouhodobě přežívají. Nákaza mezihostitele je zprostředkována fekálně-orální cestou. Během počátečního množení schizogonií (merogonií) je typická přítomnost merozoitů a schizontů a na tento proces navazuje gametogonie. Plazma schizontů je granulární a bazofilní, jejich jádro je měchýřkovité a vytváří se v nich 4 až 36 merozoitů. (5, 9)

Makrogametocyty obsahují měchýřkovité jádro s jadérkem, mají ovoidní tvar a dosahují velikosti 7-8 x 4-7  $\mu\text{m}$ . Mikrogametocyty jsou spíše kulovitěho tvaru a vytváří se v nich 10-32 mikrogamet se třemi bičíky přičemž jeden z nich je zakrnělý. K oplození makrogamety tzn. gametogamii dochází ještě před tím, než se vytvoří stěna oocysty v hostitelské buňce. Mikrogamety se dostávají do lumen střeva, kde vyhledají hostitelské buňky obsahující makrogamety a poté je oplodní. Sporulace je exogenní, nastává mimo střevo kočky a trvá 1-5 dnů. Vysporulovaná izosporová oocysta je velká 14 x 11  $\mu\text{m}$ , obsahuje 2 sporocysty a každá z nich obsahuje 4 sporozoity. Oocysty mohou přežít až 18 měsíců za přírodních podmínek, ve vodovodní vodě i déle než rok, v mořské vodě sporulují a přežívají několik měsíců, také bylo prokázáno, že přežívají i na malinách a borůvkách. Jsou tedy velmi odolné. (4, 6, 7)

### 3. MORFOLOGIE PARAZITA

Podrobnosti o vnitřní struktuře parazita byly objasněny díky elektronové mikroskopii. Buněčný obal je tvořen třemi vrstvami povrchové membrány. Ztluštělá vrstva pelikuly tvoří na předním pólu buňky polární (apikální) prstenec, který obkružuje tzv. konoid, složený z mikrotubulů stočených do spirály. Do konoidu ústí 4-10 válcovitých útvarů nazývaných rhoptrie (toxonomy) mající sekretickou funkci a také je to sídlo lysosomálních enzymů. Z polárního prstence vychází 22 subpelikulárních tubulů. Uprostřed buňky se nachází mikroporus, jehož funkcí je přijímání makromolekulární potravy. Kulovité jádro s velkým obsahem DNA je ve středu buňky. V blízkosti jádra je Endoplasmatické retikulum s ribosomy. V cytoplazmě jsou přítomny mitochondrie a denzní tělíška, která jsou přítomna jen u tachyzoitů. Golgiho aparát je na přední straně jádra. Apikoplast je plastidová organela s čtyřvrstvou membránou. Cytoskelet umožňuje parazitovi se pohybovat. Struktura bradyzoitů se od tachyzoitů liší pouze přítomností amylopektinových granulí a uložením jádra. (7,9)

#### 3.1 Tachyzoit (trofozoit, endozoit)

Tachyzoiti jsou vegetativní formou toxoplazmózy jenž má konkávokonvexní (banánovitý) obrys. Dosahují velikosti je 4-7 x 1,5-4  $\mu\text{m}$ . Jejich jádro kulovitého tvaru obsahující jadérko je uloženo centrálně popřípadě u posteriorního pólu. Množení tachyzoitů je relativně rychlé a probíhá procesem endodygonie. Běžně se vykytují v mitochondriemi či endoplasmatickým retikulem obklopené parazitoforní vakuole, která je membránou spojena s pelikulou zoitu intravaskulárními tubuly. V organismu hostitele mohou být přítomny volně i intracelulárně. Tachyzoiti se mohou vyskytovat i ve skupinové formě zvané pseudocysta. Pseudocysta je proliferační stádium trvající maximálně několik hodin protože je rozrušována trávicí tekutinou a obsahující menší počet parazitů. Tvoří se zejména při akutním průběhu nemoci, méně často při chronickém. Okolní tkáň je zánětlivě změněna. (9, 13)

### **3.2 Bradyzoiti (cystozoiti)**

Bradyzoiti své jméno dostali podle pomalého množení (bradys = zdlouhavý) a jsou charakteristické pro chronickou infekci. Měří 5-6,5 x 1-1,5  $\mu\text{m}$ . V počtu až několik set tisíc jsou přítomny uvnitř tkáňové cysty nazývané zoitocysta. Zoitocysta je klidová forma kulovitého tvaru, o velikosti až 300  $\mu\text{m}$ . Je pokryta elastickou membránou zajišťující ochrannou funkci. Obrys zoitocysty je hladký a v jejím okolí nejsou patrné žádné změny. Mají také schopnost poměrně dlouho přežít mimo živého hostitele, ve svalech či orgánech jsou schopné přežít 14 dnů při +8 až +10°C a 24 dnů při +4 až +6°C. K usmrcení dochází při zahřátí na +67°C. Po zmražení na -14°C jsou schopné přežít jen pár hodin. (6, 7, 19)

### **3.3 Sporozoiti**

Intracelulární sporozoiti jsou izosporová fáze, po 4 se vyskytují ve sporocystě a již se dále nedělí. Velikost se udává 5-6,5 x 1,5  $\mu\text{m}$ . Obsahuje konoid, rhoptrie, v řadách uspořádané mikronemy, mitochondrie, denzní granula, lipidová a amylopektinová zrna a apikoplast dříve označován jako multimembránová vakuola nebo Golgiho adjunkt. Sporozoiti stejně jako tachyzoiti a bradyzoiti jsou haploidní. (3, 7, 9, 14)

## 4. EPIDEMIOLOGIE A PREVALENCE

Tato parazitární zoonóza se může šířit několika cestami díky velkému množství hostitelů jako zdroje nákazy. Někdy se uvádí až 300 druhů savců a ptáků, u kterých byla přirozená nákaza potvrzena. U všech druhů ptáků a savců může tedy přepokládat vnímavost k nákaze. Fekálně-orální a alimentární nákaza bývají nejčastější, ale náhodně se nákaza může šířit i kapénkovou infekcí, spojivkou nebo menšími ranami na kůži při kontaktu s infekčním materiálem. Nákazu mohou šířit všechny tři infekční formy parazita. (9,14)

Trofozoiti/tachyzoiti vzhledem ke své vnímavosti k vlivům vnějšího prostředí a trávicím tekutinám jsou nejméně nakažliví. Vstupní branou bývá sliznice hltanu. Průnik do cirkulace probíhá prostřednictvím lymfatických cév. Je zde i potencionální možnost nákazy přímým kontaktem sliznice dutiny ústní při líbání u lidí a u zvířat při olizování.(7)

Cystozoiti/bradyzoiti přítomny ve tkáňových cystách u mezihostitelů složí jako zdroj nákazy alimentární cestou. V přírodních podmínkách tak umožňují parazitům cirkulovat u predátorů během lovu. U člověka se šíří díky požívání syrového masa.(7)

Sporozoiti jsou zdrojem nákazy fekálně-orální cestou u býložravců a všežravců (hlavně ovce, králíci, zajíci, prasata, člověk) tak že kontaminují okolní prostředí v oocystách. (7)

V kočičích výkalech jsou oocysty přítomny 3-5 dnů po pozření zoitocyst, 8-10 dnů po nákaze tachyzoity a 21-24 dnů po pozření infekční suspenze z kočičích výkalů. Jedna kočka je schopna do okolí vyloučit až 100 milionů oocyst. Prepatentní doba je dle nálezů 3-5 dnů. Doba vylučování je 7-18 dní. Riziko nákazy zvyšuje například pití nefiltrované vody. (9)

*T. gondii* je geopolitní parazit vyskytující se bez mála na celé planetě. U lidí je prevalence ovlivněna lokalitou, environmentálními podmínkami a sociálními zvyky. Ve vlhkých a teplých lokalitách je výskyt vyšší. Nákaza v přírodě cirkuluje ve ferální sféře mezi divokými savci. Domácí zvířata se řadí do sféry domestikální a interhumánní sféra zahrnuje kongenitální formu toxoplazmózy a získané nákazy u pacientů s transplantací orgánů.

Parazit má rozvinuté adaptační schopnosti, a proto se často jedná o latentní nákazu prokazatelnou nepřímo pomocí imunodiagnózy. V rámci ČR má

protilátky proti toxoplazmóze asi 20% lidí. Z toho 34,1 % žen a 26,3 % mužů. U HIV pozitivních lidí je výskyt vyšší, prevalence u mužů je 42,8 % a u žen 42,7%. (2,11,16)

Preventivní opatření mají smysl hlavně u těhotných žen a dosud neinfikovaných imunokompromitovaných pacientů. K nákaze člověka dochází přímo oocystami vylučovanými do prostředí domácími zvířaty, nedostatečně tepelně upraveným masem obsahující tkáňové cysty, také je možný přenos infekce na plod při primoinfekci ženy v těhotenství. Ojediněle byly zaznamenány i případy přenosu transfuzí krve nebo transplantací orgánů od séropozitivního dárce séronegativnímu příjemci. (12)

Důležitým opatřením je hlavně hygiena zahrnující dostatečnou tepelnou úpravu masa zejména králíčího, skopového a vepřového, řádně omytá zelenina a ovoce i kuchyňského náčiní. Je třeba dávat pozor na závadnou pitnou vodu. Chovatelé koček by měli dbát na rychlé odstranění kočičích výkalů a dostatečné hygieně. Zvýšené hygienické opatření je třeba dbát po kontaktu s půdou, manipulaci se syrovým masem, nebo kontaktu s kočkou. Před začátkem gravidity by se ženy měly nechat vyšetřit na přítomnost protilátek, pokud protilátky nemají, měly by přísně dodržovat hygienické zásady.(4,13, 14)

## 5. PATOBIOLOGIE

Pro tkáň je typická reakce s perivaskulárními infiltráty a rozšíření cév. V infikované zóně je přítomna nekróza a parazité jsou přítomny v jejím okolí. Nekrózy bývají mikroskopické, ale mohou mít v průměru až 3 mm a mohou splývat.

V případě kongenitální formy se orgánové léze vyskytují hlavně v míše a mozku. V mozkové tkáni vznikají mikroglialní uzlíky, které jsou složeny z eozinofilů, plazmocytů, mikroglíí, astrocytů a adventiciálních buněk. U staršího ložiska může dojít ke kalcifikaci a to se nejčastěji děje v mozkové kůře a kolem komor. U dospělých nemocných s AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome = syndrom získaného selhání imunity) a poruchou centrálního nervového systému (dále jen CNS) se objevují léze s infiltrátem složeným z abnormálních lymfocytů, monocytů, neutrofilů a plazmocytů. V mozku jsou difuzní léze, abscesy a krvácení do komor. Okolo nekrotických lézí v zánětlivé zóně jsou přítomni volní tachyzoiti a tkáňové cysty *T.gondii*.

Histologickým nálezem v mízní uzlině je proliferace eosinofilních epitheloidních buněk retikula. V plicích alveolech je fibrinózní exsudát s intra- a extracelulárními zoity.

Trofozoiti vytvářejí okolo sebe cysty nejprve v CNS a v oku a bylo prokázáno, že přiléhají přednostně k retinálnímu endotelu. V retinálním endotelu probíhá množení parazita 2,8-krát rychleji než v prepuciálních fibroblastech. U plodu nebo dítěte s vrozenou oční toxoplazmózou jsou běžné známky roztržení pigmentového epitelu sítnice, nekrózy a zánětu sítnice, kongesce a zánět cévnatky, zánět očního nervu, odchlípení sítnice a exsudát subretinální.

Vrozené léze oka, jejichž většina vzniká už *in utero*, jsou nevratné a objevují se na periférii sítnice, zadním pólu oka a peripapilární oblasti. Příčinou je pravděpodobně ruptura tkáňové cysty dlouhodobě přežívající v sítnici.

Léze v placentě, které obsahují polymorfonukleární buňky, plazmocyty a lymfocyty, jsou přítomny v pupečníku, choriové desce, placentární membráně a choriových klcích. Jak je zánět v placentě a u plodu vyvolán není dosud známo. Znakem pro určité buňky po nákaze virulentním kmenem je parazitoforní



vakuola s obsahem 2-20 parazitů. 30% jader trofoblastu podléhá apoptóze a až 35% jader zmizí po 2 dnech od nákazy.

V případě chronické toxoplazmózy se na patogenezi účastní přecitlivělost na toxoplazmový antigen, případně další látky uvolněné z cyst ve tkáních, které přežívají především v CNS. Mohou se vyskytovat místní nebo celkové reakce po provedení kožního diagnostického testu. V některých případech byl zaznamenán příznivý účinek při podávání stoupajících dávek toxoplazmového antigenu do podkoží. (3,7,9)

## 6. IMUNOLOGIE

*T. gondii* je intracelulární parazit, který postihuje jinak zdravého jedince a jinak imunosuprimované osoby. Součástí strategie pro přenos a přežití tohoto parazita je, že vyvolává asymptomatickou chronickou infekci u imunokompetentního hostitele, zatímco u oslabeného jedince může být infekce letální. (8)

### 6.1 Přirozená imunita

Během počátečního stádia infekce, je důležitá, na IL-12 (interleukinu) závislá produkce IFN- $\gamma$  (interferon) pocházející z NK-buněk (přirození zabíječi) či určitých subpopulací T-lymfocytů. Za častou aktivaci těchto buněk je zodpovědná hydrofobní molekula indukující syntézu IL-12, TNF- $\alpha$  (faktor nádorové nekrózy  $\alpha$ ) a IL-1 $\beta$  v makrofázích a také superantigen, jenž vyvolává produkci IFN- $\gamma$ CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů.  $\gamma\delta$ T-lymfocyty se také účastní časně imunitní odpovědi a jejich schopnost spočívá v lýze infikovaných makrofágů a podpory exprese endogenního proteinu teplotního šoku (HSP 65). HSP 65 u napadených makrofágů zabraňuje apoptóze. NK-buňky se účastní této reakce po stimulaci IL-12, tím, že produkují IFN- $\gamma$ . (8,23)

### 6.2 Specifická imunita

Pro orientaci ve vývoji specifické imunity je důležité vzájemné působení parazita s obrannými mechanismy hostitele. Buněčná imunita indukci IL-12 a IFN- $\gamma$  stimuluje vývoj Th1 (pomocných T-lymfocytů) subpopulace lymfocytů. Humorální imunita nemá tak veliký význam v protektivní imunitě proti *T.gondii*. Klíčovou složkou jsou T-lymfocyty. U Th (pomocné s CD4<sup>+</sup>) a Tc (cytotoxické T-lymfocyty s CD8<sup>+</sup>) lymfocytů bylo zjištěno, že působí synergicky. T-lymfocyty přispívají protektivní imunitě produkcí IL-2 a IFN- $\gamma$ . Efektorové buňky, které zabraňují vytváření cyst a udržují protektivní imunitu, jsou Tc-lymfocyty. CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty vykazují cytotoxickou aktivitu proti tímto parazitem napadeným buňkám. Autokrinní účinek IFN- $\gamma$  zvyšuje cytotoxickou aktivitu.

Makrofágy, které jsou aktivovány IFN- $\gamma$ , jsou efektorové buňky, ve kterých dochází ke zničení parazitů. Uvnitř aktivovaného makrofágu se spojují lysozomy a vakuoly obsahující živé tachyzoity, čímž dochází k usmrcení parazitů. (8,23)

## 7. KLINICKÝ OBRAZ

Rozlišujeme dvě základní klinické formy podle způsobu nákazy, které se od sebe liší klinickými symptomy a průběhem. Je to toxoplazmóza prenatálně získaná (vrozená, kongenitální) a postnatálně získaná (akvírovaná). (4,5)

### 7.1 Kongenitální forma

Postižení, které je způsobené následkem intrauterinního infektu při průchodu parazitů přes placentu. Zpočátku bývá generalizovaná. K transplacentární nákaze může dojít jen při primoinfekci ženy během těhotenství (žena infikovaná před otěhotněním je tzv. chráněna). V graviditě má pak nákaza většinou průběh inaperentní nebo s mírnými chřipkovými příznaky. (1)

Riziko placentární nákazy je závislé na fázi těhotenství a to je nejvyšší (60%) po 30. týdnu. Čím dříve je plod v těhotenství infikován, tím se zvyšuje závažnost průběhu i míra poškození plodu. V prvním trimestru může dojít k těžkému poškození plodu nebo až k jeho odumření. V posledním trimestru naopak při nákaze převládají subklinické projevy. Podle údajů je 85% nakažených dětí v během porodu bez příznaků, často se stává, že subklinická nákaza nemusí být odhalena. O rok později však u těchto dětí dochází k závažným komplikacím. Chorioretinitida se může vyvinout dokonce až během dětství nebo adolescence. Pokud má matka protilátky už před těhotenstvím tak neporodí infikované dítě.

V závislosti na zeměpisné lokalizaci populace je prenatální nákazou postiženo 1 až 120 novorozenců na 10 000 živě narozených dětí. V Evropě se vyskytuje kongenitální toxoplazmová nákaza od 0,1 do 7 na 1000 porodů. V USA se odhaduje na 400 až 4000 případů s kongenitální toxoplazmózou ročně.

Ve Francii více než 20 let existuje program povinné prevence kongenitální toxoplazmózy. I přes pokročilé metody nejsou některé případy kongenitální toxoplazmózy rozpoznány včas, a proto je důležité sledovat rizikové novorozence. Kongenitální toxoplazmózou je v České Republice (dále jen ČR) ročně ohroženo 116 dětí (odhadováno na základě přepočtu na počet narozených dětí). (7,9)

### **7.1.1 Cerebrální (mozková) forma**

Mozková forma má subakutní průběh infekčního procesu, kdy je výskyt parazitů omezen na mozek a zrak. Nejvýraznější v klinickém obrazu je encefalitida s hydrocefalem. Lebka novorozence se zvětšuje už před porodem nebo několik dnů po porodu. Jedná se o okluzivní hydrocefalus vzniklý díky uzávěru postranních komor nebo Sylviova akvaduktu proliferující granulomatózní ependymitidou.

Příznak zacházejícího slunce je typickým příznakem, vyvolaný stlačením očního bulbu dolů a dopředu, dolní okraj duhovky poté mizí pod dolním víčkem. Mezi klinické příznaky dále patří opistotonus, křeče a obrny. Intrakraniální kalcifikace jsou prokazatelné v 50 až 90% případů, bývají umístěny v jakékoliv části mozku nebo bazálních ganglií. Rozvinutá mozková forma, pro kterou je typická Sabinova tetráda (chorioretinitida, hydrocefalus, křeče, intrakraniální kalcifikace) má zpravidla maligní průběh letálně končící během několik dnů až měsíců i přes komplexní léčebnou péči. (1,7,9)

### **7.1.2 Forma vrozených poruch**

Je charakterizována subakutním nebo chronickým průběhem mozkové formy s nižším infekčním procesem. Takto postižené dítě přežívá s patrnými celkovými nebo neurologickými abnormalitami, se známkami kognitivního a motorického deficitu, se sklony k záchvatům, křečím a s defektem sluchu. Velmi časté u dětí s očním postižením jsou psychické a neurologické změny, hlavně změny v chování jako je nesoustředěnost, zřídka oligofrenie nebo epilepsie. Léčba má příznivý účinek na neurologické a vývojové poruchy. (3,7)

### **7.1.3 Vrozená oční toxoplazmóza**

Nejčastějším příznakem této formy je chorioretinitida (retinochoroiditida). Jednostranná léze může být izolovaná nebo ve spojení s jinou poruchou. Stává se, že diagnostikována je až v prvním či druhém roce života. Ve většině případů se jedná o těžký nekrotizující zánět, který narušuje sítnici a postihuje přilehlou cévnatku. Střed sítnice je postižen primárně, zatímco cévnatka (*retinochoroiditis centralis*) druhotně.

Výsledkem tohoto procesu je atrofická jizva vypadající jako pseudokolobom žluté skvrny, přetrvává bez změn několik let až celoživotně.

Ložisko toxoplazmy má tvar horizontálně oválný, někdy může být i kruhový, okrouhlý a nepravidelný a vždy je ohraničené. Destrukce cévnatky a atrofie má za následek zabarvení ložisek do bělava, s četnými pigmentovými skvrnami a to převážně na okrajích, ale i v centru. Téměř odhalené oční bělmo, způsobuje při hluboké atrofii sítnice a cévnatky světlou barvu ložiska. V tomto ložisku bývá někdy uložena prominující hmota šedobělavé barvy proliferujícího vaziva. Nad postiženou oblastí mohou procházet cévy sítnice. *Foyer chorioretinienne en rosace* popsal J.Francois (1963) jako charakteristickou a specifickou formu ložiskové chorioretinitidy.

Můžeme zde rozlišit zónu centrální a periferní. Šedá či namodralá, bezpigmentová, homogenní, avaskulární pseudotumorózní masa charakterizuje centrální zónu. Může se jednat také o pigmentovaný šedý ostrůvek, atrofický okrsek nebo nakupení tmavého pigmentu. Pseudotumorózní masa je složena z fibrózní tkáně nebo proliferací glie a může být uložena excentricky. Centrální masa je často obklopena kruhem oválných terčů atrofie ohraničených pigmentem.

Periferní zóna je charakterizována jako prstenec či pásek (*collier*) choroidální atrofie. Její barva je narůžovělá až čirá s naznačenou buněčnou nebo alveolární strukturou. Periferní zóna nemusí být na všech místech patrná a ložisko tak přímo přechází do nedotčené sítnice.

Mezi zónami je přítomná vrstva pigmentu. Periferní nahromadění pigmentu má tvar kruhu, je souvislé a na některých místech může být přerušované, může mít různou hustotu a může změnit tvar na srpek či rohlíček v okamžiku excentrického posunu centrální zóny. Na okraji léze je často přítomná hyperpigmentace způsobená porušením retinálního pigmentového epitelu.

Tkáňové cysty můžeme najít převážně na okrajích léze, ale i na místech vzdálenějších např. v intaktní sítnici bez projevu zánětu. Proliferační pruhy mohou z okraje pseudokolobomu dosahovat až ke zřetelnému nervu.

Vedle typických chorioretinálních lézí můžeme objevit i chorioretinitidu banální s necharakteristickým vzhledem. Toxoplazmová chorioretinitida může způsobit klinický obraz pseudogliomu, sekundární odchlípnutí sítnice (např. typ *plica falciformis*, obrazy podobající se retrolentikulární fibroplazii, Coatsovu retinopatii), dále můžeme pozorovat postižení očního nervu, mikroflatmus i

anofthalmus, nystagmus, strabismus, ne tak často se objevují zákaly sklivce, perzistující *arteria hyaloidea*, katarakta a další odchylky. U dětí můžeme pozorovat, jak si mnou oblast postiženého oka což nazýváme Digitookulární fenomén. Makulární léze způsobují nevratné poškození zraku, dále křeče, epilepsii, psychomotorickou retardaci a mohou být spojovány s dlouhodobými neurologickými problémy. Opakované onemocnění očního aparátu se vyskytují kolem makulární jizvy jako čerstvá satelitní ložiska. Zdánlivě neaktivní vrozená oční toxoplazmóza se může aktivovat a dále se zhoršovat. Tuto exacerbaci pozorujeme u čtvrtiny postižených dětí. (7,9,10)

#### **7.1.4 Viscerální forma**

Patří mezi vzácné formy a je považována za generalizovanou infekci. Odpovídá akutnímu procesu s parazity rozsetými ve vnitřních orgánech v důsledku intrauterinně prodělané parazitémie. Děti postižené viscerální formou toxoplazmózy jsou ve většině případech nedonošené, mohou mít žloutenku, poruchu dýchání, otoky, jsou cyanotické a krvácí. Ve vnitřních orgánech se může objevovat pneumonie či myokarditis. Později se objevují i příznaky poruchy CNS. (9)

## **7.2 Získaná (akvirovaná) forma**

K tomuto onemocnění dochází postnatálně, ve věku dětském, adolescentním či dospělém a většinou probíhá asymptomaticky. K nejčastějším příznakům akutní formy, které ale často sami vymizí, patří zduření mízních uzlin, únava, bolest hlavy a svalů či malátnost. Komplikovaný průběh může nastat u imunodeficitních pacientů. (16)

### **7.2.1 Uzlinová (lymfoglandulární) forma**

V tomto případě se mízní uzliny v akutním stádiu zvětšují do velikosti hrášku až lískového ořechu, jsou měkké, pevné a hladké, rovnoměrně hutné a ohraničené, bez otoku a bez bolesti nebo jen mírně citlivé při dotyku. Uzliny nepřilínají ke kůži ani podkladu, jsou pohyblivé a nesplývají. Kůže v oblasti uzlin není nijak pozměněná, není horká, začervenalá, nehnisá ani se netvoří píštěle. Nejčastějším místem kde dochází ke zduření uzlin je především krk,

šíje, podčelistní oblast, za ušním boltcem a na kraji kývačů. Méně často jsou postiženy uzliny ve tříslech a v podpaží. Nejčastěji jsou mnohočetné, ale mohou se objevovat i solitární (*polyadenie*). Zvětšení uzlin přetrvává několik týdnů až měsíců.

Histologickou změnou je proliferace eosinofilních epiteloidních buněk retikula vyskytujících se v trsech, ale i samostatně. Tato forma bývá často spojována se syndromem chronické únavy, jenž pokračuje v lymfadenopatii. Inkubační doba u laboratorních případů je asi 3-9 dní a u přirozené nákazy ji nelze přesně určit. Výskyt akvírované formy je nejasný. V ČR bylo nahlášeno 3618 případů uzlinové toxoplazmózy v letech 1997-2003. (7,12)

### **7.2.2 Neurotoxoplazmóza**

Nejčastější výskyt je u pacientů s poruchou imunity a jako komplikace při nákaze pacienta virem HIV (Human Immunodeficiency Virus = virus lidské imunitní nedostatečnosti) je poškození CNS. Toxoplazmová encefalitida se podle odhadu vyvine u 10-47% nemocných s AIDS a dále u takto nemocných (nejméně 30%) byl zjištěn vyšší titr protilátek proti toxoplazmóze a to znamená, že se často jedná o reaktivaci latentní formy toxoplazmózy.

Rozvoj nemoci probíhá pozvolna během několika týdnů a může při něm pozorovat příznaky jako např. horečky, křeče, nauzea, bolest hlavy, poruchy hybnosti končetin, retardace (uvádí se až u 60% pacientů), hemiparéza či obrna mozkových nervů. Dále se u pacienta může objevit zmatenost, dezorientace, apatie, letargie až kóma, afázie, ataxie, dysmetrie.

Pomocí vyšetření počítačové tomografie (dále jen CT) zjistíme mnohočetné, oboustranné hypodenzní léze, které postihují bazální ganglia a kortikomedulární spojení hemisfér. Kromě mozku mohou být asi u 20% nemocných postiženy i jiné orgány, nejčastěji se jedná o plíce a srdce. Náhlý začátek nemoci je vzácný, většinou začíná pomalu během několika týdnů. Subjektivní příznaky nemoci jsou hlavně bolest hlavy, která může být i lokalizovaná, neschopnost pohybu končetin, slabost, dezorientace, kóma, porucha kognitivních funkcí, křečový záchvat (nejčastěji Jacksonova typu). Fokální neurologický nález má objektivní význam. Na tom zda se u pacienta objeví hemiparéza, paréza mozkových nervů, hemisenzitivní výpadek, intenční



tremor či ataxie závisí umístění léze. Projevy meningitidy jsou jen vzácně pozitivní.

Diagnóza je určena podle klinického obrazu, výsledku vyšetření CT nebo magnetické rezonance (dále jen MRI). Osoby se schizofrenií mají významně zvýšené toxoplazmové protilátky. Podle experimentální ověřených studií můžeme říct, že latentní toxoplazmóza se podílí na změnách týkajících se chování, ovlivňuje psychiku a snižuje psychomotorický výkon. (7,9,10)

### 7.2.3 Získaná oční toxoplazmóza

Projevuje se jako nitrooční zánětlivé onemocnění, nejčastěji se setkáváme se zadní ložiskovou uveitidou centrální, paracentrální a juxtapapilární současně se špatným viděním, fotofobií a bolestivostí. Většinou jde o chorioretinitidu ložiskovou s méně přítomnými ložisky v makulopapilární oblasti zadního pólu oka jako je: *chorioretinitis juxtapapillaris Jensen*, *chorioretinitis centralis et paracentralis* a ložisková chorioretinitida podél sítnicových cév, hlavně tepének. Ložiska mohou promínavat a mohou přispívat ve výjimečných případech ke vzniku sekundárního odchlípení sítnice. Diseminovaná chorioretinitida s mnoha ložisky patří k obrazu získané oční toxoplazmózy, který není příliš častý. Ke klinickému obrazu toxoplazmózy nepatří difúzní a periferní chorioretinitida. Naopak mezi charakteristické znaky patří velký sklon k recidivám, opětovaně objevující se vedlejší (satelitní) ložiska, exudativní zánět a tendence zacelovat se pigmentovou, atrofickou jizvou. Pacienti s chorioretinitidou a ti, u kterých můžeme výskyt toxoplazmózy předpokládat, často vzniká oválně, laločnaté či okrouhlé izolované ložisko v oblasti *macula lutea* nebo u terče zrakového nervu. Exsudace a prominentace ložiska není výjimkou. Sklivec je zakalený poměrně mírně a do určité míry i přechodně. Na okraji ložiska se často objevuje retinální, subretinální, menší srpkovité, či větší plošné krvácení. Pokud je ložisko ohraničené, může se uprostřed ložiska vytvořit pigment nazelenalé barvy. U některých pacientů se může jednat o pozdní exacerbaci kongenitální toxoplazmózy. V případě časně fáze nákazy můžou být retinální vaskulitida a související zánět jediným očním defektem. Během postnatálně získané toxoplazmózy je opakované onemocnění očního aparátu poměrně časté. Výskyt protilátek typu IgG (imunoglobulinu) je častější u pacientů s opakovanou

oční toxoplazmózou než u pacientů s primární oční toxoplazmózou, nicméně u takto nemocných se častěji prokazuje přítomnost *T.gondii* v intraokulárních tekutinách. Mnohohžiskové oboustranné a difuzní poškození sítnice je charakteristické pro HIV pozitivní pacienty. Těžší poškození oka se vyskytuje u imunosuprimovaných osob. U starších osob s nynější nákazou se vyskytuje převaha očního poškození v důsledku změny imunitního stavu. Parazité mají tři klonové linie a genotyp 1 je spojován s těžším onemocněním u zvířat a lidí. Toxoplazmóza zapříčiňuje 7 až 15 ze všech uveitid. (7,12, 16)

#### **7.2.4 Septikemická či exantemická forma**

Vyskytuje se vzácně a prognóza je příznivá. V tomto případě může být postiženo více vnitřních orgánů najednou. Začátek tohoto akutního horečnatého onemocnění se projevuje horečkou, únavou, třesavkou, nauzeou, bolestmi svalů a kloubů. Vyrážka se nenachází ve vlasech, na chodidlech, dlaních a podobá se skvrnivce. Může se objevovat adenopatie a splenomegalie. (7, 9)

#### **7.2.5 Postižení vnitřních orgánů**

Toto postižení je také vzácnější a projevuje se jako myozitida, myokarditida, pneumonie, uropatie (poškození močového měchýře) či postižení jater a trávicího traktu (dále jen GIT). Současný výskyt myokarditidy a myozitidy je prokázán. U pacientů s AIDS je časté poškození plic a dále se u pacientů s AIDS může objevovat multiorgánové postižení doprovázené horečkami, dezorientací a apatií, septickým šokem, DIC (disseminovaná intravaskulární koaguace) a kardiopulmonální dekompenzací. Je možná kombinace s pneumocystózou. (3, 7, 19)

#### **7.2.6 Manipulace hostitele prvokem**

Pro kočku je snadnější kořistí myš, která je toxoplasma pozitivní než myš nenakažená. Tímto parazit zajišťuje snadnější přenos k definitivnímu hostiteli. V mozku myši totiž dochází k produkci neurotransmiterů shodnými s přenašeči vyskytujícími se běžně např. serotoninu.

Lidé s toxoplazmózou mají delší reakční dobu, a proto také způsobují více dopravních nehod. Co se žen týče, jsou více společenské a vřelé, muži jsou naopak méně společenší, méně se obávají trestů za porušení společenských pravidel a jsou méně důvěřiví k okolí. U mužů i žen je snížen strach z nebezpečí.

Antipsychotika jako je kyselina valproová, haloperidol, kromě toho, že jsou silnými inhibitory množení tohoto parazita, také u hlodavců obnovují strach ze zápachu kočičí moči, o který přišli po nákaze. Díky nízké hladině serotoninu, který je s tryptofanem v mozku nakažených odbouráván rychleji, bylo prokázáno vyšší riziko sebevražd. Uvažuje se i o možnosti, že toxoplazma ovlivňuje vznik migrény. (2,13)

## 8. LABORANTNÍ DIAGNOSTIKA

V případě tohoto onemocnění jsou možnosti laboratorní diagnostiky celkem rozsáhlé, nicméně žádná z metod není ideální, a proto musíme používat jejich různé kombinace a eliminovat tak nedostatky. U imunokompromitovaných pacientů zvláště pak u HIV pozitivních, není určení diagnózy jednoduché a je nutné zhodnocení všech klinických příznaků, laboratorních nálezů, faktorů podílejících se na výskytu toxoplazmózy a epidemiologických souvislostí. Hlavním cílem diagnostiky je potvrzení o tom, jestli pacient je nebo není nakažen a také v jaké fázi infekce se nachází. (10,12,16)

Toxoplazmózu můžeme stanovit několika metodami a to přímým i nepřímým průkazem zahrnujícím sérologické metody, které jsou v běžné praxi u imunokompetentních pacientů základem pro diagnostiku toxoplazmózy. (7)

### 8.1 Přímý průkaz

*T.gondii* můžeme stanovit přímým průkazem a to mikroskopicky z histologických preparátů, izolačním pokusem na zvířeti a pomocí Polymerázové řetězové reakce (dále jen PCR), přičemž stanovujeme přímo infekční agens v biologickém materiálu. Využití přímého průkazu je však omezené z důvodu komplikovaného odběru tkání. (6,7,11,12)

#### 8.1.1 Přímý mikroskopický průkaz

Metoda, která je využívána jak *in vivo* tak *post mortem*. Využívají se histologické preparáty barvené Giemsou, hematoxylinem-eosinem nebo imunoperoxidázovým barvením, které jsou vyhotovené z mizních uzlin, tonzil, kosterního svalstva, potracených plodů, placenty, punktátů, kostní dřeně i tělních tekutin jako je likvor, komorová voda, plodová voda, subretinální tekutina.(7) Histologické metody slouží pro průkaz tachyzoitů ve zmíněných orgánech nebo tekutinách při akutní infekci a k diagnostice uzlinových forem.

Největší význam má pro diagnostiku toxoplasmové myokarditidy a pneumonie. (16) V periferní krvi se parazit vyskytuje jen vzácně a moč ani stolice nemají pro diagnózu význam. V případě posmrtné diagnostiky, kdy se

jednalo o akutní smrtelnou infekci, lze parazita nalézt v míše, mozku, játrech, slezině, ve stěně střev, kosterním svalu a myokardu. (9,12)

Méně významnou metodou přímého průkazu je vyšetření likvoru a to z důvodu, že lumbální punkce může být riskantní a metoda má nízkou senzitivitu. V základním vyšetření likvoru bývá nespecifický nález zvýšených bílkovin nebo mírná lymfocytární pleocytóza, ale může být i zcela normální. *T.gondii* je intracelulární parazit vyskytující se ve tkáních CNS, ale v likvoru jen výjimečně, a proto, může být výsledek falešně negativní. Z tohoto důvodu nepatří vyšetření likvoru ke standardním postupům při podezření na mozkovou toxoplazmózu. (12,16)

### **8.1.2 Isolační pokus na laboratorní myši**

Pokus můžeme provést z bioticky odebrané tkáně za sterilních podmínek. *T. gondii* za laboratorních podmínek nelze pěstovat na umělých půdách, můžeme využít pouze laboratorní hlodavce, tkáňové kultury nebo kuřecí embrya.

Cílem tohoto pokusu je pomnožení parazitů do takové míry, aby byli zjistitelné mikroskopicky. Odebraný materiál se ihned posílá do laboratoře, popřípadě se může skladovat při 4°C, ale nesmí se zmrazit. Odebrané fragmenty orgánů nebo tělní tekutiny se zpracují tak, aby bylo možné je vstříknout do břišní dutiny myši. V případě, že v tomto materiálu je přítomný virulentní kmen parazita, nakažené myši do 14 dnů zahynou. Trofozoity pak můžeme prokázat mikroskopicky v otiscích orgánů nebo v peritoneálním exsudátu mrtvých myší. Myši, které jsou nakažené cystogenním kmenem tvoří protilátky a ty prokazujeme pomocí sérologických metod. (9)

### **8.1.3 Polymerázová řetězová reakce**

Jedná se o vysoce specifickou, senzitivní a rychlou metodu pro přímý průkaz nukleové kyseliny *T.gondii* pomocí PCR. Využívá se biologický materiál, který se nesmí zmrazit a je to bronchoalveolární laváž, plná nesrážlivá krev, likvor, komorová voda, kostní dřeň a další. (7) Postup reakce zahrnuje izolaci DNA pomocí komerčně dodávaných kitů, následnou amplifikaci cílové sekvence a detekci.

V případě konvenční PCR se pro detekci produktu využívá elektroforéza s agarózovým gelem zatímco real-time PCR využívá fluorescenci. Nevýhodou PCR je senzitivita, protože záleží na typu odebraného materiálu. Nevhodným biologickým materiálem je likvor, jelikož *T. gondii* se v něm nachází jen vzácně. (16) Metoda je optimální v případě diagnostiky obtížných případů jako je generalizovaná forma infekce nebo případy s izolovanou extraneurální manifestací. (10,11,12,)

## 8.2 Nepřímý průkaz

Nepřímý průkaz zahrnuje hlavně sérologické metody založené na reakci antigenu s protilátkou. (6)

U imunokompetentních pacientů a gravidních žen jsou sérologické metody základ pro diagnostiku toxoplazmózy, naopak u imunodeficitních pacientů mají testy senzitivitu jen omezenou, a proto se ke stanovení diagnózy využívají hlavně metody přímého průkazu. Pro určení definitivní diagnózy často nestačí jen průkaz protilátek a stanovení jejich množství. Proto je důležité, určit také v jaké fázi infekce se pacient nachází, což nám prozradí jednotlivé třídy imunoglobulinů, které se snižují, zvyšují nebo mají hodnoty stabilní v závislosti na fázi infekce. (16,17,21)

Strmý vzestup protilátek třídy IgA, IgM a současně pozvolný vzestup IgG je charakteristický pro primární infekci v akutní fázi. Zatímco IgA a IgM pomalu klesají, titry IgG po odeznění akutní fáze zůstávají zvýšené. V tomto případě se jedná o chronickou fázi infekce neboli odeznívající toxoplazmózu. Pro latentní toxoplazmózu je typická absence IgM a IgA, protilátky IgG v nízkých titrech přetrvávají celý život. Často se ale stává, že se nepodaří diagnózu určit z jednoho vzorku séra a proto je doporučen opakovaný odběr po 2-3 týdnech.(22)

V rámci České Republiky jsou v praxi nejvíce využívány metody: komplement fixační reakce, ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) metody s výhodami snadné proveditelnosti i hodnocení a také možnosti stanovení tříd toxoplazmových protilátek, dále nepřímé imunofluorescenční reakce (NIFR) a detekce IgG, které slouží ke stanovení specifických celkových protilátek. (12,16) Mezi další testy, které v ČR nejsou rutinně zavedeny, patří kožní test s toxoplazminem (IDT) sloužící jako orientační vyšetření a běžně

už se nevyužívá, Sabin-Feldmanův test barvitelnosti, dále nepřímá hemaglutinační reakce, přímá aglutinace, imunofluorescenční test, mikroprecipitace - MPA, intradermální test, atd (6,7,15)

### **8.2.1 Komplement fixační reakce**

Jedná se o základní metodu používanou v české republice a stanovují se tak celkové protilátky. Podstatou této metody je vazba komplementu na komplex antigen – protilátka.

Po vazbě protilátky na příslušný antigen vzniká imunokomplex, na který se váže komplement ve formě morčecího séra. Pokud se komplement v předchozí fázi nespoteřebuje, dále reaguje s indikátorem složeným z ovčích erytrocytů s navázanou králičí protilátkou neboli amboceptorem. Pokud dojde k vazbě komplementu na imunokomplex, tak erytrocyty zůstanou bez změny a jedná se o pozitivní nález. V případě, že se na erytrocyty komplement naváže, dojde k hemolýze a my ji hodnotíme jako negativní nález.

Mezi výhody metody lze uvést nízkou cenu, stabilitu výsledků ale i možnost vyloučení nespecificky pozitivních výsledků, které jsou získané ELISA testy. Naopak nevýhodou reakce je nemožnost rozlišit jednotlivé třídy protilátek. (9,12,22)

### **8.2.2 ELISA**

ELISA je imunochemická metoda s vysokou citlivostí, využívající enzym ke značení antigenu nebo v tomto případě protilátky. Slouží ke kvantifikaci velmi nízkých koncentrací protilátek. Reakce mezi navázaným enzymem a substrátem se znázorní vznikem barevného produktu. Detekce substrátu je fotometrická.

Existuje několik modifikací této metody jako např. přímá či nepřímá sendvičová a nekompetitivní ELISA.

Výhoda metody je možnost automatizace a mezi nevýhody patří vysoké náklady na přístrojové vybavení a drahé komerční soupravy. (7,16,17)

### 8.2.3 Test IgG avidity

Test je určen ke kvantitativnímu stanovení avidity (tj. souhrnná pevnost vazby daných protilátek na příslušné antigenní determinanty) protilátek IgG proti *T. gondii* a vypovídá tedy o stáří IgG, čímž umožňuje přesnější určení fáze nákazy. Je založen na tom, že avidita antitoxoplasmických protilátek IgG je nejprve nízká a stoupá až během prvních 4 měsíců nemoci. Využívá se k rozlišení infekce počáteční nebo déle trvající. Největší význam má toto stanovení u gravidních žen, protože je důležité co nejpřesněji stanovit dobu primoinfekce. (10,16,17)

### 8.2.4 Western Blot

Metoda upřesnění diagnostiku kongenitální toxoplazmózy a porovnává profil protilátek z odlišných materiálů např. tak, že se vyšetřují séra matky a plodu či novorozence. Na antigenu *T. gondii*, který je elektroforeticky rozložen se srovnává reaktivita protilátek IgG nebo IgM na jednotlivých antigenních determinantách. (17) Pozitivním nálezem jsou protilátky v séru novorozence proti odlišným epitopům parazita v porovnání s matkou. (10)

### 8.2.5 Sabin-Feldmanův test barvitelnosti

Test barvitelnosti je založen na tom, že ke směsi složené z parazitů a inaktivovaného testovaného séra se přidá barvivo a vzniklé změny se hodnotí mikroskopicky. Vliv protilátek způsobuje změnu cytoplasmy a barvitelnosti parazitů alkalickou methylenovou modří.

V současné době již není v ČR rutinně zaveden a provádí se jen ve specializovaných laboratořích, nicméně je známí jako referenční metoda. (9,15)

## 8.3 Zobrazovací metody

Jsou doplňující metody, které se neřadí do přímého ani nepřímého průkazu.

Pomocí počítačové tomografie (CT) a magnetické resonance (MRI) můžeme odhalit mnohočetné hypodenzní léze v mozku a proto má tato metoda význam hlavně pro diagnostiku mozkové toxoplazmózy, ale také pro fetální



infekci. U rizikových pacientů s fokálním neurologickým nálezem by se mělo toto vyšetření provádět neodkladně. (12) Pro diagnostiku plicní formy se využívá také rentgen a ultrazvukem se prokazují fetální infekce, myokarditis a perikarditis. (17)

## 9. TERAPIE

V minulosti byly pro léčbu toxoplazmózy běžné pokusy na zvířatech a účinnost jednotlivých léčiv se posuzovala podle přežívání experimentálně nakažených laboratorních myší. Pacient se považoval za vyléčený v případě, že z jeho tkání se po léčbě nepodařilo parazita zpětně izolovat. (9)

V současné době jsou nejčastěji doporučována léčiva jako je pyrimethamin, sulfadiazin a spiramycin podávané v různé kombinaci. Mezi další používané chemoterapeutika a antibiotika se řadí kotrimoxazol, dapson, klindamycin a klarithromycin. Atovakvon je jediný účinný lék na cystické formy. (7,15)

Terapeutická schémata mezi kontinenty i v jednotlivých zemích se mohou odlišovat, nicméně jsou velice podobná. Léčba je závislá na prevalenci toxoplazmózy v regionech, na úrovni zdravotní péče a na aktuální epidemiologické incidenci.

Protože neléčená nebo špatně léčená toxoplazmóza u imunodeficitního pacienta je vždy smrtelná, musí být léčba zahájena co nejdříve a musí trvat dostatečně dlouho dobu. Cílem podávání léků jsou především prevence kongenitálních nákaz u těhotných, léčba infikovaného novorozence, léčba získaných klinických forem a chemoprolaxe neurotoxoplazmózy u pacientů s AIDS nebo jinak imunosuprimovaných. (10,12)

V případě, že u pacienta nedojde k obnovení imunitních funkcí, je nutné pokračovat v sekundární profylaxi formou dlouhodobé udržovací chemoterapie. Riziko návratu nemoci po léčbě do jednoho roku se pohybuje v rozmezí 60-80%. Pokud pacient dokončí počáteční protitoxoplazmovou léčbu, počet jejich CD4+ lymfocytů dlouhodobě vzroste a nemají žádné laboratorní ani klinické příznaky infekce, sekundární profylaxe může být ukončena. (12)

Pyrimethamin je v současnosti nejúčinnějším dostupným chemoterapeutikem, dobře pronikajícím do CNS. Je-li to možné, měl by se použít jako základní složka pro útočnou i udržovací léčbu. Nežádoucím účinkem Pyrimethaminu je hematotoxicita. Především jde o úbytek erytrocytů, trombocytů a lymfocytů. Způsobené změny v krevním obraze jsou reverzibilní. Pro zmírnění nežádoucích účinků se pacientům současně podávají preparáty kyseliny listové.

Klindamycin se používá hlavně při léčbě oční formy toxoplazmózy, protože efektivně proniká do tkáně oka. Doporučuje se i k alternativní léčbě neurotoxoplazmózy u pacienta s alergií na sulfonamid.

Sulfadiazin se využívá pro účinnou léčbu mozkové toxoplazmózy v kombinaci s pyrimetaminem. V současné době není v ČR běžně dostupný.  
(7,9,12)

# PRAKTICKÁ ČÁST

## 10. METODIKA STANOVENÍ

### 10.1 Biologický materiál

Ke stanovení protilátek *T. Gondii* pomocí metody Komplement fixační reakce (dále jen KFR) a ELISA se používá sérum pacienta, tedy srážlivá krev. Bakteriálně kontaminované, hemolytické nebo chylózní vzorky včetně antikoagulant obsažených v plazmě (s výjimkou citrátu) mohou ovlivnit výsledek testu. Vyšetřované vzorky je možno uchovávat při +2°C až +8°C maximálně 1 týden. Při delším skladování se vzorky mrazí na -20°C. Naředěné vzorky je nutno vyšetřit co nejdříve. Materiál se považuje za potencionálně infekční, proto se musí dodržovat hygienická opatření během práce.

### 10.2 Stanovení protilátek *T. gondii* pomocí komplement fixační reakce

#### 10.2.1 Princip testu KFR

KFR od firmy TestLine je reakce založená na vazbě komplementu v reakční směsi na specifické komplexy antigenu s protilátkou. Testem jsou prokazovány protilátky všech imunoglobulinových tříd (nelze samostatně prokázat např. IgM). Obecně se doporučuje tzv. chladová modifikace KFR, která je citlivější než alternativní teplá modifikace.

#### 10.2.2 Složení soupravy a příprava roztoků

**Toxoplasma komplementfixační antigen** je lyofilizovaný purifikovaný antigen prvoka *T. gondii*. Kultivovaný v buněčné kultuře HeLa. Připraví se rozpuštěním v 1,0 ml, 0,5 ml nebo 0,2 ml destilované vody a po té se naředí barbitalovým pufrům.

**Barbitalový pufr pro KFR** 5x koncentrovaný, ředí se 1:5 destilovanou vodou (1 díl Barbitalového pufru + 5 díly destilované vody)

**Berání erythrocyty, konzervované v Alseverově roztoku.** Ty se 3 krát promyjí v barbitalovém pufru a centrifugují 2 x 2000 rpm/10 minut a 1 x 2000 rpm/15 minut. Musí se připravit 3% berání erythrocyty a to tak, že se nepipetuje 30 µl beraních erythrocytů do 1,0 ml barbitalového pufru.

**CF-AMBOCEPTOR** je lyofilizát, připraví se přidáním 1,0 nebo 0,5 ml destilované vody. Rozpuštěný amboceptor se přelije do lahvičky a tak se předředí v poměru 1:100. Předředěný amboceptor se naředí barbitalovým pufrem.

**KF-COMPLEMENT** se rozpustí v 1 ml destilované vody a poté se naředí barbitalovým pufrem.

**TOXO-CF-Positive Control lyophil.** Je to lidské sérum obsahující protilátky proti *T. gondii*. Lyofilizát se rekonstituuje v 0,25 ml destilované vody. Inaktivace byla provedena u výrobce.

**TOXO-CF-Negative Control lyophil.** Je to lidské sérum, které neobsahuje protilátky proti *T. gondii*. Připraví se rozpuštěním v 0,25 ml destilované vody. Inaktivace byla provedena výrobcem.

**Hemolytický systém** – připraví se smícháním stejných objemů 3% suspenze beraních erytrocytů a pracovního ředění amboceptoru. Senzibilizují se po dobu 30 minut při 37°C na vodní lázni nebo termostatu.

### 10.2.3 Pracovní postup

Do reakce zařazujeme při každém provedení negativní a pozitivní sérum o známém titru. Kromě toho je prováděna kontrola antigenu, komplementu a hemolytického systému, a to vždy ve dvou jamkách. Ředí se přímo v jamkách, množství je uvedeno pro jednu jamku.

- Kontrola antigenu:  
25 µl barbitalového pufru + 25 µl antigenu + 50 µl komplementu (ředěný vzorek nahrazen barbitalovým pufrem).
- Kontrola komplementu:  
50 µl barbitalového pufru + 50 µl komplementu (antigen nahrazen barbitalovým pufrem).
- Kontrola hemolytického systému:  
100 µl barbitalového pufru (antigen + komplement nahrazeny barbitalovým pufrem).
- U každého séra se v jedné jamce ověřuje antikomplementarita.

KFR se zpravidla provádí ve dvou po sobě následujících dnech.

### 1. den

- 1) Proveďte se inaktivace sér pacientů ve vodní lázni 56°C/ 30 minut.
- 2) Na destičku se rozvrhne a vyznačí rozmístění kontrol a vzorků. Na destičku se rozepíší hodnoty titrů až do 1:4096.
- 3) Do jamek vyznačených pro kontrolu antigenu, komplementu a hemolytického systému se pipetuje příslušné množství antigenu, komplementu a barbitalového pufru.
- 4) Do všech jamek destičky je napipetováno 25 µl barbitalového pufru v pracovním ředění, kromě kontroly antigenu, komplementu a hemolytického systému.
- 5) Do vyznačených jamek v titru 1:2 se nepipetuje 25 µl kontrolních sér.
- 6) Dále se nepipetuje 25 µl vyšetřovaných vzorků sér do vyznačených jamek a získá se tím ředění 1:2.
- 7) Obsah každé jamky s vyšetřovacím sérem se důkladně promíchá a po té se přenesou 25 µl takto naředěného séra ze sloupce 1 do sloupce 2. Tímto tahem je dosaženo ředění 1:4, analogicky se pokračuje dál až do posledního sloupce. Z jamek v posledním sloupci se odstraní 25 µl roztoku.
- 8) Do všech jamek destičky kromě prvního sloupce, kde jsou séra ředěná v titru 1:2, který slouží jako kontrola antikomplementarity, pipetujeme 25 µl antigenu v pracovním ředění.
- 9) Do prvního sloupce, kde jsou séra ředěná 1:2, se doplní 25 µl barbitalového pufru v pracovním ředění, čímž se celkový objem všech jamek destičky doplní na 50 µl.
- 10) Do všech jamek destičky, kromě kontroly antigenu, komplementu a hemolytického systému, pipetujeme 50 µl vychlazeného (+2°C až +8°C) komplementu v pracovním ředění.
- 11) Důkladně se promíchá obsah jamek pomocí třepačky 10 minut.
- 12) Po té se inkubuje 18 hodin při +2°C až +8°C ve vlhké komůrce.

### 2. den

- 1) Připravíme hemolytický systém smícháním 3% suspenze beraních krvinek se stejným objemem amboceptoru v pracovním ředění (vždy

přidáváme hemolyzin do krvinek). Senzibilizujeme ve vodní lázni při 37°C po dobu 30 minut, každých 10 minut lehce promícháme.

- 2) Do všech jamek nadávkuje 25µl hemolytického systému a promícháme na třepačce.
- 3) Inkubujeme ve vlhčeném termostatu při 37°C po dobu 30 minut.
- 4) Po inkubaci důkladně protřepeme na třepačce 10 minut.
- 5) Inkubujeme ve vlhčeném termostatu při 37°C po dobu 30 minut.
- 6) Inkubujeme 2 hodiny při teplotě +2°C až +8 °C ve vlhké komůrce.
- 7) Po úplné sedimentaci krvinek odečteme výsledek.

#### 10.2.4 Hodnocení výsledků

Po proběhnutí reakce hodnotíme hemolýzu či sedimentaci beraních erytrocytů v jamkách s ředěnými vzorky.

**Pozitivní reakce** = beraní krvinek nezlyzovaly, ale sedimentovaly a nahromadily se na dně jamky, kde vytvořily knoflíkovitý útvar. Ve vzorku jsou v příslušném ředění přítomny protilátky proti *T. gondii* v detekovatelné hladině.

**Negativní reakce** = celý obsah jamky má rovnoměrně červenavou barvu, na dně jamky není knoflíkovitý sediment. Ve vzorku nejsou v příslušném ředění přítomny protilátky proti *T. gondii* v detekovatelné hladině.

Jako titer protilátek proti *T. gondii* se uvádí nejvyšší ředění vzorku, při kterém je KFR pozitivní.

#### Interpretace výsledků

Za pozitivní se považují séra s titrem KFR větším nebo rovným 1:8, detekované protilátky svědčí pro infekci pacienta *T. gondii*.

Za hraniční se považují séra s titrem rovným 1:4. Sérokonvence, tj. negativní výsledek v prvním a pozitivní v druhém vzorku séra stejného pacienta indikujeme primární infekci, stejný titer nebo pokles titru svědčí pro pozdější fázi infekce. Čtyřnásobný a vyšší vzestup titru protilátek svědčí pro akutní nákazu.

Titr KFR 1:64 a vyšší může indikovat akutní toxoplazmózu a vzorek je třeba vyšetřit konfirmačními testy, jako např. EIA Toxoplasma IgM, případně EIA Toxoplasma IgE, EIA Toxoplasma IgA a stanovení avidity antitoxoplasmických IgG. (28)

## 10.3 Stanovení protilátek *T. gondii* metodou ELISA

### 10.3.1 DSX automatický ELISA systém

DSX je automatický otevřený ELISA systém pro všechny diagnostické soupravy na mikrotitračních destičkách. Rozdělení a ředění vzorku je prováděno jednorázovými špičkami, tím je zabezpečený nulový přenos a kontaminace vzorku. Analyzátor obsahuje čtyři inkubátory, u kterých lze nastavit čtyři různé inkubační teploty. Systém dokáže zpracovat v jedné dávce čtyři mikrotitrační destičky a na každé mikrotitrační destičce může být až 12 vyšetření. Analyzátor je vybavený čtečkou na čárové kódy a zabezpečuje tak jednoznačnou identifikaci vzorku.

### 10.3.2 Princip EIA Toxoplasma IgG

Souprava umožňuje detekci specifických protilátek IgG ve vzorku metodou EIA, typ sandwich (tj. pevná fáze s navázaným specifickým antigenem – protilátka z vyšetřovaného vzorku – značená protilátka). Značená protilátka (konjugát) je zvířecí imunoglobulinová frakce proti lidskému IgG konjugovaná peroxidázou. Peroxidázová aktivita se stanovuje pomocí substrátu s TMB, který zmodrá v případě positivity. Celá reakce je ukončena zastavovacím roztokem. Dojde ke změně modrého zbarvení na žluté. Intenzita žlutého zbarvení se měří na fotometru (při vlnové délce 450 nm) a je úměrná koncentraci specifických IgG protilátek přítomných ve vzorku.

#### 10.3.2.1 Složení soupravy

- Potažená destička s navázaným antigenem, 12 x 8 jamek. Použitý antigen je purifikovaný a inaktivovaný antigen *T. gondii* (RH kmen).
- Negativní kontrola (Kalibrátor 1) neobsahující specifické lidské protilátky.
- CUT-OFF (Kalibrátor 2) je roztok, který obsahuje specifické lidské protilátky v hraniční koncentraci.
- Pozitivní kontrola (Kalibrátor 3), roztok, který obsahuje specifické lidské protilátky.
- Kalibrátor 4 obsahuje specifické lidské protilátky
- Konjugát je roztok, který obsahuje zvířecí imunoglobulin proti lidskému IgG značený peroxidázou.



- Ředící roztok vzorků 3 je pufr se stabilizátory bílkovin.
- TMB-Complete 2 je jednosložkový substrátový roztok obsahující TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Promývací roztok je 20krát koncentrovaný pufr.
- Zastavovací roztok obsahuje kyselinu.
- Aviditní roztok 3 je stabilizovaný roztok močoviny

### 10.3.2.2 Pracovní postup

Vzorky pacientů se vyšetřují metodou ELISA pomocí automatického přístroje DSX.

- 1) Ředění vzorků, séra/ plazmy 1:101 (10 µl + 1 ml)
- 2) Dávkování kontrol a ředěných vzorků 100 µl, blank prázdná jamka
- 3) Inkubace 60 minut při 37°C
- 4) Odsátí a promytí jamek 5 krát
- 5) Dávkování konjugátu 100 µl, blank = prázdná jamka
- 6) Inkubace 60 minut při 37°C
- 7) Odsátí a promytí jamek 5 krát
- 8) Dávkování substrátu (TMB-Complete) 100 µl, včetně blanku
- 9) Inkubace 20 minut při 37°C
- 10) Dávkování zastavovacího roztoku 100 µl, včetně blanku
- 11) Fotometrické měření při vlnové délce 450 nm

### 10.3.2.3 Hodnocení výsledků v mezinárodních jednotkách

Hladina protilátek (IU/ml)	menší než 5,4	negativní
	5,4 až 6,6	hraniční
	větší než 6,6	pozitivní

Vyšetření hraničních vzorků je zapotřebí opakovat z nového odběru za 2 až 6 týdnů s ohledem na specifika daného onemocnění. (27)

### 10.3.3 Princip EIA Toxoplasma IgM

Souprava umožňuje detekci specifických protilátek proti *T. gondii* třídy IgM ve vzorku metodou EIA, typ capture (tj. pevná fáze s navázanou zvířecí protilátkou proti lidským imunoglobulinům třídy IgM – protilátka z vyšetřovaného vzorku- tracer, tj. specifický antigen se značenou protilátkou). Značená protilátka je myší monoklonální protilátka proti povrchovému proteinu p30 *T. gondii* konjugovaná křenovou peroxidázou. Peroxidázová aktivita se stanovuje pomocí substrátu s TMB, který zmodrá v případě positivity. Celá reakce je ukončena zastavovacím roztokem. Dojde ke změně modrého zbarvení na žluté. Intenzita žlutého zbarvení se měří na fotometru (při vlnové délce 450 nm) a je úměrná koncentraci specifických protilátek přítomných ve vzorku.

#### 10.3.3.1 Složení soupravy

- Potažená destička s navázaným antigenem, 12 x 8 jamek. Použitý antigen je purifikovaný a inaktivovaný antigen *T. gondii* (RH kmen).
- Negativní kontrola neobsahuje specifické lidské protilátky.
- CUT-OFF je roztok, který obsahuje specifické lidské protilátky v hraniční koncentraci.
- Pozitivní kontrola je roztok, který obsahuje specifické lidské protilátky.
- Tracer, lyofilizát obsahující antigen *T. gondii* a konjugát.
- Ředící roztok vzorků 3 je pufr se stabilizátory bílkovin.
- TMB-Complete 2 je jednosložkový substrátový roztok obsahující TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Promývací roztok je 20krát koncentrovaný pufr.
- Zastavovací roztok obsahuje kyselinu.

#### 10.3.3.2 Pracovní postup

Vzorky pacientů se vyšetřují metodou ELISA pomocí automatického přístroje DSX.

- 1) Ředění vzorků, séra/ plazmy 1:101 (10 µl + 1 ml)
- 2) Dávkování kontrol a ředěných vzorků 100 µl, blank prázdná jamka

- 3) Inkubace 60 minut při 37°C
- 4) Odsátí a promytí jamek 5 krát
- 5) Dávkování Traceru 100 µl, blank = prázdná jamka
- 6) Inkubace 60 minut při 37°C
- 7) Odsátí a promytí jamek 5 krát
- 8) Dávkování substrátu (TMB-Complete) 100 µl, včetně blanku
- 9) Inkubace 20 minut při 37°C
- 10) Dávkování zastavovacího roztoku 100 µl, včetně blanku
- 11) Fotometrické měření při 450 nm

### 10.3.3.3 Hodnocení výsledků vyšetření dle indexu positivity

Index positivity (IP)	menší než 0,9	negativní
	0,9 až 1,1	hraniční
	Větší než 1,1	pozitivní

Vyšetření hraničních vzorků, tj. s indexem positivity 0,9 až 1,1 je zapotřebí opakovat z nového odběru za 2 až 6 týdnů s ohledem na specifika daného onemocnění. (25)

### 10.3.4 Princip EIA Toxoplasma IgA

Souprava umožňuje detekci specifických protilátek proti *T. gondii* třídy IgA ve vzorku metodou EIA, typ capture (tj. pevná fáze s navázanou zvířecí protilátkou proti lidským imunoglobulinům třídy IgA – protilátka z vyšetřovaného vzorku- tracer, tj. specifický antigen se značenou protilátkou). Značená protilátka je myší monoklonální protilátka proti povrchovému proteinu p30 *T. gondii* konjugovaná křenovou peroxidázou. Peroxidázová aktivita se stanovuje pomocí substrátu s TMB, který zmodrá v případě positivity. Celá reakce je ukončena zastavovacím roztokem. Dojde ke změně modrého zbarvení na žluté. Intenzita žlutého zbarvení se měří na fotometru (při vlnové délce 450 nm) a je úměrná koncentraci specifických protilátek přítomných ve vzorku.

#### 10.3.4.1 Složení soupravy

- Potažená destička s navázaným antigenem, 12 x 8 jamek. Použitý antigen je purifikovaný a inaktivovaný antigen *T. gondii* (RH kmen).
- Negativní kontrola neobsahuje specifické lidské protilátky.
- CUT-OFF je roztok, který obsahuje specifické lidské protilátky v hraniční koncentraci.
- Pozitivní kontrola je roztok, který obsahuje specifické lidské protilátky.
- Tracer, lyofilizát obsahující antigen *T. gondii* a konjugát.
- Ředící roztok vzorků 3 je pufr se stabilizátory bílkovin.
- TMB-Complete 2 je jednosložkový substrátový roztok obsahující TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Promývací roztok je 20krát koncentrovaný pufr.
- Zastavovací roztok obsahuje kyselinu.

#### 10.3.4.2 Pracovní postup

Vzorky pacientů se vyšetřují metodou ELISA pomocí automatického přístroje DSX.

- 1) Ředění vzorků, séra/ plazmy 1:101 (10 µl + 1 ml)
- 2) Dávkování kontrol a ředěných vzorků 100 µl, blank prázdná jamka
- 3) Inkubace 60 minut při 37°C
- 4) Odsátí a promytí jamek 5 krát
- 5) Dávkování Traceru 100 µl, blank = prázdná jamka
- 6) Inkubace 60 minut při 37°C
- 7) Odsátí a promytí jamek 5 krát
- 8) Dávkování substrátu (TMB-Complete) 100 µl, včetně blanku
- 9) Inkubace 20 minut při 37°C
- 10) Dávkování zastavovacího roztoku 100 µl, včetně blanku
- 11) Fotometrické měření při 450 nm

### 10.3.4.3 Hodnocení výsledků vyšetření dle indexu positivity

Index positivity (IP)	menší než 0,9	negativní
	0,9 až 1,1	hraniční
	Větší než 1,1	pozitivní

Vyšetření hraničních vzorků, tj. s indexem positivity 0,9 až 1,1 je zapotřebí opakovat z nového odběru za 2 až 6 týdnů s ohledem na specifika daného onemocnění. (26)

# 11. ZPRACOVÁNÍ ZÍSKANÝCH DAT

## 11.1 Celkový přehled vyšetření

Z poskytovaných dat za rok 2016 vyplývá, že bylo ve FN Plzeň provedeno celkem 794 vyšetření na toxoplazmózu pomocí metod komplement fixační reakce a stanovení titru protilátek IgG, IgM a IgA ELISA testy. Z celkového počtu bylo vyšetření provedeno u 290 mužů a 504 u žen. V tomto grafu jsou zahrnuta všechna provedená vyšetření tzn. i ta vyšetření, která se u některých pacientů prováděla opakovaně.

**Graf č.1:** Celkový počet provedených vyšetření



zdroj: vlastní

Tento počet provedených vyšetření zahrnoval 730 vyšetřených lidí, 496 žen a 234 mužů.

**Graf č.2:** Celkový počet vyšetřených lidí



Zdroj: vlastní

## 11.2 Výsledky získané metodou KFR

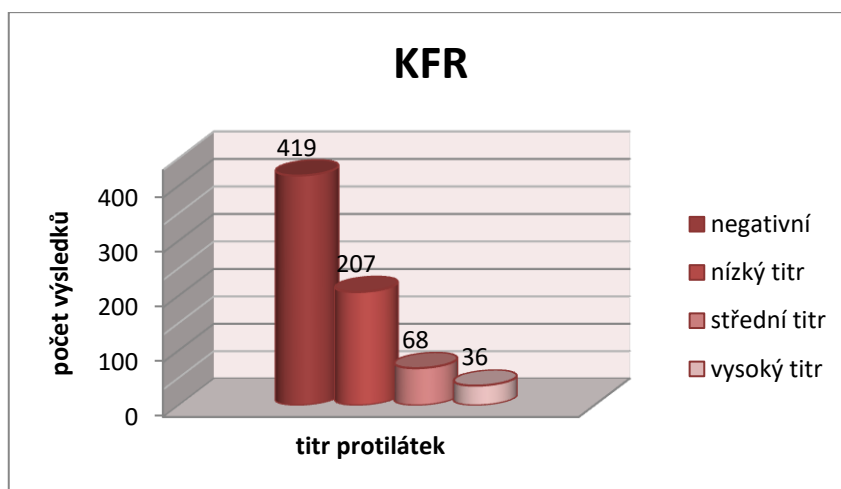
Z celkového počtu vyšetřených lidí (730) bylo v případě KFR negativních vzorků 419 a pozitivních 311 vzorků. Z 311 pozitivních bylo 207 vzorků s nízkým titrem, 68 vzorků s titrem středním a vysoký titr mělo 36 vzorků. U této metody se výsledek vyjadřuje pomocí titru tzn. v jakém nejvyšším ředění byly zjištěny protilátky ve vyšetřovaném séru. Nízký titr nám říká, že pacient před několika lety prodělal toxoplazmózu, střední titr protilátek informuje o tom, že pacient nemoc prodělal pravděpodobně před nedávnem. O probíhající akutní toxoplazmóze nás informuje vysoký titr protilátek. (18) Potvrzení nebo vyvrácení těchto teorií nám však přinese až vyšetření specifických imunoglobulinů.

**Tabulka č.1: Hodnoty titrů u metody KFR**

Přehled možných titrů u metody KFR	
Titř protilátek	Ředění
Nízký titř	1:8
	1:16
	1:32
Střední titř	1:64
	1:128
Vysoký titř	1:256 a více

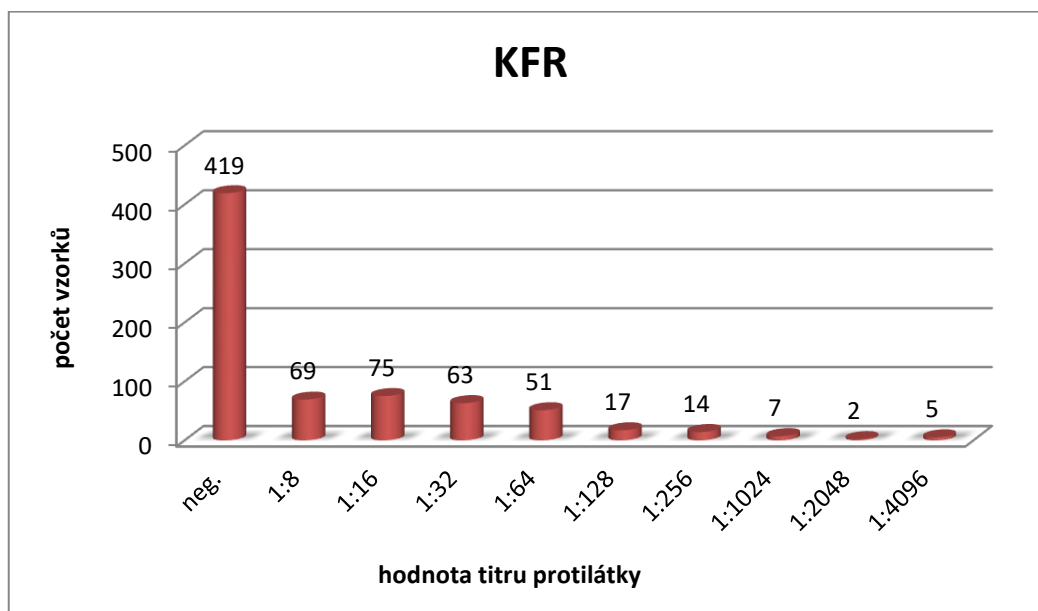
Zdroj: vlastní

**Graf č.3: Výsledky vyšetřeni KFR**



Zdroj: vlastní

**Graf č.4 :** Početní zastoupení jednotlivých títů u pozitivních vzorků u metody KFR

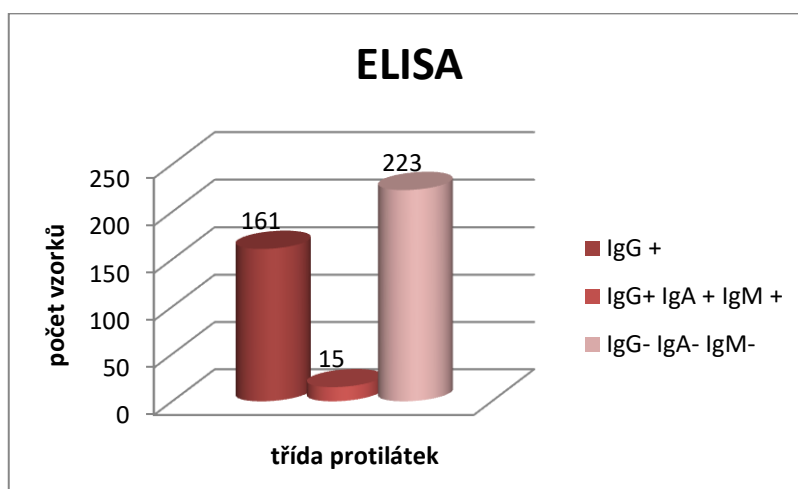


Zdroj: vlastní

### 11.3 Výsledky získané metodou ELISA

Ze 730 vyšetřených lidí bylo vyšetřeno 389 lidí ELISA metodou. Z těchto 389 pacientů mělo 223 negativní všechny tři třídy protilátek, 161 mělo pozitivní imunoglobuliny třídy IgG, všechny tři třídy imunoglobulinů mělo pozitivní pouze 15 lidí.

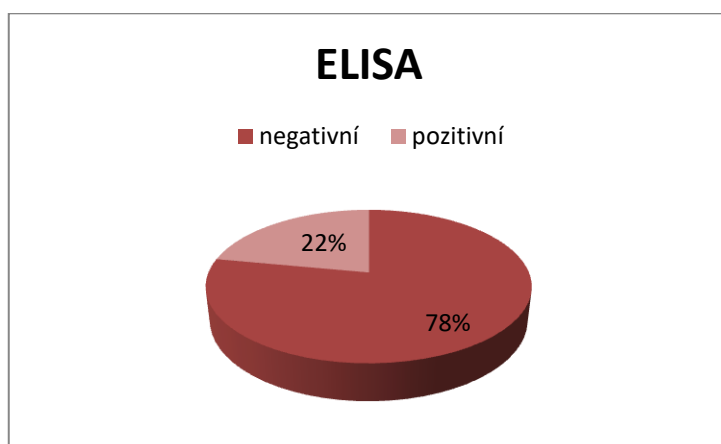
**Graf č.5:** Výsledky vyšetření specifických imunoglobulinů



Zdroj: vlastní



**Graf č.6:** Procentuální zastoupení pozitivních protilátek třídy IgG stanovených ELISA metodou

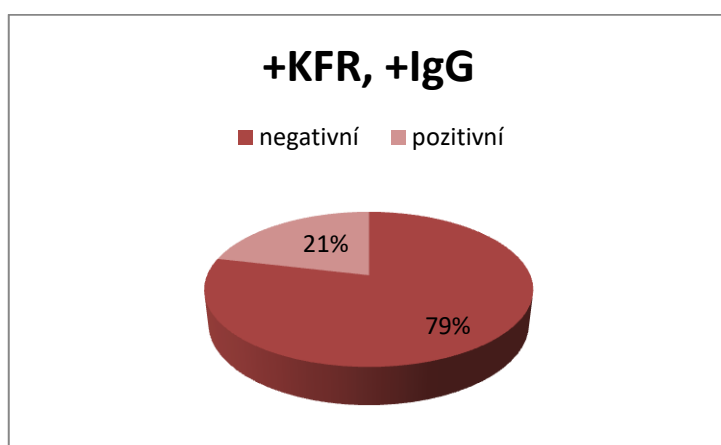


Zdroj: vlastní

#### 11.4 Skutečně pozitivní pacienti

V případě tohoto onemocnění se považují za pozitivní pacienti ti, kteří mají pozitivní výsledek u metody KFR i u stanovení protilátek třídy IgG ELISA metodou. Ze 730 vyšetřených pacientů bylo současně pozitivních 156, samostatně IgG pozitivních bylo 161 a KFR pozitivních 311.

**Graf č. 7:** Procentuální zastoupení pozitivních pacientů z celkového počtu vyšetřených

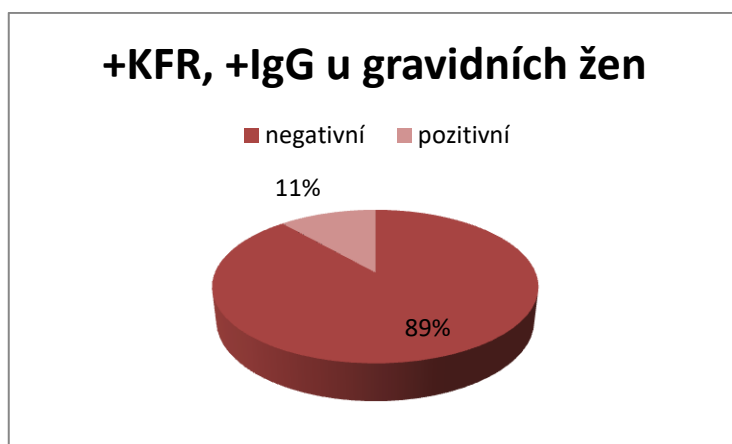


Zdroj: vlastní

## 11.5 Zpracování výsledků u gravidních žen

V roce 2016 bylo ve FN Plzeň vyšetřeno 87 zdravých gravidních žen. 56 žen mělo negativní výsledek u metody KFR i ELISA. Pozitivní výsledek u metody KFR mělo v různých titrech (nejčastější se vyskytoval titer protilátek 1:8 a 1:64, naopak nejméně bylo 1:128 a 1:256) 31 žen. 10 z nich mělo pozitivní i imunoglobuliny IgG. Žádná z žen neměla pozitivní všechny tři třídy protilátek.

**Graf č.8:** Procentuální zastoupení pozitivních gravidních žen

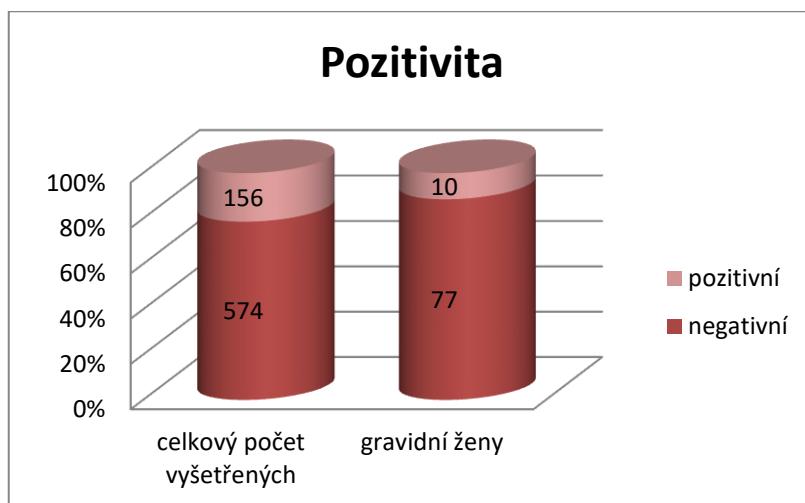


Zdroj: vlastní

## 11.6 Zhodnocení positivity u vyšetřovaných skupin pacientů

Z následujícího grafu můžeme vidět, že u vyšetřených zdravých gravidních žen je pozitivita toxoplazmových protilátek nižší než u celkového počtu vyšetřených lidí, ve kterém jsou zahrnuty tyto těhotné ženy, ale i tzv. nemocní s podezřením na toxoplazmózu. Vzhledem k tomu, že vyšetřované ženy byly zdravé, dala se nižší protilátková pozitivita předpokládat. S přihlédnutím na počet vyšetřených žen a počet všech vyšetřených nemocných není ale rozdíl 10% tak radikální jak se očekávalo a těhotné ženy by měly předcházet onemocněním dodržováním zásad správné hygieny a preventivních opatření.

**Graf č.9:** Porovnání pozitivitu u vyšetřených gravidních žen proti pozitivitě z celkového počtu vyšetřených lidí.

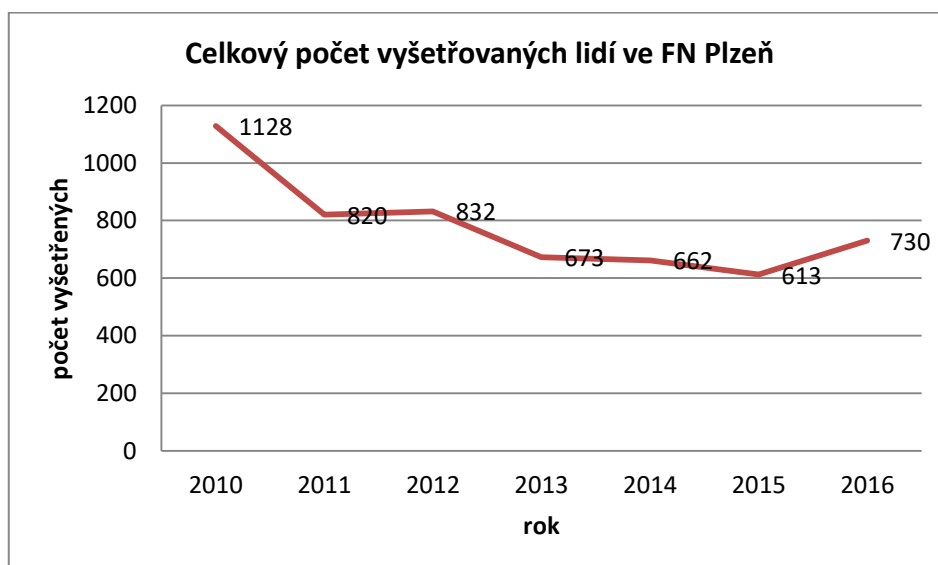


Zdroj: vlastní

### 11.7 Počty vyšetření ve FN v Plzni za posledních 6 let

Z poskytnutých dat je zřejmé, že množství lidí vyšetřovaných pro toxoplazmózu během let klesá.

**Graf č.10 :** Počet vyšetřených lidí ve FN Plzeň od roku 2010



Zdroj: vlastní

## 12. DISKUZE

Během roku 2016 bylo vyšetřeno 234 mužů a 496 žen. Pozitivních osob bylo 156 a negativních 574.

Díky většímu počtu rutině používaných metod, získáváme z populace různé hodnoty positivity. Dříve byla k dispozici převážně KFR a proto se také vycházelo především z výsledků této metody. Od roku 1996 se změnil používaný antigen v reakci a to je zřejmě jeden z důvodů, proč jsou hodnoty z této reakce vyšší než pozitivita u reakcí ELISA, které jsou citlivější. Ze sér vyšetřených pomocí KFR byla pozitivita u 311 osob, zatímco specifické imunoglobuliny IgG byly pozitivní u 161 osob. V současné době se jako nejvěrnější ukazatel positivity jeví jak pozitivita v IgG tak u KFR a ta byla zaznamenána u 156 vyšetřených osob. Tento výsledek je srovnatelný s obvyklými hodnotami pro ČR. Prevalence protilátek v tomto souboru je tedy 21 % pokud vezmeme v úvahu toto nejreálnější číslo.

V souboru vyšetřovaných převažují ženy. Hlavním důvodem této převahy je zřejmě vyšší zájem některých gynekologů o toto vyšetření u gravidních žen z toho důvodu, že v minulosti se provádělo rutinně.

Náš soubor pacientů se skládá ze skupiny nemocných lidí (tzn. ty, u kterých se projevují příznaky onemocnění a pomocí laboratorních testů se toxoplazmóza buď potvrdí, nebo vyloučí) a ze skupiny žen vyšetřovaných v rámci tzv. prenatalního screeningu. Tyto ženy nejsou nemocné, ale zjišťujeme u nich stav protilátek v séru, aby byla včas zahájena léčba v případě positivity. Z 87 vyšetřených žen bylo v rámci KFR pozitivních 31 což je 32%. Abychom dostali prevalenci protilátek zdravé ženské populace, musíme srovnat vzorky, které jsou současně pozitivní v KFR i IgG. Takových vzorků bylo z 87 vyšetřených pouze 10 a to je 11%. Jen tato hodnota je srovnatelná s výsledky získanými v minulosti ze sérologických přehledů zdravých jedinců s přetrvávajícími protilátkami, které mají epidemiologický význam.

Pokles provedených vyšetření není jen záležitostí posledních pěti let. Dle sdělení pracovníků laboratoře tento trend započal v roce 2005, kdy převážně gynekologové přestali pravidelně vyšetřovat těhotné ženy.

## ZÁVĚR

Na přítomnost protilátek proti *T.gondii* bylo ve FN Plzeň v roce 2016 provedeno 794 vyšetření, zahrnující 730 vyšetřených osob. Z tohoto počtu bylo 234 mužů a 496 žen. Pomocí komplement fixační reakce, která je považovaná za základní, byla prokázána pozitivita u 311 osob a negativních bylo 419.

Další vyšetření jsou indikována na základě výsledků KFR a v laboratoři FN Plzeň se jedná převážně o detekci specifických imunoglobulinů IgG, IgM a IgA. Pokud máme v závěrečném hodnocení určit, zda se jedná o skutečnou pozitivitu vzorku, musíme brát v potaz shodu výsledků jednotlivých metod, protože žádná z těchto používaných metod není 100%. Pozitivní výsledky u metody KFR a současně IgG mělo 156 osob.

Z celkového počtu vyšetřených zastupují ženy 68%. Jedná se o zdravé, těhotné ženy i ty s podezřením na toxoplazmózu. Z těchto 87 zdravých vyšetřených žen bylo 31 pozitivních v rámci KFR. Tyto ženy mají vytvořené protilátky, které nemají protektivní charakter, ale riziko přenosu toxoplazmózy z matky na plod je minimální.

V posledních letech počet vyšetřených ubývá díky tomu, že gynekologové ustupují od screeningového vyšetření gravidních žen, nicméně to neznamená, že se snižuje počet pacientů s toxoplazmózou.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:

- 1) GOERING, Richard V., Hazel M. DOCKRELL, Mark A. ZUCKERMAN a Peter L. CHIODINI, JULÁK, Jaroslav (ed.). 2016. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání Praha: Stanislav Juhaňák - Triton. ISBN 978-80-7387-928-0.
- 2) KOŘISTEK, Kamil. 2015 *Parazitologie*. 1. vydání. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-4540-3.
- 3) SVOBODOVÁ, Vlasta, Miroslav SVOBODA a Eva VERNEROVÁ. 2013 *Klinická parazitologie psa a kočky*. 2. vyd. Brno: B-V-M. ISBN 978-80-905468-1-3.
- 4) LANGROVÁ, Iva. 2011. *Parazitologie*. 1. vyd. V Praze: Česká zemědělská univerzita. ISBN 978-80-213-2171-7.
- 5) RYŠAVÝ, Bohumil. 1989. *Základy parazitologie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. Učebnice pro vysoké školy. ISBN 80-04-20864-9.
- 6) JÍRA, Jindřich a Bohumír ROSICKÝ. 1983. *Imunodiagnostika a epidemiologie toxoplasmózy*. Praha: Academia.
- 7) JÍRA, Jindřich. c2009. *Lékařská protozoologie: protozoální nemoci*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-381-5.
- 8) TOMAN, Miroslav. 2009. *Veterinární imunologie*. 2., dopl. a aktualiz. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2464-5.
- 9) Jírovec Otto. 1977. *Parazitologie pro lékaře*. Praha: Avicenum, s. 367-394.
- 10) BOŠTÍKOVÁ Vanda, PRÁŠIL Petr, SALAVEC Miloslav, BOŠTÍK Pavel. 2016. Vybrané virové a bakteriální perinatálně přenosné infekce. 3. část, Toxoplazmóza. *Pediatric pro praxi*. Roč.17, č.2, s.77-79. ISSN 1213-0494.

- 11) GELENKY, Markéta. 2015. Toxoplazmóza aneb máme se bát parazitů?. *Zdravotnictví a medicína*. Roč.2015, č.4, s.55-56. ISSN:002564059.
- 12) MACHALA Ladislav, KODYM Petr, MALÝ Marek, et al. 2015. Toxoplazmóza u imunokompromitovaných pacientů. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. Roč.64, č.2, s.59-65. ISSN: 1210-7913.
- 13) VOLF, Petr a Petr HORÁK. 2007. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-008-9.
- 14) BEDNÁŘ, Marek, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA. 1994. *Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie*. Praha: Triton. ISBN 80-901521-4-7.
- 15) HUBÁLEK, Zdeněk a Ivo RUDOLF. 2014. *Mikrobiální zoonózy a sapronózy*. 3., dopl. vyd. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-7516-0
- 16) TOMKOVÁ, Jana, NOVOTNÝ, Dalibor, BEDNAŘÍKOVÁ, J., SCHNEIDERKA, Petr. 2008. Toxoplazmóza. *Klinická biochemie a metabolismus*. Roč. 16/37, č. 4, s. 232-236. ISSN: 1210-7921.
- 17) GELENEKY, Markéta. 2013. Toxoplazmóza - diagnostika a její specifika. *Labor aktuell*. Roč. 2013, č. 3, s. 12-15. ISSN: 1214-7672.
- 18) KODYM, Petr. 2013. EHK - 763 Sérologie toxoplasmózy. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*. Roč. 22, č. 3, s. 108-110. ISSN: 1804-8668.
- 19) MURRAY, Patrick, Ken ROSENTHAL a Michael PFALLER. 2013. *Medical microbiology. Seventh edition*. Philadelphia: Elsevier. ISBN 978-0-323-08692-9.
- 20) MACHALA, Ladislav, KODYM, Petr, ČERNÝ, Rudolf. 2005. Toxoplazmóza. *Interní medicína pro praxi*. Roč. 7, č. 3, s. 120-122. ISSN: 1212-7299.

- 21) PEREIA-BUEON, J., QUINTQNILLQ-GOZALO, A., PERÉZ-PERÉZ, V., ALVAREZ-GARCIA, G., COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., ORTEGA-MORA, M. 2004. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. *Veterinary Parasitology*. č.121:s.33-43
- 22) HEJNAR, Petr. 2001. Sérologická diagnostika chlamydiových infekcí a toxoplazmózy. *Interní medicína pro praxi*. Roč. 3, č. 7, s. 305-308. ISSN: 1212-7299.
- 23) HOŘEJŠÍ, Václav, Bartůňková Jiřina, Brdička Tomáš, Špišek Radek. 2013. *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-713-2.
- 24) VOTAVA, M. 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. vyd. Brno: Neptun. s. 305 – 307. ISBN 80-86850-00-5.
- 25) TESTLINE CLINICAL DIAGNOSTICS s.r.o., Laboratorní návod EIA Toxoplasma IgM, 2015. Dostupný na <http://www.testlinecd.cz/eia-toxoplasma-igg?d=34>
- 26) TESTLINE CLINICAL DIAGNOSTICS s.r.o., Laboratorní návod EIA Toxoplasma IgA, 2015. Dostupný na <http://www.testlinecd.cz/eia-toxoplasma-iga?d=34>
- 27) TESTLINE CLINICAL DIAGNOSTICS s.r.o., Laboratorní návod EIA Toxoplasma IgG, 2015. Dostupný na <http://www.testlinecd.cz/eia-toxoplasma-igg?d=34>
- 28) Interní dokument laboratoře FN Plzeň - Laboratorní návod na Komplement fixační reakci



## SEZNAM ZKRATEK

ČR – Česká Republika

FN – fakultní nemocnice

HIV - Human Immunodeficiency Virus = virus lidské imunitní nedostatečnosti

AIDS - Acquired Immune Deficiency Syndrome = syndrom získaného selhání imunity

CNS – centrální nervový systém

IL – interleukin

INF – interferon

TNF  $\alpha$  - tumor necrosis factor  $\alpha$  = faktor nádorové nekrózy  $\alpha$

Tc lymfocyty – cytotoxický T lymfocyt (cytotoxic T cell)

Th lymfocyty – pomocný T lymfocyt (helper T cell)

NK buňky – natural killer = přirozený zabíječ

CT – počítačová tomografie

Ig – imunoglobulin

GIT – trávicí trakt

DIC – diseminovaná intravaskulární koaguace

PCR – polymerázová řetězová reakce

ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

NIFR - nepřímé imunofluorescenční reakce

IDT - kožní test s toxoplazminem

MPA – mikroprecipitace

MRI - magnetická rezonance

DNA – deoxyribonukleová kyselina

$\mu\text{m}$  – mikrometr

## **SEZNAM TABULEK**

**Tabulka č.1:** Hodnoty titrů u metody KFR

46

## SEZNAM GRAFŮ

<b>Graf č.1:</b> Celkový počet provedených vyšetření	45
<b>Graf č.2:</b> Celkový počet vyšetřených lidí	45
<b>Graf č.3:</b> Výsledky vyšetření KFR	46
<b>Graf č.4:</b> Početní zastoupení jednotlivých titrů u metody KFR	47
<b>Graf č.5:</b> Výsledky vyšetření specifických imunoglobulinů	47
<b>Graf č.6:</b> Procentuální zastoupení pozitivních protilátek třídy IgG stanovených ELISA metodou	48
<b>Graf č.7:</b> Procentuální zastoupení pozitivních pacientů z celkového počtu vyšetřených	48
<b>Graf č.8:</b> Procentuální zastoupení pozitivních gravidních žen	49
<b>Graf č.9:</b> Porovnání positivity u vyšetřených gravidních žen proti pozitivitě z celkového počtu vyšetřených lidí	50
<b>Graf č.10:</b> Počet vyšetřených lidí ve FN Plzeň od roku 2010	50

## **SEZNAM PŘÍLOH**

**Příloha č.1:** Obrázek tachyzoitů

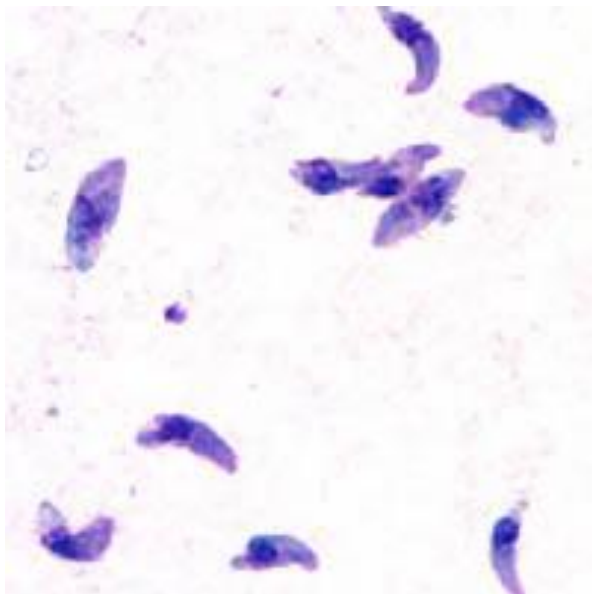
**Příloha č.2:** Obrázek vysporulované oocysty

**Příloha č.3:** Obrázek novorozence s hydrocefalem

**Příloha č.4:** Tvorba protilátek

## PŘÍLOHY

Příloha č.1: *Obrázek tachyzoitů*



Zdroj: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma\\_gondii](https://cs.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma_gondii)

Příloha č.2: *Obrázek vysporulované oocysty*



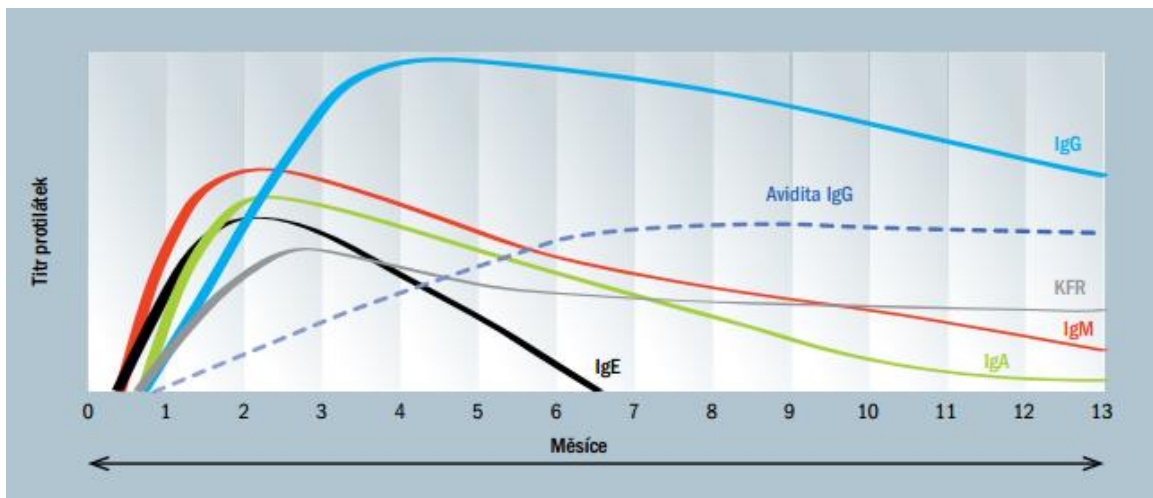
Zdroj: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma\\_gondii](https://cs.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma_gondii)

**Příloha č.3: Obrázek novorozence s hydrocefalem**



Zdroj: <http://www1.lf1.cuni.cz/~hrozs/zoopch1.htm>

**Příloha č.4: Tvorba protilátek**



Zdroj: [http://www.testlinecd.cz/file/108/Toxoplasma%20gondii\\_CZ.pdf](http://www.testlinecd.cz/file/108/Toxoplasma%20gondii_CZ.pdf)