



Zpravodaj

Centra klinických laboratoří

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

www.zuova.cz

2/2009/Ročník 5

Datum vydání 10.12.2009

Vážené kolegyně a kolegové,

děkuji Vám touto cestou za spolupráci v uplynulém roce.

Zároveň přeji Vám, Vaším blízkým a spolupracovníkům příjemné prožití svátků vánočních a úspěšný rok příští.

Pevně věřím, že naše spolupráce bude pokračovat k oboustranné spokojenosti.

My jsme pro Vaši spokojenost připraveni udělat maximum.

RNDr. Petr Hapala, ředitel Zdravotního ústavu

Rezistence *Streptococcus pyogenes* k makrolidovým a linkosamidovým antibiotikům v roce 2008 u kmenů izolovaných z výtěrů z krku

Pavčina Lysková, Jana Niemczyková

Laboratoř bakteriologie Havířov, Oddělení bakteriologie a mykologie, CKL

Streptococcus pyogenes je beta hemolytický streptokok a podle svého stěnového antigenu patří do skupiny A. *S. pyogenes* je původcem faryngitid, spály, infekcí kůže (pyoderma, erysipel), systémových infekcí, streptokokového šoku a poststreptokokových následků.

S. pyogenes je citlivý na penicilin, který je lékem volby. Výhodou je jeho šetrnost vůči makroorganismu hostitele a úzké spektrum, které minimalizuje narušení přirozené mikroflóry člověka, což po vysazení léčby usnadňuje postupný návrat rezidentní flóry. K selhání terapie penicilinem může dojít tam, kde je množení bakterie zpomaleno nebo tam, kde jsou na sliznici přítomni zástupci rezidentní flóry produkující β -laktamázy (enzymy inaktivující β -laktamová antibiotika). Důsledná a dostatečně dlouhá terapie akutních infekcí je nutná, zejména pro prevenci sterilních následků. Makrolidová antibiotika volíme při precitlivělosti na penicilin jako alternativní léky volby.....

více na str. 2, 3, 4, 5

Cytogenetická analýza periferních lymfocytů - vyšetření nabízené oddělením genetické toxikologie

Jaromíra Kúsová

Oddělení genetické toxikologie, CKL

Od začátku roku 2009 bylo do struktury Centra klinických laboratoří ZÚ zařazeno nově oddělení genetické toxikologie. Náplň činnosti tohoto oddělení je identifikace (pomocí biologických, nikoli chemických postupů) faktorů životního a pracovního prostředí, které jsou schopny „měnit“ genetický materiál živé buňky (tedy faktorů s tzv. pozdním účinkem – např. mutagenních, karcinogenních, klastogenních, teratogenních, sumárně genotoxických).....

více na str. 5, 6, 7

Larvální toxokaróza - výskyt protilátek u pacientů vyšetřených v laboratořích ZÚ Ostrava

Hana Bílková Fránková

Oddělení parazitologie a lékařské zoologie, CKL

Larvální toxokaróza je na území ČR nejčastější tkáňovou helmintózou. Jde o zoonózu způsobenou parazitickými škrkavkami, nejčastěji psími a kočičími – *Toxocara canis*, *Toxocara cati*. Člověk je zde paratenickým hostitelem, ve kterém je vývoj helminta dále výrazně limitován a díky postavení člověka na vrchol potravní pyramidy jde zároveň o slepou větev v přenosu parazita.

Diagnostikou larvální toxokarózy se zabýváme od roku 1993, kdy jsme ve spolupráci se SAV v Košicích zahájili rutinní testování pacientů na přítomnost protilátek proti *Toxocara canis/cati* metodou ELISA....

více na str. 7, 8

Streptococcus pyogenes je beta hemolytický streptokok a podle svého stěnového antigenu patří do skupiny A. *S. pyogenes* je původcem faryngitid, spály, infekcí kůže (pyoderma, erysipel), systémových infekcí, streptokokového šoku a poststreptokokových následků.

Bezpříznakové nosičství u dětí a mladých dospělých je časté, zpravidla však přechodné. Dlouhodobá kolonizace je limitována produkcí protilátek hostitelem a omezována normální rezidentní flórou. Streptokokové tonsilidy se vyskytují sporadicky během celého roku, epidemicky pak v chladných měsících. Nejvyšší incidence je mezi 6.-16. rokem života.

S. pyogenes je citlivý na penicilin, který je lékem volby. Výhodou je jeho šetrnost vůči makroorganismu hostitele a úzké spektrum, které minimalizuje narušení přirozené mikroflóry člověka, což po vysazení léčby usnadňuje postupný návrat rezidentní flóry. K selhání terapie penicilinem může dojít tam, kde je množení bakterie zpomaleno nebo tam, kde jsou na sliznici přítomni zástupci rezidentní flóry produkující β -laktamázy (enzymy inaktivující β -laktamová antibiotika). Důsledná a dostatečně dlouhá terapie akutních infekcí je nutná, zejména pro prevenci sterilních následků. Makrolidová antibiotika volíme při precitlivělosti na penicilin jako alternativní léky volby.

Mechanismus účinku makrolidových antibiotik spočívá v inhibici proteosyntézy na 50 S podjednotce bakteriálního ribozomu. Tento mechanismus mají makrolidová antibiotika společný s linkosamidy (a také streptograminy typu B). Tyto skupiny antibiotik mají rovněž obdobné mechanismy vzniku rezistence a často vykazují zkříženou rezistenci. Pokud je kmen rezistentní k erytromycinu („prototyp makrolidů“), pak jsou rezistentní i všechna další makrolidová antibiotika, ne vždy však linkosamidy (popř. streptograminy). Rezistence může být plazmidového i chromozomálního typu, indukovaná nebo konstitutivní (viz níže).

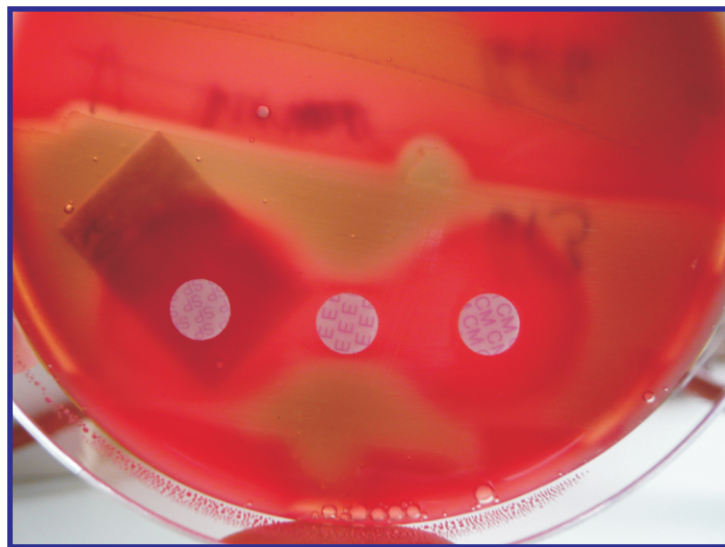
Pokud je izolovaný kmen citlivý k erytromycinu (zástupce makrolidových antibiotik), pak můžeme kmen označit za citlivý také k linkosamidům. U kmenů se zmenšenou nebo žádnou inhibiční zónou kolem erytromycinu, izolovaných v naší laboratoři, jsme dále ověřovali citlivost (nebo rezistenci) k linkosamidům. Citlivost byla testována na Mueller Hinton agaru s 5 % beraní krve, a to tím způsobem, že disk klindamycinu (jako zástupce linkosamidových antibiotik) byl umístěn na uvedené médium ve vzdálenosti 2 cm od disku erytromycinu. Inkubace probíhá v normální atmosféře.

Linkosamidová antibiotika pak mohou být citlivá (fenotyp M), nebo rezistentní (fenotyp cMLS a iMLS). Průkaz rezistence se in vitro projeví dvojným způsobem (viz fenotypy rezistence bod 1 a 2): a, Disk linkomycinu vytváří malou nebo žádnou inhibiční zónu (cMLS); b, Vytváří se velká zóna kolem linkomycinu s charakteristickým „useknutím“ v oblasti sousedící s diskem erytromycinu (iMLS), dochází k indukci. Posuzování zóny kolem linkomycinového disku samostatně by v tomto případě vedlo ke špatné interpretaci výsledku (falešně citlivý) a následnému selhání terapie při volbě linkosamidových antibiotik.

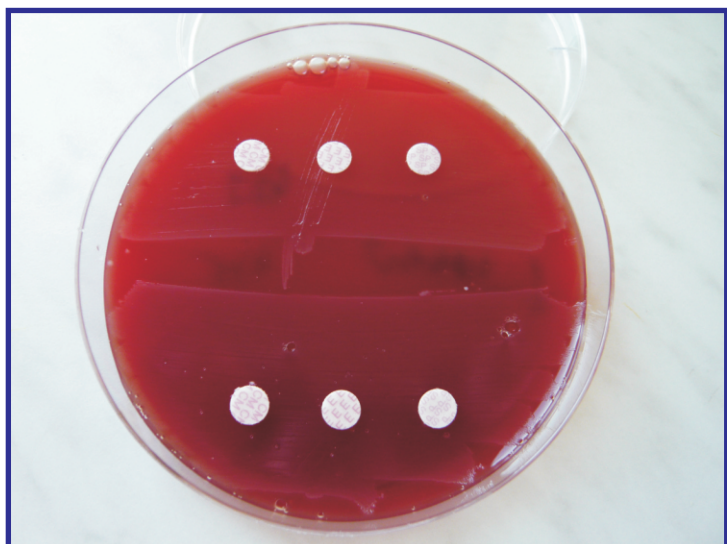
Charakteristický vzhled jednotlivých fenotypů je zdokumentován na obrázku 1-4.



Obr. 1: fenotyp M



Obr. 2: fenotyp M



Obr. 3: fenotyp cMLS



Obr. 4: fenotyp iMLS

Obr. 1-4 : fenotypy rezistence (fen.M, cMLS, iMLS)

Podle **fenotypu rezistence** můžeme kmeny *S. pyogenes* zařadit do tří základních skupin.

1. **Konstitutivní typ rezistence cMLS_B** je charakterizován vysokým stupněm rezistence k erytromycinu i klindamycinu*. (obr. 3)
2. **Indukovaný typ rezistence iMLS_B** je charakterizován nízkým až vysokým stupněm rezistence k erytromycinu a indukcí rezistence u klindamycinu*, která je detekovatelná deformací zóny u disku s klindamycinem. (obr. 4)
3. **M fenotyp** je charakterizován nízkým až vysokým stupněm rezistence k erytromycinu a citlivostí ke klindamycinu*. (obr. 1,2)

* *Erytromycin* jako zástupce makrolidových antibiotik, *Klindamycin* jako zástupce linkosamidových antibiotik

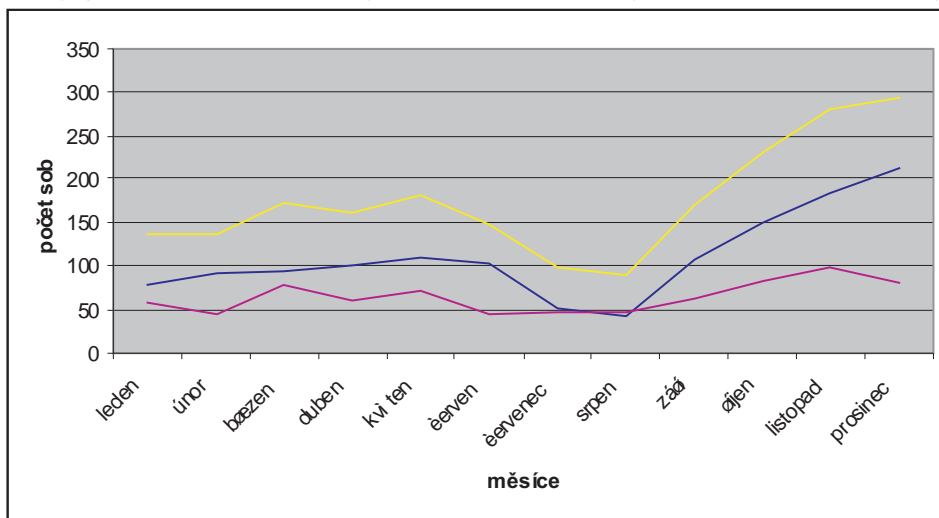
V průběhu roku 2008 (leden až prosinec) jsme v naší laboratoři bakteriologie Havířov u výtěrů z krku zaznamenali celkem 808 izolátů pyogenních streptokoků (tabulka 1, graf 1). Kmeny pocházely ze zdravotnických zařízení (ambulantních i lůžkových) z Havířova, Karviné a Orlové. Z grafu 1 je vidět sezónní výskyt pyogenních streptokoků a zejména pak prudký nárůst výskytu v zimních měsících (září-prosinec) v obou věkových skupinách. Převažující počet kmenů (547) pocházel od dětí ≤ 14 let. Počet *S. pyogenes* u mladistvých a dospělých ≥ 15let byl oproti tomu zhruba o polovinu nižší tj. 261 izolátů. Detailní přehled rezistencí k jednotlivým skupinám sledovaných antibiotik v průběhu roku, v obou věkových skupinách s přehledem prevalencí je uveden v tabulce 2.

Tabulka 1. Počet izolovaných kmenů *Streptococcus pyogenes* v roce 2008

STPY	Počet izolátů	R ERY	% R ERY	R CLI	% R CLI
≤ 14let	547	20	3,7 %	14	2,6 %
≥ 15let	261	39	14,9 %	35	13,4 %
Celkem	808	59	7,3 %	49	6,1 %

Vztaženo k celkovému počtu vzorků z horních cest dýchacích, ve kterých byl *S. pyogenes* izolován, bylo k makrolidovým a linkosamidovým antibiotikům rezistentních 7,3 % resp. 6,1 % izolátů. Pokud bychom však posuzovali rezistenci v jednotlivých věkových skupinách zvlášť, pak zjistíme, že procentuální zastoupení rezistentních kmenů pyogenních streptokoků je u osob ≥ 15 let výrazně vyšší: 14,9 % resp. 13,4 % pro makrolidová a linkosamidová antibiotika, oproti skupině dětí ≤ 14 let: 3,7 % resp. 2,6 % (graf 2).

Graf 1. Počet pyogenních streptokoků izolovaných u infekcí horních cest dýchacích v průběhu roku 2008 (leden-prosinec)



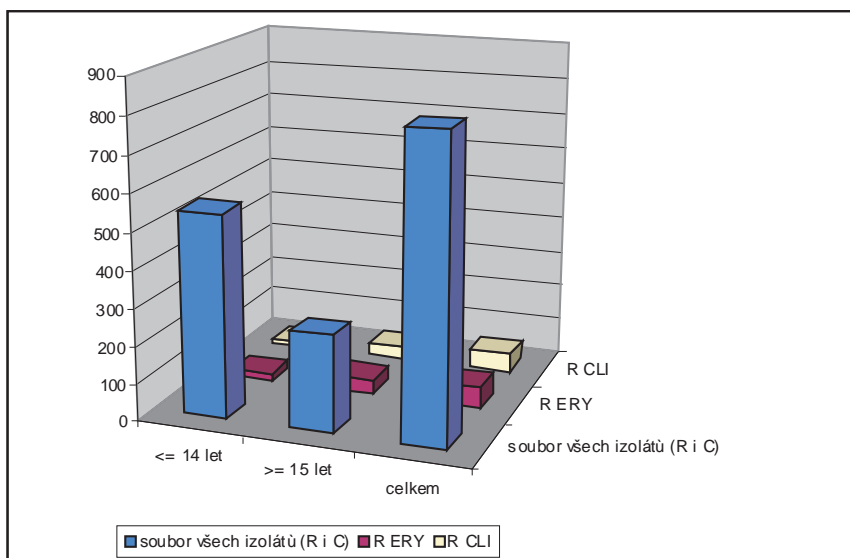
Legenda ke grafu:

růžová – osoby ≥ 15 let

modrá – děti ≤ 14 let

žlutá – celkově (obě věkové skupiny)

Graf 2. Počet kmenů pyogenních streptokoků rezistentních k makrolidům a linkosamidům izolovaných u infekcí horních cest dýchacích u dětí do 14 let a u osob nad 15 let v roce 2008



Výsledky rezistence pyogenních streptokoků k makrolidům a linkosamidům ze spádové oblasti Havířov, Karviná a Orlová zjištěné v naší laboratoři v průběhu roku 2008 jsou 7,3 % resp. 6,1 %. Rezistence k makrolidům v roce 1997 ve sledovaných laboratořích v ČR byla podle studie Dr. Urbáškové 3%. Poté byl sledován vzestup frekvence rezistence na 12,5 % v roce 1999. Autoři studie provedené v Olomouckém kraji v letech 2000-2006 zjišťovali prevalenci rezistentních kmenů *S. pyogenes* k makrolidům a linkosamidům v měsících zvýšené incidence (září-prosinec). V letech 2000, 2004 a 2005 se výskyt rezistentních kmenů pohyboval kolem 20 %, nejvyšší výskyt byl zaznamenán v roce 2001 (cca 30 %) u obou skupin antibiotik. V roce 2006 pak byl zaznamenán pokles, kdy se rezistence pohybovala kolem 10 % u obou skupin antibiotik.

V období, kdy roste incidence *Streptococcus pyogenes*, zároveň narůstá rezistence, což je patrné v tabulce 2, zejména u osob ≥ 15 let. Příčinou může být, kromě přímého šíření rezistentních variant z člověka na člověka, zvýšená aplikace makrolidových antibiotik, která podporuje selekci rezistentních klonů. Makrolidová rezistence vzniká poměrně rychle, proto pro léčbu respiračních infekcí je lépe používat β -laktamová antibiotika (penicilin) a makrolidy rezervovat jen pro pacienty s alergií k penicilinovým přípravkům. Aminopeniciliny s inhibitorem nebo bez (ampicilin, amoxicilin, augmentin nebo unasyn) nejsou vhodné z důvodu možné diagnózy infekční mononukleózy. V souvislosti se zvýšenou incidencí respiračních infekcí v podzimních měsících lze předpokládat zvýšenou aplikaci makrolidových antibiotik, a tím také zvýšený selekční tlak na vznik kmenů rezistentních k této skupině antibiotik. Pro zabránění nárůstu a šíření rezistentních kmenů je třeba makrolidová antibiotika užívat racionálně tzn. cíleně a dodržovat doporučené dávkování spolu se stanovenou délkou podávání antibiotik. Jak dokazují práce některých autorů věnujících se dané problematice rezistence, racionálním podáváním antibiotik, zejména zabráněním jejich nadužívání, je možné docílit postupného snižování výskytu nežádoucích rezistentních kmenů.

Výskyt rezistentních pyogenních streptokoků v naší sledované oblasti je poměrně příznivý, v posledních letech trvale stabilizovaný, i když samozřejmě ne optimální. Pro snížení výskytu rezistentních kmenů je třeba zabránit zbytečným preskripcím a dbát na dodržování indikací makrolidových (popř. linkosamidových) antibiotik. Volbu makrolidových antibiotik pak rezervovat pro pacienty s alergií k penicilinovým a β -laktamovým antibiotikům.

Tabulka 2. Výskyt kmenů *Streptococcus pyogenes* rezistentních k makrolidům a linkosamidům u dětí do 15 let a u osob nad 15 let v jednotlivých měsících roku 2008

Období	<= 14 let					>= 15 let				
	celkem	ERY		CLI		celkem	ERY		CLI	
		R	%	R	%		R	%	R	%
leden	77	3	3,9	1	1,3	59	1	1,7	1	1,7
únor	91	2	2,2	2	2,2	44	2	4,5	2	4,5
březen	93	5	5,4	4	4,3	79	6	7,6	3	3,8
duben	100	5	5	5	5	61	2	3,3	2	3,3
květen	109	2	1,8	2	1,8	71	3	4,2	3	4,2
červen	102	5	4,9	3	2,9	45	2	4,4	1	2,2
červenec	51	3	5,9	2	3,9	47	6	12,8	6	12,8
srpen	43	2	4,7	1	2,3	46	6	13	5	10,9
září	107	8	7,5	8	7,5	62	6	9,7	6	9,7
říjen	149	9	6	5	3,3	83	14	16,9	14	16,9
listopad	183	5	2,7	4	2,2	98	15	15,3	14	14,3
prosinec	215	6	2,8	5	2,3	80	10	12,5	7	8,8
celkem	547	20	3,7	14	2,6	261	39	14,9	35	13,4

Literatura:

- Jakubů V., Urbášková P. Fenotypy rezistence na makrolidová antibiotika u *Streptococcus pyogenes*. Zprávy CEM (SžÚ, Praha) 2009; 9 (12): 489-490.
- Bednář et al. Lékařská mikrobiologie. Marvil 1996.
- Komínek et al. Záněty hltanu. Tobiáš 2005.
- Přiborský J. Makrolidy. Maxdorf 2001.
- Čekanová L. et Kolář M. Vývoj rezistence komunitních respiračních patogenů k antimikrobním přípravkům v Olomouckém regionu. Interní Med. 2007; 9 (9): 405-407.
- Urbášková P. et al. Surveillance rezistence k antibiotikům u nejčastějších bakteriálních původců respiračních infekcí v České republice. Remedia 2000; 10: 195-203.
- Jindrák V. Přednáška „Antibiotická politika v komunitě v nemocnici“ v rámci kurzu: Rezistence bakterií k antibiotikům. Praha 19.-20.11.2008.

Cytogenetická analýza periferních lymfocytů - vyšetření nabízené oddělením genetické toxikologie

Jaromíra Kůsová

Oddělení genetické toxikologie, CKL

Motto: „...zdraví nevzniká v ambulancích a nemocnicích, tam se jen s velkým úsilím spravuje to, co se pokazilo. Zdraví vzniká ve školách, rodinách a na pracovištích. Pokud je záměrem zlepšit zdraví lidí, pak je nezbytné vzít v úvahu širokou škálu determinant zdraví a hledat cestu, jak je příznivě ovlivnit.“ J. Holčík (Hygiena, 2008, 53, Supplementum č.1, str. 4-7)

Od začátku roku 2009 bylo do struktury Centra klinických laboratoří ZÚ zařazeno nově oddělení genetické toxikologie. Náplň činnosti tohoto oddělení je identifikace (pomocí biologických, nikoli chemických postupů) faktorů životního a pracovního prostředí, které jsou schopny „měnit“ genetický materiál živé buňky (tedy faktorů s tzv. pozdním účinkem – např. mutagenních, karcinogenních, klastogenních, teratogenních, sumárně genotoxických). Je to možná malinko s podivem, vždyť rámcové vzdělávací programy MZ, zveřejněné ve Věstníku MZ ČR 5/2008 zařazují profilový modul vyšetřovací metody v genetické toxikologii pod obor odborných pracovníků v laboratorních metodách pro ochranu veřejného zdraví (nikoli pod obor klinická genetika), leč je tomu tak.

Nejde tedy o pracoviště, jehož náplní je klinika ve smyslu pomoci diagnostikovat a ovlivnit průběh onemocnění člověka, nýbrž upozornit na nebezpečí v době, kdy ještě k onemocnění nedošlo.

Využití biologického detekčního systému ke zjištění skutečného poškození „živého“ genetického materiálu je předností oproti přístupu čistě chemickému. Jakkoli přesně určená úroveň škodliviny vně organismu nedá obraz o tom, jak konkrétní reálné podmínky interagují s biologickým/živým systémem (např. pro reálné důsledky spolupůsobení chemických, biologických, eventuálně fyzikálních faktorů, nebo pro reálně se vyskytující směsi chemických látek, nikoli pro jednu či dvě vybrané škodliviny, byť hygienicky významné, jelikož mnohé, co se týče jednotlivých faktorů a jejich společného působení, lidstvu ještě zůstává utajeno).

Jedním z těchto postupů je metoda s názvem cytogenetická analýza periferních lymfocytů (CAPL), která sleduje chromosomální aberace v periferní krvi člověka, získané pod vlivem faktorů vnějšího prostředí. Frekvence chromosomálních aberací (% AB.B. = % aberovaných, aberantních buněk, tj. výsledek jmenovaného vyšetření) byla v r. 2004 na základě výsledků epidemiologických studií potvrzena jako mezinárodně uznávaný biomarker konkrétně prokazující asociaci se sumárním karcinogenním rizikem pro člověka.

Je logické, že metoda je nejčastěji používána u pracovníků, kteří jsou profesionálně (tedy pravidelně a kontinuálně) exponováni především látkám mutagenním a karcinogenním ve smyslu českých legislativních opatření pro ochranu zdraví při práci (zákoník práce, zákon 258/2000 Sb., zákon 309/2006 Sb., vyhláška 432/2003 Sb., nařízení vlády 361/2007 Sb.), a to v rámci jejich preventivních prohlídek.

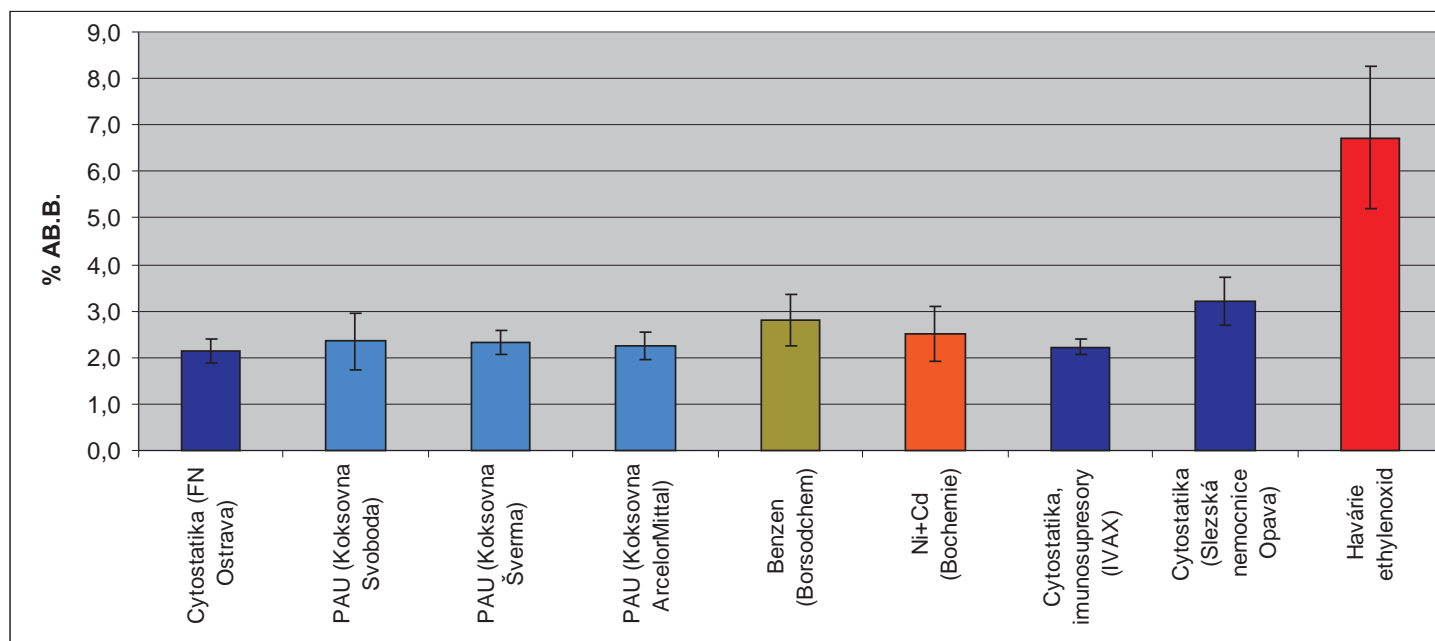
Legislativa a tradiční přístup k ochraně zdraví při práci v České republice vycházejí z toxikologické teze „jedna látka nad určitou míru expozice → jeden biologický efekt“, což je třeba v případě multifaktoriálního onemocnění, jakým je nádor, brát s rezervou. A priori pro danou oblast vychází pouze z mezinárodní klasifikace jednotlivých chemických látek (nikoli z obecnější klasifikace Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny Světové zdravotnické organizace IARC WHO, která bere v úvahu i směsi látek, event. profesionální expozice – viz tabulka). Z toho důvodu jsou pro potřeby ochrany zdraví při práci upřednostňována měření úrovně jedné škodliviny v pracovním ovzduší před biomonitorováním exponovaných osob. Díky tomuto přístupu se práce s mnoha mutageny kategorizují a dohlížejí pouze podle úrovně faktoru, naměřeného v pracovním prostředí, jako jiné chemické látky, u kterých možný pozdní biologický účinek není potvrzen. CAPL je vyšetřením, které díky své biologické podstatě je schopno postihnout u faktorů genotoxických více než jen aktuální koncentraci škodliviny v ovzduší.

Je-li toto vyšetření hodnoceno jako skupinový test pro osoby, vystavené stejnému expozičnímu scénáři, odhaluje, zda jde o skupinu se spontánní frekvencí aberací jako u neexponované české populace (0 až 2 % AB.B.), nebo o skupinu se zvýšenou (2 – 4 % AB.B.) či vysokou expozicí (nad 4% AB.B.) genotoxickým látkám. Na rozdíl od měření aktuální úrovně škodliviny v pracovním ovzduší dovoluje metoda mapovat biologické důsledky expozice genotoxickým faktorům z prostředí zhruba za poslední tři měsíce.

Přednost zjišťování jmenovaného biomarkeru časného (tedy vratného!) biologického účinku je patrná z grafu. V něm jsou uvedeny skupinové hodnoty pro % AB.B. z některých pracovišť, kategorizovaných jako riziková (výroba koxsu, expozice cytostatikům, benzenu), a skupinová hodnota pro pracovníky centrální sterilizace (v souladu s běžnou hygienickou praxí pracoviště nerizikové vzhledem k úrovni ethylenoxidu v pracovním ovzduší) po úniku ethylenoxidu cca dva měsíce po havárii, kdy v pracovním ovzduší nebyly opakovaně zjišťovány zvýšené koncentrace sledované látky. Zatímco skupinové hodnoty pro pravidelně sledovaná riziková pracoviště se skutečně nacházely v intervalu 2 až 4 % AB.B., tedy nad úrovní profesionálně neexponované české dospělé populace, nicméně pod úrovní skupiny s vysokou expozicí genotoxickým faktorům, po havárii spojené s únikem ethylenoxidu byla tato hodnota několikrát (signifikantně) vyšší.

Vyšetření CAPL je využitelné jako individuální ukazatel jak pro osobu profesionálně exponovanou, tak pro zájemce mimo profesionální expozici. Dále jako charakteristika skupiny vzhledem k její konkrétní zátěži genotoxickým faktorům z konkrétního prostředí, např. pro účely kategorizace práce, pro prověření účinnosti ochranných opatření zavedených v souvislosti s výskytem genotoxických faktorů, pro důkaz, že jde o skupinu odpovídající české neexponované dospělé populaci.

Graf: Skupinové hodnoty chromosomálních aberací pro vybraná pracoviště (upřesnění viz text). Chybové úsečky vyznačují 95% konfidenční interval skupinové hodnoty.



Tabulka: Příklady humánních karcinogenů (vybráno z klasifikace Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny Světové zdravotnické organizace IARC WHO, leden 2009, ze skupiny 1 - prokázané a 2A - pravděpodobné karcinogeny).

Chemické látky (v originále „agents and groups of agents“) především průmyslové	As, Be, Cd, Cr(VI), Ni a jejich sloučeniny, fosfáty, aminobifenyl, azbestová vlákna, benzen, butadien, benzo(a)pyren a další polycyklické aromatické uhlovodíky, ethylenoxid, formaldehyd, vinylchlorid, nitrosaminy, tetrachlorodibenzo-p-dioxin, tetrachlorethylen...
Látky používané ve zdravotnictví	Cyklofosamid, diethylstilbestrol, estrogen-progesteronová terapie, methoxyypsoralen, chemoterapie s použitím alkylačních látek, tamoxifen, thiotepa, adriamycin, azacytidin, cis-platina...
Biologické činitele (většinou důsledek infekce a následné expozice jinými agents)	Epstein-Barr virus, vybrané lidské papilomaviry, <i>Helicobacter pylori</i> , virová hepatitida B a C (chronická), HIV (typ 1), <i>Opisthorchis viverrini</i> , <i>Schistosoma haematobius</i>
Směsi látek (v originále „mixtures“)	Průmysl: dehty, smůly, saze, dřevný prach, neopracované minerální oleje... Ostatní prostředí: přírodní tvoření aflatoxiny, analgetika s obsahem phenacetinu, rostliny s obsahem kyseliny aristolochové, alkoholické nápoje, tabák, tabákový kouř, insekticidy, spalování uhlí a biomasy (indoor emission), zplodiny dieslových motorů, solária...
Profesionální expozice (v originále „exposure circumstances“)	výroba auraminu, hliníku, isopropanolu, koksů, nábytku, zplyňování uhlí, destilace dehtů, lití železa a oceli, gumárenský průmysl, čištění komínů, opravy a ruční výroba obuvi, expozice natěračů, expozice krystalickému SiO ₂ , tavení asfaltu, rafinace ropy...

Larvální toxokaróza - výskyt protilátek u pacientů vyšetřených v laboratořích ZÚ Ostrava

Hana Bílková Fránková

Oddělení parazitologie a lékařské zoologie, CKL

Larvální toxokaróza je na území ČR nejčastější tkáňovou helmintózou. Jde o zoonózu způsobenou parazitickými škrkavkami, nejčastěji psími a kočičími – *Toxocara canis*, *Toxocara cati*. Člověk je zde paratenickým hostitelem, ve kterém je vývoj helminta dále výrazně limitován a díky postavení člověka na vrchol potravní pyramidy jde zároveň o slepou větev v přenosu parazita.

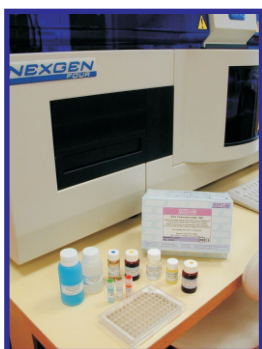
Klinické projevy onemocnění závisí na lokalizaci a množství larev a na samotné kondici pacienta. Onemocnění může probíhat inaparentně, nebo pouze s lehkými klinickými příznaky. Nejčastějšími a nejběžnějšími klinickými syndromy asociovanými s toxokarovou infekcí jsou **visceral larva migrans** a v daleko menším počtu případů **ocular larva migrans**. Nejnovější zprávy CDC informují, že téměř 14% američanů je infikováno larvami *r. Toxocara*, aktuální studie naznačují, že toto onemocnění je rozšířeno více a je běžnější, než se udávalo dříve.

Diagnostikou larvální toxokarózy se zabýváme od roku 1993, kdy jsme ve spolupráci se SAV v Košicích zahájili rutinní testování pacientů na přítomnost protilátek proti *Toxocara canis/cati* metodou **ELISA**.

Detekce protilátek je obecně pouze prostředkem pro podporu pravděpodobné klinické diagnózy. V laboratořích oddělení parazitologie a lékařské zoologie pracujeme s komerčními diagnostickými sety.

V případě reaktivity stanovujeme navíc **aviditu** protilátek, jako marker samotné fáze infekce. Druhým, doplňkovým resp. konfirmačním testem je stanovení přítomnosti protilátek metodou **Westernblot**.

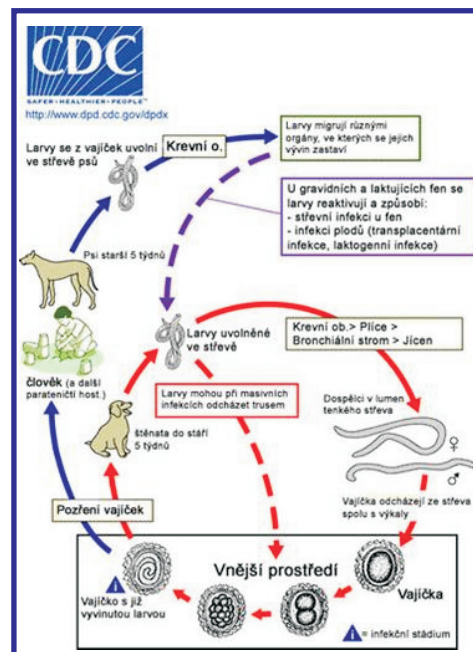
V následujících výsledcích uvádíme příklady, kdy bylo nutné využít všech možných diagnostických postupů.



Dospělci *T.canis*

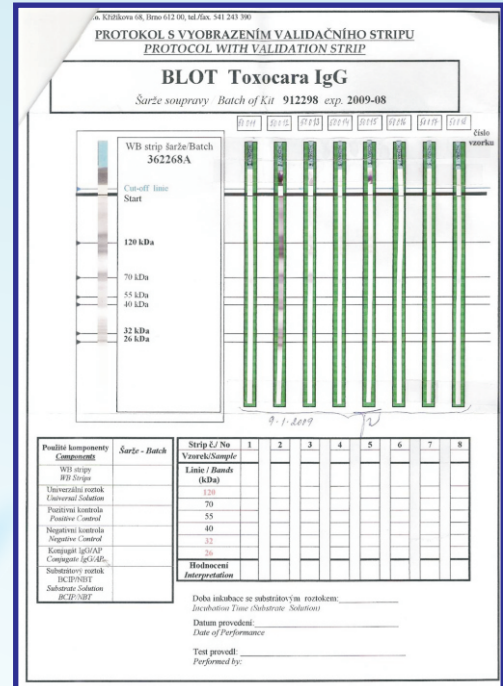
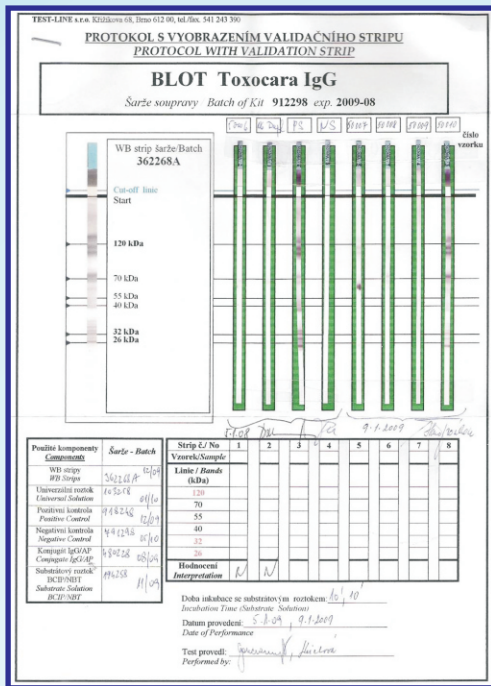


Vajíčko s larvou *T.canis*



Životní cyklus *T.canis*

Zdroj fotografií: <http://cs.wikipedia.org>



V roce 2008 jsme provedli celkem 961 vyšetření metodou ELISA, z toho v 59 případech se signálem tvorby protilátek (6,1%). Z toho ovšem pouze u 37 (3,9%) pacientů šlo o první záchyt pozitivitu protilátek. **Pouze v 1 případě nebyla pozitivita v reakci ELISA potvrzena Westernblotem.**

Ve 28 případech byli pacienti odesláni k vyšetření na oční formu larvální toxokarózy (nejčastěji dg. Iridocyklitida a Chorioretinitida), ve 3 případech s nálezem protilátek (dg. H 20.0 Akutní a subakutní iridocyklitida, H 16.0 Vřed rohovky, H 35.3 Degenerace makuly a zadního pólu). Zda-li šlo v těchto případech skutečně o oční formu toxokarózy, nebo jen o náhodný nález v rámci viscerální nebo skryté formy toxokarózy nevíme.

460 pacientů jsme vyšetřili rovněž metodou Westernblot, z nichž v 5-ti případech bez pozitivní reakce v ELISA reakci.

V ELISA reakci stanovujeme přítomnost IgG protilátek prostřednictvím vysoce specifického extrakčně sekrečního antigenu *Toxocara canis*. V případě stanovení avidity využíváme skutečnost, kdy vazebná místa mezi protilátkami třídy IgG a antigenem mají na počátku nákazy slabší aviditu (pevnost specifické vazby), než v chronickém období. V průběhu onemocnění imunitní odpověď vyžívá a avidita narůstá. Narušení vazby protilátky s antigenem pomocí aviditního roztoku v ELISA testu vyjádříme Indexem avidity, který stanoví, jaká část protilátek zůstala navázána na antigen po inkubaci s močovinou. Stanovení avidity se provádí jen u hraničních a pozitivních vzorků z prvního vyšetření.

V případě metody Westernblot je antigenní extrakt *Toxocara canis* elektroforeticky rozdělen a přenesen na nitrocelulózovou membránu. Po inkubaci membrány (stripu) s vyšetřovaným vzorkem, vazbě specifických protilátek přítomných ve vzorku, následně inkubací s konjugátem a vizualizací substrátovým roztokem odečítáme přítomnost specifických antigenních linií.

Od roku 1999 pracujeme s diagnostiky f. TEST LINE Clinical diagnostics.

V roce 2009 (1.-8./2009) jsme provedli celkem 731 vyšetření metodou ELISA, z toho v 56 případech se signálem tvorby protilátek (7,7%), u 20 pacientů šlo o opakovaný odběr, u 36 o první nález (4,9%).

Pozitivní výsledky získané metodou ELISA nebyly v 11 případech potvrzeny metodou westernblot.

Ve 45 případech byli pacienti zasláni k vyšetření s oční diagnózou, u 3 pacientů (dg. H 16.0 Vřed rohovky, H33.0 Odchlípení sliznice s trhlinou, H 34.8 Sítnicové cévní uzávěry) byly protilátky nalezeny a westernblotem jejich přítomnost potvrzena.

Ve 2 případech zde jde pravděpodobně skutečně o oční formu onemocnění, což bude předmětem společného sdělení (MUDr. L.Hozáková –FN Ostrava, MUDr. J. Slepánek - NSP Karviná Ráj, MUDr. Čech - Nemocnice Frýdek Místek).

394 pacientů jsme vyšetřili metodou westernblot, u 19 pacientů s nálezem reaktivity pouze v metodě westernblot, zde jsme ovšem vyhodnotili 18x hraniční reakci a pouze 1x pozitivní reakci.

Kombinace metod - stanovení přítomnosti specifických protilátek metodou ELISA a metodou Westernblot spolu se stanovením avidity protilátek diagnostiku larvální toxokarózy zpřesňuje.

Pro potvrzení oční formy toxokarózy doporučujeme vyšetření sklivce.

V současné době spolupracujeme s f. TEST LINE na studii ke stanovení významu IgA, IgM a IgE protilátek v diagnostice larvální toxokarózy.

K vánočnímu číslu Zpravodaje přikládáme CD, na kterém naleznete elektronickou verzi Laboratorní příručky vyšetření CKL a elektronickou verzi velké žádanky mikrobiologického, imunologického a parazitologického vyšetření.

Žadanku můžete vyplnit a vytisknout přímo z Vašeho počítače. K otevření použijete prohlížeč PDF souborů, který je dnes běžnou součástí instalací v prostředí Vašeho operačního systému např. *Adobe Acrobat Reader*. Vyplněnou žadanku snadno vytisknete stiskem tlačítka "tisk" přímo na Vámi zvolenou tiskárnu a jen opatříte razítkem a podpisem. Elektronická žadanka by Vám měla usnadnit práci. Můžete, ale nemusíte tuto verzi žadanky používat, nadále Vám budeme posílat žadanky tištěné. Vyplněnou žadanku lze uložit pro případné zpětné vyhledání požadovaných vyšetření nebo jako vzor nejčastěji volených vyšetření. *

Ve složce "Příručka" naleznete úplnou elektronickou verzi Laboratorní příručky vyšetření CKL ve formátu PDF

ZDRAVOTNÍ ÚSTAV SE SÍDLEM V OSTRAVĚ

Partyzánské nám. 7, 702 00 Ostrava, tel.: +420 596 200 111, e-mail: podatelna@zuova.cz, www.zuova.cz

Centrum klinických laboratoří

Redakční rada zpravodaje: Mgr. Hana Bílková Fránková, MUDr. Romana Mašková, Mgr. Pavla Jaworská

Tisk - **KARTIS+CO**, Náklad - 1.700ks