

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2019

Klára Slaninová

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

SOUČASNÉ MOŽNOSTI DIAGNOSTIKY PARAZITÁRNÍCH  
ONEMOCNĚNÍ U ČLOVĚKA

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce:

PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

Hradec Králové 2019

Klára Slaninová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.“

V Hradci Králové dne:

31. 8. 2019

# Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Klára Slaninová

Školitel: PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

Název bakalářské práce: Současné možnosti diagnostiky parazitárních onemocnění u člověka

Správná diagnostika parazitárního onemocnění je velice důležitá pro následnou péči o pacienta a zejména pro správnou volbu léčiva. Jsou oblasti, zejména v rozvojových zemích, kde jsou parazitární onemocnění zcela běžná. Naopak v civilizovaných zemích, mezi které se řadí i Česká republika, jsou parazitární onemocnění člověka v současnosti spíše raritou. Objevují se však nákazy vlivem rozšířeného cestovního ruchu.

Metody používané k průkazu parazitů z biologického materiálu jsou různé. Mikroskopie a makroskopie jsou nejzákladnější užívané metody a také jedny z nejstarších. S vývojem imunologie se začaly používat sérologické metody. Dokonce i metody na molekulární úrovni se zařadily k metodám užívaným k prokazování parazitů.

V laboratorní praxi se většinou nepoužívá pouze jeden druh metody, spíše dochází ke kombinaci několika metod užívaných k průkazu parazita. Kombinace metod zajišťuje přesné určení druhu parazita, ale také se zmenšuje riziko falešné negativity nebo falešné pozitivity výsledků. Cílem této bakalářské práce je tedy popsat metody, které se zabývají průkazem parazita jako patogena v biologickém materiálu.

# **Abstract**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Klára Slaninová

Supervisor: PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

Title of bachelor thesis: Current diagnostic approaches of parasitic diseases in human

Right diagnosis of parasitic diseases is very important for subsequent patient care and in particular for the proper choice of drug. There are areas, especially in developing countries, where parasitic diseases are common. On the other hand, in civilized countries, among which we include the Czech Republic, parasitic diseases in humans are currently rare. However, infections appear thanks to widespread tourism.

Methods used for the detection of parasites in the biological material are various. Microscopy and macroscopy are the most used methods and also one of the oldest. Thanks to the development in the field of immunology serological methods started to be used. Even molecular biology methods are ranked to the methods used for parasites diagnosis.

In the laboratory practice combination of several methods is preferred instead of single method to diagnose parasites. The combination of methods not only ensures accurate determination of parasite species but also reduces the risk of false negative or false positive results. The aim of this bachelor thesis is to describe methods used for diagnosis of parasite as a pathogen in the biological material.

## Obsah

1.	Úvod .....	9
2.	Základní pojmy .....	10
3.	Rozdělení původců parazitárních onemocnění .....	13
3.1.	Protozoa .....	13
3.2.	Helminti .....	14
3.3.	Členovci .....	15
4.	Diagnostika parazitóz .....	16
4.1.	Přímý průkaz .....	16
4.2.	Nepřímý průkaz .....	16
4.3.	Odběr klinického materiálu .....	17
5.	Mikroskopické metody .....	19
5.1.	Fixování biologického materiálu .....	19
5.2.	Používané fixační roztoky v parazitologii .....	19
5.3.	Typy preparátů užívaných v mikroskopických metodách .....	20
	Nativní preparát .....	20
	Roztěry .....	21
5.4.	Flotační metoda .....	23
	Faustova koncentrační metoda .....	23
	Sedimentační koncentrační metoda .....	24
5.5.	Barvení preparátů .....	24
	Barvení dle Gomoriho (trichromem) .....	24
	Barvení Heidenhainovým hematoxylinem .....	25
	Hematoxylin Delafieldův .....	25
	Malloryho metoda .....	25
	Dominiciho metoda .....	25
	Mannova metoda v Dobellově modifikaci .....	26
	Giemsova vlhká metoda .....	26
	Feulgenova nukleární reakce .....	26
	Barvení dle Giemsy-Romanowského .....	26
5.6.	Otisky a punktáty .....	27
	Vyšetření perianálních otisků .....	27
6.	Kultivace .....	27
6.1.	Kultivace prvoků .....	27
6.2.	Kultivace členovců .....	29

7.	Molekulární diagnostika.....	30
7.1.	PCR.....	31
	Princip metody PCR.....	32
	Gelová elektroforéza.....	34
	PCR s RNA templátem.....	35
8.	Sérologické metody.....	39
8.1.	Metody EIA.....	39
8.2.	Princip ELISA.....	40
	ELISA – Diagnostika antigenu a protilátek.....	40
8.3.	Přehled nejpoužívanějších ELISA testů.....	41
	Přímá ELISA.....	41
	Nepřímá ELISA.....	42
	Sendvičová ELISA.....	42
	Další typ ELISA testů.....	43
8.4.	Komplement fixační reakce.....	43
	Toxoplazmóza – příklad parazitózy stanovované ELISA.....	45
9.	Diskuse.....	47
10.	Závěr.....	50
11.	Seznam použité literatury.....	51
11.1.	Tištěná literatura.....	51
11.2.	Internetové zdroje.....	54

## Zkratky

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
C.A.T.	Transportní půda: soustava Candida a Trichomonas
cDNA	Komplementární deoxyribonukleová kyselina
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dATP	Deoxyriboadenosintrifosfát
dCTP	Deoxyribocytidintrifosfát
dGTP	Deoxyriboguanosintrifosfát
dTTP	Deoxyribothyminosintrifosfát
EIA	Enzyme Immunoassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Ig	Imunoglobulin
IgA	Imunoglobulin třídy A
IgE	Imunoglobulin třídy E
IgG	Imunoglobulin třídy G
IgM	Imunoglobulin třídy M
IHA	Indirect hemagglutination
HIV	Human Immunodeficiency Virus
KFR	Komplement fixační reakce
PCR	Polymerázová řetězová reakce
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
UV	Ultrafialové záření
WHO	Světová zdravotnická organizace



# 1. Úvod

Správná diagnostika parazitárního onemocnění je velice důležitá pro následnou péči o pacienta a zejména pro správnou volbu léčiva. Jsou oblasti, zejména v rozvojových zemích, kde jsou parazitární onemocnění zcela běžná. Naopak v civilizovaných zemích, mezi které se řadí i Česká republika, jsou parazitární onemocnění člověka v současnosti spíše raritou. Objevují se však nákazy vlivem rozšířeného cestovního ruchu.

Tato práce si klade za cíl představit základní metody vyšetřování biologických materiálů na přítomnost parazitárních onemocnění. Metody k určení parazitárních onemocnění u člověka se během let vyvíjely, postupně se zdokonalovaly, zjednodušovaly, ale také vznikaly metody zcela nové. Mikroskopie a makroskopie jsou nejzákladnější užívané metody a také jedny z nejstarších. S vývojem imunologie se začaly používat sérologické metody. V současné době se do popředí dostávají metody molekulární biologie a také automatizace těchto metod. I přesto však mikroskopické metody zůstávají nedílnou součástí diagnostiky parazitárních onemocnění u člověka.

## 2. Základní pojmy

**Parazitologie** je věda, zabývající se parazitárními organismy, vztahy mezi hostitelem a parazitem a nemocemi způsobenými parazity (Votava et al., 2003).

Vztah, při kterém jeden organismus (parazit) žije na úkor druhého organismu (hostitel), se nazývá **parazitismus**. Tímto soužitím je více či méně hostitel poškozován. Někteří paraziti mají složité životní cykly, během kterých střídají zdroje potravy (hostitele) a také se nechávají transportovat přenašeči (Votava et al., 2003).

Organismus, který využívá ke svému životu jiný organismus je **parazit (cizopasník)**. Za parazity se především považují jednobuněční prvoci, mnohobuněční helminti a členovci. Dále se dělí podle lokalizace na vnější (ektoparazité), mezi které řadíme až na výjimky členovce, a na vnitřní (endoparazité), do této skupiny patří prvoci (protozoa) a helminti (Votava et al., 2003).

**Hostitel** je organismus, v němž probíhá vývoj parazitů. Tento vývoj může být jak pohlavní, tak nepohlavní. Hostitelem může být každý živý organismus. V hostiteli dosahuje parazit pohlavní zralosti a reprodukce (Votava et al., 2003).

Živočich, ve kterém proběhne jen část vývoje parazita, ale nedojde k pohlavní zralosti, se nazývá **mezihostitel**. V tomto organismu se většinou vyvíjejí invazivní stádia, vyvolávající po proniknutí do hostitele infekci. Mezihostitele aktivně přenášející vývojová stádia parazitů, např. při sání krve, nazýváme **vektory (přenašeče)** (Votava et al., 2003).

**Paratenický hostitel (transportní hostitel)** je živočich, ve kterém žádný vývoj parazit neprodělavá. V tomto hostiteli se kumulují infekční stádia, přežívající i delší dobu, aniž by ztratila schopnost vyvolat novou nákazu (Votava et al., 2003).

Napadení makroorganismu prvoky se označuje **infekce**, v případě mnohobuněčných parazitů se častěji používá **infestace** (Votava et al., 2003).

Obor, zabývající se infekcemi člověka, které vyvolávají živočišné organismy (prvoci, helminti a členovci), je **lékařská parazitologie**. Ta bývá součástí lékařské mikrobiologie, jelikož některé formy parazitů nebo stádia jsou pozorovatelná pouze mikroskopem a k jejich diagnostice se používají podobné metody (Votava 2003).

Lékařská parazitologie se dělí do tří oborů a to na *lékařskou protozoologii*, studující medicínsky významné prvoky, *lékařskou helmintologii*, která se zabývá studiem parazitických helmintů a na *lékařskou entomologii*, ta studuje lékařsky významné členovce (Jílek et al., 1996).

Patogenita parazita je dána vlivem samotného parazita, ale i reakcí hostitelského organismu na jeho přítomnost. Většinou platí, že parazité s dlouhodobou historií soužití s člověkem jsou méně patogenní. Prvoci a helminti patří do skupiny parazitů tělních tkání nebo dutin. Členovci jsou většinou parazité tělních povrchů. Onemocnění vyvolaná parazity mohou být pouze mezi zvířaty (cyklus zvíře-zvíře, eventuálně zvíře-přenašeč-zvíře) nebo pouze mezi lidmi (cyklus člověk-člověk, eventuálně člověk-přenašeč-člověk), ale mohou přecházet i ze zvířete na člověka (cyklus zvíře-člověk, eventuálně zvíře-přenašeč-člověk). Na doporučení Světové zdravotnické organizace (WHO) lékařská parazitologie označuje všechna onemocnění, která jsou přenesena ze zvířat na člověka jako zoonózy (Bednář et al., 1996).

Z jedněch nejčastěji celosvětově rozšířených nemocí jsou u člověka právě onemocnění vyvolaná parazity. V tropických oblastech jsou jimi ohroženy celé populace obyvatel, proto jim velkou pozornost věnuje i Světová zdravotnická organizace (WHO). Mezi nejvýznamnější parazitická onemocnění patří: filarióza, leishmanióza, malárie, schistosomóza a trypanosomóza. S velkým rozvojem cestovního ruchu se u cestovatelů můžeme setkat s těmito nákazami i u nás. V našich klimatických podmínkách se nejčastěji objevují střevní parazitární nákazy (Votava et al., 2003). Parazitární onemocnění můžeme rozdělit na kosmopolitně rozšířená, omezená na určitý typ klimatu nebo určitý typ sociálního prostředí člověka (úroveň hygieny, typ potravy, chov domácích zvířat apod.). Oportunní parazité jsou takoví, kteří běžně člověka nenapadají, ale mohou být parazity u lidí za určitých okolností, např. u stavu imunitní nedostatečnosti při infekci virem HIV, který způsobuje AIDS (Bednář et al., 1996).

Nejčastější vstupní branou infekce parazity je zažívací trakt, kdy se člověk nakazí stádiem některých parazitů. Tyto nákazy velmi souvisejí s hygienickou úrovní lidské společnosti a dostupností čisté vody. Dalším zdrojem infekce parazity je potrava, která obsahuje vývojová stadia parazitů, nákazy často odrážejí kulinařské zvyky určitých etnických skupin. Další skupina parazitů proniká do lidského těla přímo pokožkou. Jiní parazité jsou přenašeni na člověka hmyzími přenašeči. Infekční stadia těchto parazitů

jsou obsažena ve výkalech přenašeče nebo v jeho sacím ústrojí. Prevence parazitárních nálezů vychází především ze znalosti geografického rozšíření parazitů, jejich biologie i znalosti biologie jejich přenašečů. Důležitým aspektem je také vlastní preventivní opatření, ale i obecná opatření sociálního charakteru (Bednář et al., 1996).

### 3. Rozdělení původců parazitárních onemocnění

Lékařská parazitologie se zabývá studiem jednobuněčných organismů v rámci systému protozoí a mnohobuněčných živočichů, které reprezentují helminti a členovci (Jílek et al., 1995).

#### 3.1. Protozoa

Protozoa neboli prvoci jsou jednobuněčné heterotrofní eukaryotické organismy. Obsahují orgány, které jsou typické pro eukaryoty. Mezi ně patří cytoplazmatická membrána, jádro s jadérkem, mitochondrie, ribozomy, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum, systém potravních a trávicích vakuol (fagozomy, lysozomy). Některé mají chloroplast a mohou mít i specifické orgány (např. kinetoplast u bičíkatých, dvě jádra u obrvených, hydrogenosom u trichomonád) a struktury, které souvisejí s parazitickým způsobem života (např. přísavka lamblíí). Prvoci nemají buněčnou stěnu, pouze některé skupiny (např. nálevníci) obsahují vnější obal petikulu, která je složená z glykoproteinů nebo polysacharidů (Bednář et al., 1996; Jílek et al., 1995; Votava et al., 2003; Votava et al., 2010).

Typické pro protozoa je aktivní pohyb, k čemuž jim napomáhají orgány pohybu, bičíky a brvy. Měňavkovitý pohyb pomocí panožek se nachází u améb a některých bičíkovců, kteří využívají tento systém i k získávání potravy (Bednář et al., 1996; Jílek et al., 1995; Votava et al., 2003; Votava et al., 2010).

U prvoků se setkáváme jak s rozmnožováním pohlavním, tak nepohlavním. Nepohlavní rozmnožování reprezentuje binární dělení, většinou podélné. Pro nálevníky je charakteristické příčné dělení nebo pučení. Merogonie neboli mnohonásobné dělení je typické pro výtrusovce. Se sexuální reprodukcí se setkáváme méně často. Nachází se například u některých bičíkovců a nálevníků.

Mnoho prvoků vytváří vysoce odolné, silnostěnné klidové formy nazývané cysty. Oocysta je cysta vzniklá na základě zygoty. Aktivní formy prvoků se označují jako trofozoit. U různých rodů a druhů prvoků se setkáváme i s dalšími pojmy, popisující jednotlivá stádia (např. sporozoit, merozoit, tachyzoit). Velikost prvoků, kteří napadají člověka, se pohybuje v rozmezí od necelých 2 $\mu$ m (spory mikrosporidií) do více než

100 $\mu$ m (*Balantidium coli*) (Bednář et al., 1996; Jílek et al., 1995; Votava et al., 2003; Votava et al., 2010).

V dnešní době víme, že protozoa parazitují u člověka ve střevním traktu (*Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*), v urogenitálním traktu (*Trichomonas vaginalis*), v centrálním nervovém systému (*Toxoplasma gondii*, volně žijící měňavky), v krevním a lymfatickém systému (trypanosomy, leishmanie, plasmodia, babesie) a v tkáních různých orgánů (*Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*) (Bednář et al., 1996; Jílek et al., 1995; Votava et al., 2003; Votava et al., 2010).

### 3.2. Helminti

Mezi dvě hlavní skupiny helmintů, které vyvolávají onemocnění člověka nazývané helmintózy, patří kmeny ploštěnci (Platyhelminthes) a hlístice (Nematoda). Ploštěnci zahrnují dvě významné třídy: motolice (Trematoda) a tasemnice (Cestoda). Obě třídy mají na průřezu zploštělé tělo, u tasemnic je navíc tělo ještě článkované. Kmen hlístic se vyznačuje válcovitým nečlánkovaným tělem. Společným rysem helmintů je bilaterálně souměrné tělo a různě uzavřený kožně svalový vak. Dospělí helminti jsou součástí skupiny endoparazitů, kteří cizopasí většinou ve střevě, játrech, plicích, v krevním nebo lymfatickém řečišti. Jejich vývojová stádia navíc velmi často migrují v různých částech těla, než dosáhnou své definitivní lokalizace. Z tohoto důvodu často vyvolávají velmi závažná onemocnění hostitelů, ale také mezihostitelů. Mohou poškozovat mechanicky nebo toxickými zplodinami. Mechanicky poškozují tkáň svých hostitelů činností háčků, přísavek, tlakem na okolní tkáň, snižováním průchodnosti střev a další. Dále poškozují hostitele produkty svého metabolismu, toxicky působící na nervovou soustavu a krevní systém, kde mohou způsobovat anémii. Helminti také připravují hostitele o živiny a vitamíny. Pokud žijí v zažívacím traktu, způsobují poruchy příjmu potravy. Přítomnost dospělých helmintů, ale i jejich vývojových stádií vyvolává řadu reakcí imunitního systému jak na buněčné, tak na tkáňové a humorální úrovni. Helmintózy probíhají většinou chronicky, onemocnění jsou vleklá a dlouhotrvající. Typické pro ně bývají imunopatologické změny, zejména vysoká eozinofilie a zvýšená hladina IgE (Votava et al., 2003; Votava et al., 2010).

### 3.3. Členovci

Název je odvozen od článkovaného těla. Články se sdružují na tři hlavní části a to na hlavu, hrud' a zadeček. Dalším znakem jsou článkované končetiny. Tělo členovců je tvořeno vnější kostrou, jejíž hlavní složkou je chitin. Tato kostra chrání měkké části těla a upíná se na ni svalstvo. Mají dobře vyvinutou trávicí soustavu, která je trubicovitá, otevřenou oběhovou soustavu s bezbarvou krevní tekutinou hemolymfou a žebříčkovou nervovou soustavu. Členovci dýchají celým povrchem těla, žábrami nebo trachejemi. U většiny členovců jako vylučovací orgán fungují metanefridie, ale u některých skupin jsou to i malpighické trubice. Vývoj probíhá od vajíčka přes larvu a případná další stádia (nymfu, kuklu apod.) k dospělci. Většina paraziticky žijících členovců jsou ektoparazité, menší část zaujímají endoparazité. Ektoparazitismus je spojen s hematofágií (sání krve). Rozdělení hematofágů je na obligátní a fakultativní. Obligátní hematofágové využívají alespoň v jednom ze svých vývojových stádií krev jako výluční zdroj potravy. Tito členovci mají bodavé a sací ústrojí a krev získávají aktivně sáním. Krev jako doplňkový zdroj potravy je typický pro fakultativní hematofágy a získávají ji pasivně. Člověka mohou nepříznivě ovlivňovat několika způsoby:

1. přímí cizopasníci (zákožka svrabová)
2. přenašeči nález (především hematofágní členovci)
3. původci intoxikací (bodavý a savý hmyz)
4. původci alergií (roztoci)
5. obtížní a hygienicky závadní (znečišťování prostředí) (švábi)

(Jílek et al., 1995; Votava et al., 2003; Votava et al., 2010).

Členovci vylučují slinami při bodání, štípání a sání antikoagulační látky, které způsobují alergické stavy a intoxikace. Také jsou tyto látky důležité při přenosu infekčního agens. Přenos nákazy může být mechanický nebo biologický. Mechanický způsob je pasivní, kdy původce onemocnění přežívá na povrchu těla nebo v trávicím traktu přenašeče a není třeba, aby se v něm množil a vyvíjel. Aktivní nákazou je biologický způsob přenosu, infekční agens se v přenašeči pomnoží nebo prodělá určitý vývojový cyklus, než je přenesen na dalšího hostitele (Jílek et al., 1995; Votava et al., 2003; Votava et al., 2010).

## 4. Diagnostika parazitóz

### 4.1. Přímý průkaz

Morfologický průkaz je hlavní parazitologickou diagnostickou metodou v průkazu parazita v určitém klinickém materiálu. Tato metoda se dělí na makroskopii a mikroskopii. Příkladem makroskopického průkazu jsou články (proglotidy) nalézané u napadených jedinců ve stolici. V parazitologii se však většinou používá mikroskopický průkaz, u kterého se připravuje nativní preparát z izolovaného materiálu nebo tkáně. Další metodou přímého průkazu parazita v klinickém materiálu jsou komerční soustavy na určení parazitárních antigenů. Tyto soustavy se také označují jako ELISA kity a jsou založené na detekci proteinů a peptidů, které obsahují jednotliví parazité, jako například *Plasmodium*, *Entamoeba*, *Giardia*, *Cryptosporidium*. V poslední době se pak uplatňuje také technika polymerázové řetězcové reakce (PCR, Polymerase Chain Reaction). Jedná se o molekulárně biologickou metodou, která se využívá k průkazu přítomnosti konkrétního úseku nukleové kyseliny. Dále se využívá kultivace (*Trichomonas vaginalis*, kultivační média doplněna o koňské nebo beraní inaktivované sérum) (Pazdziora, 2011), histologická vyšetření, zobrazovací metody (tomografie, rentgen, nukleární magnetická rezonance, ultrasonografie) (Melter et al., 2014; Votava et al., 2010), zvýšený počet eosinofilů (cytotoxická reakce na imunitní odpověď vyvolaná alergeny nebo parazitární infekci), ELISA (kvantitativní stanovení různých antigenů), pokus na zvířeti se provádí jen výjimečně (Votava et al., 2010).

### 4.2. Nepřímý průkaz

Při těchto průkazech se pouze stanovují protilátky. Nepřímé průkazy se používají k diagnostice protozoóz a helmintóz. U nás se hlavně jedná o sérologické vyšetření toxoplazmózy. Dále se používá u exotických nákaz. Průkaz protilátek však přináší problém s rozlišením stádia infekce, tedy zda se jedná o nákazu akutní, chronickou, nebo zda onemocnění již zcela odeznělo (Votava et al., 2010).

Přehled přímých i nepřímých vyšetřovacích metod pro všechny tři hlavní skupiny parazitů je uveden v tabulce 1.



**Tab. 1:** Přehled nejčastějších vyšetřovacích metod

<b>Prvoci</b>	<b>Helminti</b>	<b>Členovci</b>
mikroskopie	mikroskopie	mikroskopie
tlustá kapka	tlustá kapka	makroskopie
tenký roztěr dle Giemsy nativní preparát nativní preparát C.A.T.	tenký roztěr dle Giemsy nativní preparát makroskopie	kožní testy
barvení dle Gomoriho	identifikace červů ve tkáni	
barvení dle Miláčka	histologie	
barvení dle Ziehla-Neelsena	tlustý nátěr dle Kato	
mikrobiální obraz poševní	Faustova flotační metoda	
histologie	Grahamova metoda	
tlustý nátěr dle Kato	zobrazovací metody	
Faustova flotační metoda	sérologie	
PCR	ELISA	
stanovení protilátek IHA		
ELISA		
kultivace		
KFR		

C.A.T. – Transportní půda: soustava Candida a Trichomonas, PCR – Polymerázová řetězová reakce, IHA – Indirect hemagglutination, ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay, KFR – Komplement fixační reakce Převzato z: Alberts et al. (2005), upraveno

### 4.3. Odběr klinického materiálu

K průkazu parazitární infekce jednotlivými metodami se používají různé druhy klinického materiálu. Důležité je zachovat podmínky odběru, zvolení správné odběrové soupravy, množství odběrového materiálu, maximální skladovací délku, teplotu při transportu. Přehled klinického materiálu, způsobu odběru a onemocnění je uvedeno v tabulce 2.

**Tab. 2:** Přehled klinického materiálu odebíraného k parazitologickým vyšetřením

<b>Materiál</b>	<b>Odběr</b>	<b>Infekční agens, onemocnění</b>
<b>stolice</b>	stolice velikosti lískového až vlašského ořechu, zpravidla tři vzorky odebrané tři dny po sobě nebo obden, plastová nádobka s lopatičkou, uchovávat v chladničce max. 2 dny	askaridóza, taenióza, schistosomóza, ankylostomóza, strongyloidóza, a další.
<b>perianální otisky</b>	odběr ráno před defekací a umytím, průhledná lepicí páska na podložním skle, uchovávat při pokojové teplotě	enterobióza, taenióza
<b>moč</b>	sterilní plastická zkumavka – poslední porce moče, odběr mezi 12.-15. hodinou, sediment	schistosomóza, trichomonóza
<b>sputum</b>	širokohrdlá uzavíratelná zkumavka, ne sliny	askaridóza, echinokokóza, paragonimóza, strongyloidóza
<b>vaginální sekret, uretrální sekret</b>	stěr ze zadní klenby poševní, nátěr na podložní sklo, naočkování transportního média	trichomonóza
<b>duodenální šťáva</b>	2-5 ml do sterilní uzavíratelné zkumavky, transport při 37 °C, nejlépe ihned vyšetřit	giardióza, ankylostomóza, fasciolóza, strongyloidóza
<b>likvor</b>	1-2 ml likvoru asepticky do sterilní uzavíratelné zkumavky, nejlépe ihned vyšetřit	neglerióza, toxoplazmóza, trypanosomy
<b>bioptický materiál</b>	punktáty (jaterní absces, slezina tkáňový mok, lymfatické uzliny), seškraby (kůže, rohovka, střevní a děložní sliznice), excize (kůže, svalovina, lymfatické uzliny), pitevnický materiál	leishmaniózy, trichinelózy, filariózy
<b>parazitologicky suspektní útvary</b>	různá stádia parazitů a jejich části	články tasemnice, dospělí helminti, členovci
<b>krev</b>	tlustá kapka: kapka krve z bříška prstu, tenký roztěr: kapka krve z bříška prstu, nativní preparát	malárie, trypanosomy, babesie, leishmanie, mikrofilárie
<b>sérum</b>	4-10 ml venózní krve do sterilních zkumavek, sérum se separuje, může být uchováváno mražením, poštou se zasílá již separované sérum	toxoplazmóza, toxokaróza, extraintestinální amébióza

Převzato z: Votava et al. (2010)

## 5. Mikroskopické metody

Mezi mikroskopické metody řadíme nativní preparát, krevní roztěry, flotační a sedimentační metody a barevné preparáty (Melter et al., 2014). Řada preparátů v mikroskopických metodách musí být před vlastním vyšetřením fixována (Jírovec, 1954).

### 5.1. Fixování biologického materiálu

U některých mikroskopických metod není vhodné diagnostikovat parazita z nativního preparátu (viz níže) a je třeba provést fixaci. Ta se používá u tenkého roztěru, vlhkého roztěru a barvení. Fixace znamená parazita usmrtit a potom obarvit. Používají se různé fixační roztoky, které zachovávají původní tvar parazitů a barvitelnost (Jírovec, 1954).

### 5.2. Používané fixační roztoky v parazitologii

Formalin fixuje velké objekty v celku, proto se používá i ke konzervaci. Biologický materiál v něm může zůstat dlouho. Formalin dobře fixuje tuk ve tkáních (Jírovec, 1954).

Ethanol se používá nejčastěji k fixování helmintů a členovců. Používaná koncentrace ethanolu je 70-96%. Silný ethanol v tkáních velice dobře fixuje glykogen (Jírovec, 1954).

Methanol má využití k fixování krevních roztěrů například k diagnostice malárie (Jírovec, 1954).

Sublimát-alkohol podle Schaudinna, tato fixační tekutina se skládá z vodného sublimátu (chlorid rtuťnatý) a alkoholu. Je možné přidat i kyselinu octovou a zahřát tuto směs na 60°C. Omývá se 70% alkoholem, do kterého se přidávají kapky jodové tinktury k odstranění sublimátové sraženiny. Zbylý jod se vymývá roztokem sírnatanu sodného. Tato fixační tekutina se především používá k fixování vlhkých roztěrů (Jírovec, 1954).

Sublimát (chlorid rtuťnatý) jsou bílé krystalky velmi dobře rozpustné ve vodě a alkoholu. Jedná se o jedovatou fixační látku. Používá se ve směsích s kyselinou octovou nebo alkoholem. Dobře fixuje jádro a zachovává barvitelnost tkání (Maratová, 2016).

Zenkerova tekutina je směs dvojchromanu draselného, síranu sodného, sublimátu (chlorid rtuťnatý) a destilované vody. Před použitím se přidává kyselina octová nebo formalin. Biologický materiál se fixuje asi šest hodin a pak dochází k vymývání vodou. Potom se preparát ponořuje do alkoholové řady, která začíná 60% alkoholem. Sublimátové sraženiny se odstraňují jodovou tinkturou, která je přidána do 70% alkoholu. Velmi dobře se s ní fixují jádra a zachovává barvitelnost (Jírovec, 1954).

Bouinova tekutina se skládá z destilované vody, kyseliny pikrové, formalinu a kyseliny octové. Vymývá se opět 70% alkoholem (Jírovec, 1954).

Flemingova tekutina fixuje výborně plazmu buněk, tuky se barví černě, ale snižuje barvitelnost jader. Skládá se z kyseliny chromné, kyseliny osmičelé a kyseliny octové (Jírovec, 1954).

Kyselina osmičelá našla využití k fixování suchých rozměrů u diagnostiky bičíkoviců (Jírovec, 1954).

Carnoy tekutina vniká velmi rychle do organismů, používá se hlavně k fixaci členovců. Tato fixační tekutina je složena z chloroformu, ledové kyseliny octové a alkoholu. Malé objekty k fixování se fixují pouze deset až třicet minut, pak se přenesou do 96% alkoholu a zalévají se do parafínu (Jírovec, 1954).

### 5.3. Typy preparátů užívaných v mikroskopických metodách

#### *Nativní preparát*

Na podložní sklíčko se nanese malé množství biologického vzorku, který se naředí fyziologickým roztokem. Tato suspenze se přikryje krycím sklíčkem. Pod mikroskopem se hledají prvoci a cysty. Nejčastěji se nativní preparát využívá při průkazu střevních parazitů ve stolici (Votava et al., 2010). Po přidání Lugolova roztoku, který se skládá z jodu, jodidu draselného a destilované vody, dojde k usmrcení prvoků. Pak lze pozorovat bičíky, obarvené vakuoly, zrna glykogenu a další struktury (Jírovec, 1954).

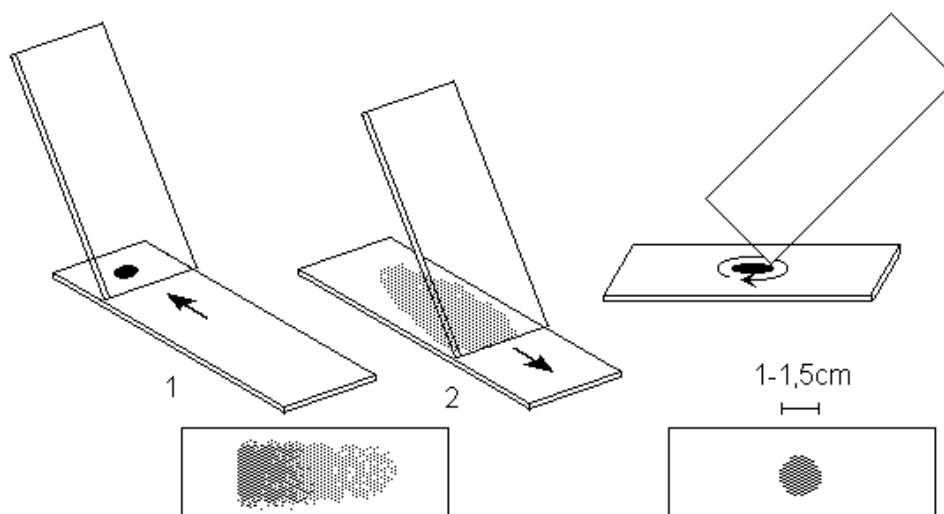
## Roztěry

### *Thustá kapka*

Na podložní sklíčko se kápne třetí až čtvrtá kapka krve. Rohem jiného podložního sklíčka se kapka krve roztáhne do tvaru skvrny o průměru 1-1,5 centimetru (viz Obr.1). Při laboratorní teplotě se nechá zaschnout patnáct minut. Je důležité dbát na to, aby roztáhlá vrstva krve nebyla příliš silná, protože se takový preparát velice špatně prohlíží pod mikroskopem a během barvení by mohlo dojít k odloupení krve (Votava et al., 2010).

### *Tenký roztěr*

Kapka krve se nanese na podložní sklíčko a druhým podložním sklíčkem, které je v úhlu 45° od sklíčka s kapkou krve, se provede roztěr (viz Obr.1). Roztěr by měl být jednovrstevnatý a homogenní. Správně udělaný tenký roztěr schne okolo pěti minut (Votava et al., 2010).



**Obr.1** Tenký roztěr (vlevo) a tlustá kapka (vpravo) Převzato z: Rozsypal H. (2017)

Zaschlý krevní roztěr, který není fixovaný, se převrství deseti kapkami roztoku May-Grünwald. Roztok je složen z eosinátu methylenové modře v metylalkoholu. Tento roztok zároveň fixuje. Do barvicího roztoku, nacházející se na krevním roztěru,

se po třech minutách nakape deset kapek destilované vody a opatrně se roztok promísí. Nechá se působit po dobu jedné minuty, pak se vzniklý roztok slije a bez opláchnutí se nanese zředěný Giemsa roztok. Toto barvivo se skládá z methylenové modře, eosinu a azuru v glycerolu a methanolu. Preparát se barví deset až třicet minut. Po obarvení se opláchnou vodou a nechá se zaschnout. Metoda, nazývaná panoptická, dobře barví krevní elementy a krevní parazity (Jírovec, 1954).

Krevní roztěry lze také barvit dle Giemsy-Romanowského. Obarvená tlustá kapka slouží především k určení, zda se nacházejí nebo nenacházejí ve vyšetřovaném vzorku krevní parazitě. Způsob provedení obarvení tlusté kapky je následující. Preparát s připravenou tlustou kapkou se v laboratoři nefixuje, ihned se barví Giemsy-Romanowského barvivem. Barvení trvá dvacet minut. Poté se musí dbát na opatrné smývání barvicího roztoku z podložního sklíčka. Zhotovený preparát se prohlíží pod mikroskopem při zvětšení 1000x. Příprava preparátu s obarveným tenkým roztěrem je odlišná od obarvení tlusté kapky. Tenký roztěr je třeba nejdříve v laboratoři zafixovat methanolem po dobu jedné minuty. Pak se teprve může barvit Giemsy-Romanowského barvivem po dobu třiceti až čtyřiceti minut. Nejvhodnější místo k pozorování pod mikroskopem při zvětšení 1000x je konec roztěru, zde se nachází místo s nejtenčím roztěrem krve v celém preparátu. Tenký roztěr především slouží k určení druhu a stádia parazita. Pokud se jedná o malarická plazmódia, která se nacházejí uvnitř erytrocytů, tak lze u těchto případů vypočítat procento infikovaných krvinek (parazitémie) (Votava et al., 2010)

### ***Vlhký roztěr***

Pro průkaz některých parazitů, například střevní měňavky, je třeba zhotovit roztěr, který se fixuje za vlhka a další manipulace se provádí bez zaschnutí roztěru. V těchto případech je suchý roztěr nevhodný, protože se struktury některých druhů parazitů změni tak, že nejsou pod mikroskopem identifikovány. Vyšetřovaný biologický materiál se nanese na krycí sklíčko, před zaschnutím se ponoří do roztoku vhodné fixační tekutiny. Potom se provede oplach 70% alkoholem nebo vodou a barví se vhodnou barvicí metodou. Zafixované vlhké roztěry se dají uchovávat v 80% alkoholu. Po obarvení následuje oplach destilovanou vodou, odvodnění 96% a 100% alkoholem a nakonec montování do kanadského balzámu. Během procesu nesmí roztěr zaschnout. Někdy nastane situace, že je biologický materiál velmi řídký a ve fixační tekutině by

mohl uplavat, proto se používá vaječný bílek nebo krevní sérum, ve kterém je vyšetřovaný vzorek rozmíchán. Následně se opět zhotoví roztěr, který je dán do fixační tekutiny a barví se vhodnou barvicí metodou (Jírovec, 1954).

### *Thustý nátěr dle Kato*

Malé množství vyšetřované stolice se nanese na podložní sklíčko a rozetře se do plochy 2x2 centimetrů. Připravené podložní sklíčko se vzorkem se překryje celofánem, který se zlehka přitiskne gumovou zátkou. Celofán je namočený v glycerinu a malachitové zeleni. Třicet minut se nechá preparát stát, aby došlo k projasnění stěn cyst a vajíček. Pod mikroskopem se preparát prohlíží při zvětšení 200-400x (Votava et al., 2010).

## 5.4. Flotační metoda

Metoda se používá k záchytu cyst a vajíček parazitů. Flotační metoda je založena na specifických vahách přidávaných roztoků a vahách parazitárních cyst i vajíček. Parazitární útvary mají nižší hustotu a v husté kapalině flotačního roztoku vyplavou na hladinu, kde je lze různými postupy odebrat a dále studovat. Flotační metody se užívají nejčastěji pro diagnostiku přítomnosti parazitů ze stolice. Existuje řada modifikací flotační metody (Prantlová et al., 2013).

### *Faustova koncentrační metoda*

Při této metodě se nejdříve vzorek stolice homogenizuje ve vodě a centrifuguje dvě minuty při 2000 otáček za minutu. Potom se sediment suspenduje v 33% nasyceném roztoku síranu zinečnatého a opět se centrifuguje. Lehčí vajíčka a cysty vyplavou na povrch a stolice klesne ke dnu. Zkumavka se doplní až po okraj roztokem síranu zinečnatého a na ni se položí krycí sklíčko, aby se dotýkalo hladiny. Po uběhnutí dvaceti minut se krycí sklíčko sejme a položí na podložní sklíčko. Pod mikroskopem se sleduje preparát při zvětšení 200-400x. Faustova metoda se používá k odhalení vajíček helmintů, která jsou lehčí, než částice stolice (Votava et al., 2010).

## *Sedimentační koncentrační metoda*

Tato metoda se používá k záchytu cyst prvoků a vajíček helmintů. Vajíčka některých exotických helmintů, například *Trichuris trichiura*, mohou být naopak těžší než ostatní částice stolice, proto se paralelně s Faustovou koncentrační metodou provádí formol-éterová metoda, což je sedimentační metoda (Votava et al., 2010). Vzorek vyšetřované stolice se rozředí ve fyziologickém roztoku. Potom dojde k několika procesům centrifugace a promývání. K vzniklému sedimentu se přidá nejdříve 4% formaldehyd a pak éter. Dojde k protřepání a opět k centrifugaci. Sediment, který se usadí na dno zkumavky, se odstraní odsáním a prohlíží se pod mikroskopem nebo také slouží k přípravě barevných preparátů (Zeibig, 2013).

### 5.5. Barvení preparátů

Barvení preparátů se provádí pro lepší diagnostiku jednotlivých druhů parazitů. K detekci se používá barvení pozadí, aby lépe vynikla jednotlivá stadia parazitů, ale také dochází k obarvení samotných parazitárních elementů. Sledují se různě barevně zbarvená jádra a plazma parazitů, epitelie, krvinky a leukocyty. Druh barvení je třeba zvolit podle očekávaných druhů parazitů ve vyšetřovaném vzorku. Nejčastější barvení u krevních parazitů se používá dle Giemsy-Romanowského. U střevních parazitů je hlavním barvením dle Gomoriho a Heidenhainovým hematoxylinem (Votava et al., 2010).

#### *Barvení dle Gomoriho (trichromem)*

Na podložní sklíčko se nanese pomocí dřevěné špejle malé množství stolice. Ihned se vzorek fixuje jednu hodinu až jeden den v sublimát-alkoholu. Sklíčko se postupně noří do nádobek se 75% ethanolem na dobu deseti minut a s trichromem znovu na deset minut. Pak se sklíčko opláchne tekoucí vodou a 96% ethanolem. Po oplachu se opět vkládá do nádobek s 96% ethanolem na dobu deseti minut, s karbolxylenem na deset minut a do nádobky s xylenem také na dobu deseti minut. Jestliže se jedná o permanentní preparát, je třeba na vlhký preparát kápnout jednu kapku Solakrylu, překrýt ho krycím sklíčkem a nechat zaschnout. Po dobu celého barvení nesmí nastat situace, že by vzorek vyschl. Pod mikroskopem se prohlíží zhotovený preparát při zvětšení 1000x (Votava et al., 2010).



### *Barvení Heidenhainovým hematoxylinem*

Jednu hodinu je třeba fixovat preparát sublimát-alkoholem. Pak se na dobu pěti minut vloží do nádoby s 70-80% ethanolem. Po vyndání se opláchne skličko destilovanou vodou, po dobu deseti minut se nechá působit molybdenan amonný a znovu se opláchne destilovanou vodou, po hematoxylinu, který se nechává působit deset až dvacet minut, následuje opět oplach destilovanou vodou. Dále se použije na deset minut 70-90% alkohol, karbol-xylen po dobu deseti minut a xylen deset minut. Po obarvení se preparát montuje do Solakrylu. Pod mikroskopem se v preparátu parazité sledují při zvětšení 1000x (Votava et al., 2010).

### *Hematoxylin Delafieldův*

Barvivo se připravuje rozpuštěním hematoxylinu v 96% alkoholu, přidáním 10% amonného kamence. Barvivo se nechá v otevřené nádobě stát na světle po dobu tří až čtyř dnů a pak se zfiltruje. Přidá se glycerol, methanol a následuje uzrání barviva po dobu jednoho až tří týdnů. Preparáty se v tomto barvicím roztoku barví dvě až pět minut. Potom se oplachují pod obyčejnou vodou, ve které zmodrají. Preparáty se dobarví eosinem. V mikroskopu se pozorují modře zbarvená jádra a červená plazma (Jírovec, 1954).

### *Malloryho metoda*

Během tří až deseti minut se preparáty nejdříve barví v karbol-fuchsinu Duro-červení, dále dojde k promytí vodou, moření po dobu pěti minut v kyselině fosformolybdenové a dobarvení, probíhající po dobu jedné až pěti minut v roztoku, který se skládá z oranže-G, anilinové modři, kyseliny šťavelové a destilované vody. Pak se obarvené preparáty rychle odvodní 96% a 100% alkoholem a montují se do kanadského balzámu. Jádro je červené, jádérko oranžové, vazivo modré, plazma se barví v různých odstínech od žluté po modrou a krvinky jsou žluté (Jírovec, 1954).

### *Dominiciho metoda*

Po dobu dvaceti až třiceti minut se preparáty barví ve směsi eosinu a oranže-G. Následuje opláchnutí vodou, barvení v roztoku toluidinové modře po dobu dvou až pěti minut, k tomu, aby jádra zůstala modrá, se používá 96% alkohol, pak dojde k rychlému

odvodnění 100% alkoholem a převedení do kanadského balzámu. Intenzivně modře se barví chromatin v jádrech, červeně až oranžově jádérka, krvinky jsou červené a plazma oranžová (Jírovec, 1954).

### *Mannova metoda v Dobellově modifikaci*

Ve směsi eosinu a methylové modři se barví preparáty po dobu šesti až dvanácti hodin. Pak se provede oplach vodou a diferenciací 80% alkoholem, který obsahuje oranž-G. Následuje odvodnění ve 100% alkoholu a montování do kanadského balzámu. Jádérka jsou po obarvení červená, chromatin v jádrech modrý a červené krvinky jsou ohnivě červené (Jírovec, 1954).

### *Giemsova vlhká metoda*

Roztěry vlhké, fixované sublimát-alkoholem nebo Carnoyovou tekutinou, se opláchnou pod vodou a barví se zředěným Giemsa roztokem. Potom se na preparáty působí acetonem, který diferencuje, a také současně odvodňuje. Preparáty se montují do cedrového oleje. V mikroskopu jsou viděna karmínově červená jádra parazitů, jejich plazma je modrá a jádra buněk z hostitelských těl jsou modrofialová (Jírovec, 1954).

### *Feulgenova nukleární reakce*

Preparáty, které jsou fixované v sublimátové směsi, se hydrolyzují kyselinou solnou po dobu čtyř až osmi minut při 60°C. Následuje oplach ve vodě a nechá se jednu až dvě hodiny působit roztok kyseliny fuchsinsířičité, pak dochází k oplachu preparátů sířičitou vodou, aby došlo k odstranění zbytku kyseliny fuchsinsířičité a nakonec se provede promytí i ve vodě. Preparáty se dobarví světlou zelení, posléze odvodnění 96% alkoholem a montování do kanadského balzámu. Červenofialově je obarven chromatin v jádrech, ostatní komponenty jsou bezbarvé nebo světle zelené (Jírovec, 1954).

### *Barvení dle Giemsy-Romanowského*

Nejdříve se musí preparát na podložním skle zafixovat methanolem po dobu jedné až tří minut. Pak se může barvit 3% barvivem Giemsy Romanowského po dobu třiceti až sto dvaceti minut. V mikroskopu se po té sledují parazité, kteří se obarví světle modře, jádro červeně, leukocyty a epitelie fialově (Votava et al., 2010).

## 5.6. Otisky a punktáty

### *Vyšetření perianálních otisků*

U této metody je důležité, aby si pacient po dobu osmi až dvanácti hodin neumýval oblast konečníku. Jedná se o otisk análního otvoru na průhlednou lepicí pásku. Otisk je nejlépe vhodné provést ráno. Na lepicí pásku ulpí vajíčka roupů a tasemnic. Metoda se používá u dětí, ale i dospělých. V současné době se používá označení jako Grahamova metoda někdy Lepex. V laboratoři se pak páska nalepí na podložní sklíčko a sleduje se pod mikroskopem při zvětšení 100x v celém preparátu. Metoda je vhodná pro stanovení vajíček roupů a tasemnic (Votava et al., 2010).

## 6. Kultivace

Kultivace parazitů v umělých podmínkách je vhodná například za účelem vývoje vakcín, sledování jednotlivých druhů, ale také k možnosti lepší diagnostiky některých druhů. Z prvoků lze kultivovat jen některé druhy (například *Trypanosoma a Entamoeba*), u helmintů je kultivace velmi obtížná, protože ti se dají udržet jen pár dní bez hostitelského těla. Členovci se dají kultivovat a udržovat velice dobře a snadno (Jírovec, 1954).

### 6.1. Kultivace prvoků

Prvoci se kultivují na půdách pevných, tekutých i kombinovaných, kdy pevná složka je vajíčko, krevní sérum nebo sérový agar. Tato složka se nechá ztuhnout ve zkumavce v šikmé poloze. Tekutá složka je buď vaječný bílek, nebo inaktivované krevní sérum, které je naředěno Ringerovým nebo Lockeovým roztokem. Podkladem pro většinu půd je krev nebo krevní sérum. Krevní sérum je nativní nebo se inaktivuje při zahřátí po dobu třiceti až šedesáti minut na 56°C nebo při koagulaci teplotou 70°-80°C. Některé druhy parazitů vyžadují pro kultivaci 37°C, jiným druhům stačí pokojová teplota 20°C. Ke kultivaci se používají různé druhy půd, které se dnes využívají jen zřídka (Jírovec, 1954).

### NNN-agar (Nový-Neal-Nicolle)

Před užitím se agar rozeřeje a po ochlazení na určitou teplotu se přidá defibrinovaná králičí nebo jiná krev. Agar s krví se promíchá, naplní do zkumavek a v šikmé poloze se nechá zatuhnout. Půda se pak očkuje vyšetřovaným materiálem (krev, hnis, punktát z jater nebo sleziny, kostní dřev) (Jírovec, 1954).

### Nöllerův krevní agar

Tato půda se skládá z agaru, dextrosy a bouillonu. Před použitím se agar rozeřeje, ochladí na určitou teplotu a přidá se defibrinovaná koňská krev. Připravená půda se plní do Petriho misek. Nöllerův krevní agar je vhodný ke kultivaci *Leishmanie* a *Trypanosomy*. Jediný patogenní druh rostoucí na této půdě je *Trypanosoma cruzi* (Jírovec, 1954).

### Razgha-Reichenowova kultivační půda

Skládá se ze sterilního Ringerova roztoku a citrátové lidské krve. Vzniklá půda se očkuje kapkou vyšetřované krve. *Trypanosoma gambiense* se kultivuje na této půdě. Pokud se přidá k základu kultivační půdy glukosa, lze kultivovat i druh *Trypanosoma cruzi* (Jírovec, 1954).

### Dorset-Sautetova vaječná půda

Vajíčko s Ringerovým roztokem se protřepe, naplní do zkumavek a v šikmé poloze se položí k zahřátí. Vzniklá tuhá vrstva se převrství směsí Ringerova nebo Lockeova roztoku s vaječným bílkem či krevním sérem (Jírovec, 1954).

### Dobell-Laidlawovo koagulované sérum

Vzniká z lidského nebo koňského séra smíchaného s Ringerovým roztokem. Tato část se nechá koagulovat v šikmé poloze při 70°-80°C. Šikmá vrstva se převrství zředěným vaječným bílkem nebo sérem. Zředění se provede pomocí Ringerova nebo Lockeova roztoku (Jírovec, 1954).

### Westphalův sérový agar

Tuhá složka je složena z agaru, který obsahuje pepton, a lidského krevního séra. Kultivační půda se nechá nejdříve koagulovat a potom ztuhnout v šikmé poloze.

Pevná složka se převrství lidským nebo koňským sérem zředěným Ringerovým roztokem, vzniklý roztok se zahřívá po dobu třiceti minut. Koagulát se roztřepe v Ringerově roztoku a destilované vody, znovu se zahřeje a po zchladnutí se zfiltruje (Jírovec, 1954).

Kultivace parazitárních prvoků se stále používá, protože poskytuje informace o vývoji parazita, ale také informace o vymýcení jednotlivých parazitů a tím i onemocnění, která způsobují. Kultivace je důležitá z několika důvodů. I v dnešní době slouží jako doplněk k diagnostice určitého druhu parazita. Dále se používá k výrobě antigenů pro výrobu monoklonálních a polyklonálních protilátek v imunologických testech. Díky kultivaci se dají identifikovat specifické proteiny, které se používají k vývoji monoklonálních protilátek proti parazitární invazi. Další využití je v screeningu léků, výrobě a účinnosti vakcín, při vývoji molekulární epidemiologie a ve studiu biochemie, fyziologie, metabolismu a nutričních požadavků jednotlivých druhů parazitů (Visvesvera et al., 2002).

V dnešní době se hlavně používají tři typy kultivačních médií. Xenická kultura pro primární růst parazitů. Parazité se chovají ve spojení s neznámou mikrobiální flórou. Například vyšetřované vzorky stolice na *Entamoeba histolytica*. Monoxenická kultura se používá k primárnímu růstu, ale také k přechodné fázi v izolaci. Parazité jsou chováni s konkrétním druhem bakterie. Tato kultura se používá k získání druhů *Acanthamoeba*. Axenická kultura slouží především jako izolační médium, ale také k primárnímu růstu. Jedná se o zcela čistou kulturu pro *Trichomonas vaginalis* (Ahmed, 2014).

## 6.2. Kultivace členovců

Členovci se dají v laboratorních podmínkách snadno kultivovat. Dbá se pouze na dostatečnou vlhkost, a zda daný druh vyžaduje úplnou tmou nebo pološero. Používají se k tomu většinou zkumavky s rovným dnem a širokým hrdlem. Zkumavky se pak vkládají do skleněných válců, pod které se umísťuje buď navlhčená vata, pokud se jedná o druhy vlhkomilné, nebo suchá vata, když to jsou druhy suchomilné. Takto se kultivují roztoči, vši, blechy, ploštice, dvoukřídli, jedovatí a hygienicky závadní členovci. Skleněný válec se pak překryje vlhkým hadrem nebo víčkem tak, aby byl zajištěn přísun vzduchu (Jírovec, 1954).

## 7. Molekulární diagnostika

Do biologických oborů se zařadily metody na molekulární úrovni. Tyto metody se hlavně používají v oboru klinické medicíny. Dále své opodstatnění mají u diagnostiky neinfekčních onemocnění (onkologických, hematologických, genetických), infekčních a parazitárních (Ditrich, 2013).

Pro průkaz parazitárních onemocnění je vhodné (i přes nespornou citlivost) kombinovat molekulární diagnostiku s dalšími diagnostickými metodami, mezi které patří koprologie, histologie, sérologie, mikroskopie a zobrazovací metody (tomografie, rentgen, nukleární magnetická rezonance, ultrasonografie) (Votava et al. 2010; Ditrich, 2013). Kombinace metod snižuje riziko chybného výsledku. Molekulární diagnostika je u parazitologie efektivní a přínosná zejména tam, kde tradiční metody selhávají. Proto lze očekávat, že se bude nadále zdokonalovat (Ditrich, 2013).

Molekulární diagnostika se používá v případech, kdy je citlivost klasických metod nízká, když jsou klasické metody metodicky a časově náročné, jestliže nelze morfologicky určit druh nebo je třeba parazita přesněji zařadit (genotypizace), u vzorků s velmi nízkou koncentrací parazita, v archeologickém materiálu a pokud po diagnostice následuje výzkum (Ditrich, 2013).

Nevýhodou této techniky je velmi vysoká citlivost, pohybuje se ve vyšších řádech, než tomu je u klasických metod, pokud PCR (polymerázová řetězová reakce) detekuje mikrosporidie ve stolici nebo moči, nelze s určitostí říci, zda se jedná o bezpříznakovou infekci nebo onemocnění. Vysoká citlivost souvisí s rizikem kontaminace a poté i nebezpečím falešně pozitivního výsledku. Můžeme se setkat i s falešně negativním výsledkem, pokud ve vyšetřovaném materiálu je přítomen nějaký inhibitor polymerázy (heparin, močovina, složky hnisu). Aby se předešlo těmto falešně negativním nebo falešně pozitivním výsledkům, je třeba současně provádět interní kontrolu. Tu představuje amplifikace syntetického oligonukleotidu přidávaného ke vzorku. Pokud ani zde neproběhne amplifikace, jedná se o selhání reakce. Dalším úskalím molekulární diagnostiky je neschopnost rozeznat živého a mrtvého parazita.

Toto je zejména důležité v případech, kdy mohou mrtví parazité a jejich zbytky dlouhou dobu zůstat v tkáních nebo cirkulovat krevním řečištěm (Ditrich, 2013).

Riziko kontaminace je třeba snižovat už při odběru materiálu. Je tedy důležité klást velký důraz na čistotu, sterilitu, používání rukavic a v některých případech roušek. Největší riziko kontaminace je však při zpracování materiálu v laboratořích. Jedná se zejména o nedostatečně umyté a DNA kontaminované nádoby, nástroje a zásobní roztoky. Je proto nutné používat takové postupy, které kontaminaci předcházejí. U PCR lze kontaminaci předejít velmi opatrným zacházením, UV zářením typu C, které má vlnovou délku pod 280nm, poškozují DNA, proto se používají baktericidní zářivky v dekontaminačních boxech, používáním gelových a membránových filtrací, které zachytávají podle velikosti filtru kontaminující částice (Ditrich, 2013; Rosina et al., 2013). Boxy s laminárním prouděním vzduchu a oddělené úseky laboratoře zamezují vzdušné kontaminaci (Ditrich, 2013).

Pro molekulární diagnostiku je důležité správně fixovat a uchovávat vzorky používané následně pro izolaci DNA. Velmi dobře se izoluje DNA ze vzorků živých, zmrazených nebo fixovaných ethanolem. Většina živých vzorků se však špatně uchovává. Výjimku tvoří oocysty kokcií nebo kryptosporidií, které v roztoku dvojchromanu draselného lze dlouhodobě uchovávat a také tento roztok zamezuje množení jiných mikroorganismů. U zmrazeného vzorku by nemělo docházet k opakovatelnému rozmrazování a zmrazování. Nejčastější metodou, jak dlouhodobě uchovávat vzorky pro následnou izolaci DNA, je fixace ethanolem. Ethanol vzorek odvodní a konzervuje. K fixaci se používá ethanol alespoň o koncentraci 70%, lépe však koncentrovanější. Pro molekulární metody není vhodná fixace formalínem a dalšími roztoky, které obsahují glutaraldehyd či formaldehyd. Je řada postupů, jak DNA izolovat ze vzorků fixovaných formalínem, ale je třeba počítat s tím, že DNA by mohla být poškozená (Ditrich 2013).

## 7.1. PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR; *polymerase chain reaction*) byla vyvinuta v roce 1983, její vynálezce Kary Mullis za ni dostal v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii. Díky této metodě je rychle a velmi selektivně možné namnožit sekvenci nukleotidů, která se nachází v DNA. Metodu PCR lze využít k namnožení genu i

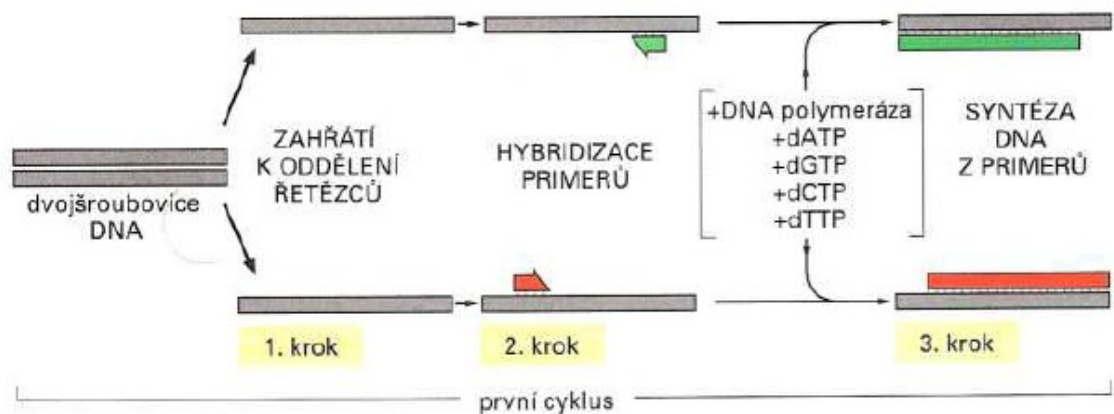
z velmi malého množství DNA, ale také k diagnostice. V diagnostice se využívá gen pro 18s rRNA, který je v genomu několikrát a to i v těch nejmenších organismech. Je vhodný pro identifikaci druhu a rodu a také se využívá ve fylogenetice. (Alberts et al., 2005).

### *Princip metody PCR*

PCR využívá enzym DNA-polymerázu k opakovatelnému kopírování a postupnému namnožení vybraného úseku templátové molekuly DNA. Oligonukleotidy (primery) slouží k syntéze DNA. Používají se vždy sady dvou primerů – reverse a forward. Ty se párují na začátku a na konci amplifikovaného fragmentu s templátovou DNA, každý ale s jiným vláknem z původní dvoušroubovice DNA. Díky primerům DNA-polymeráza nasyntetizuje (v závislosti na počtu cyklů) několik miliard kopií dané sekvence. Počet kopií závisí na počtu cyklů PCR dané sekvence. Tato metoda je velmi citlivá tím, že je schopna detekovat i jedinou kopii DNA ve vzorku, pomocí amplifikace této sekvence do takové míry, že lze zjistit její přítomnost po provedení separace gelovou elektroforézou a obarvením. Pro vlastní diagnostiku musí být navržené primery druhově specifické (Alberts et al., 2005).

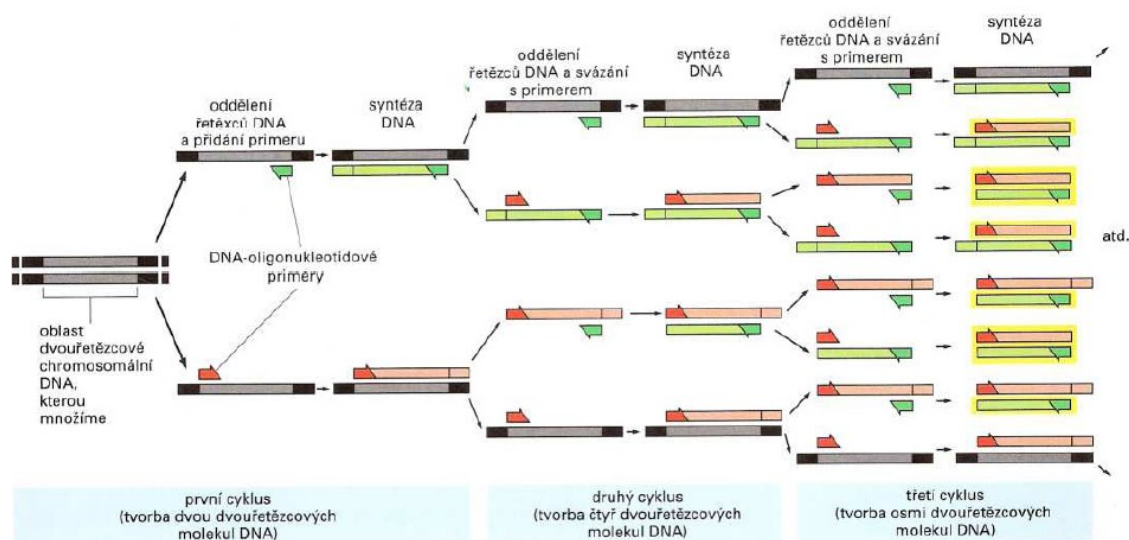
Popis amplifikace DNA molekulární metodou PCR: Na začátku cyklu je třeba nejdříve od sebe oddělit řetězce dvoušroubovice DNA zvýšením teploty. Po denuraci následuje ochlazení reakční směsi s nadbytkem obou primerů. Ty nasedají na komplementární sekvence DNA. Za přítomnosti DNA-polymerázy a deoxiribonukleosidtrifosfátů (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) se syntetizují za účasti obou primerů řetězce DNA (viz Obr. 2). Tyto kroky tvoří jeden cyklus reakce PCR (Alberts et al., 2005). Do reakce se používá speciální DNA-polymeráza izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* (Bartůňková et al., 2011). Ta není vysokou teplotou denaturována, a proto není nutné ji přidávat po každém cyklu. Zvýšením teploty je opět zahájen další cyklus, aby došlo k rozdělení dvoušroubovice DNA na dva řetězce (Alberts et al., 2005).





**Obr. 2** Schéma prvního cyklu PCR. Na začátku každého cyklu je dvouřetězová DNA, která je potřeba zvýšením teploty rozdělit na dva řetězce. Po denaturaci je reakční směs ochlazená v přítomnosti obou primerů. Ty nasedají na komplementární sekvence DNA. V přítomnosti DNA-polymerázy a všech čtyř deoxynukleotidtrifosfátů, jsou z oblasti vymezené primery nasynthetizovány nové řetězce DNA. Převzato z: Alberts et al. (2005)

Po syntéze nových úseků DNA za účasti primerů probíhají podle stejného schématu další cykly. Jako templáty v dalších cyklech slouží kromě původní také již nově nasynthetizované úseky DNA a během několika cyklů se v roztoku začnou objevovat a poté převládat pouze amplifikované úseky, které jsou z obou stran ohraničeny primery. Pro amplifikaci se používá většinou 20-30 cyklů. V ideálním případě se v každém cyklu oproti předešlému zdvojnásobí počet kopií amplifikované části DNA. Délka trvání jednoho cyklu činí pět minut, a jelikož byla celá metoda zautomatizována, lze naklonovat fragment DNA během několika hodin. Podle obrázku (Obr. 3) je vidět, že po třech cyklech je produktem celkem šestnáct řetězců DNA, ale pouze některé mají požadovanou délku a také odpovídají buď prvnímu, nebo druhému řetězci původní DNA. Pak se zde nacházejí delší řetězce vznikající pouze, když templátem je původní řetězec DNA, protože nově nasynthetizované řetězce obsahují sekvence, které leží za místem nasednutí primeru. Po dalších cyklech již začnou převažovat řetězce ohraničené primery (Alberts et al., 2005).



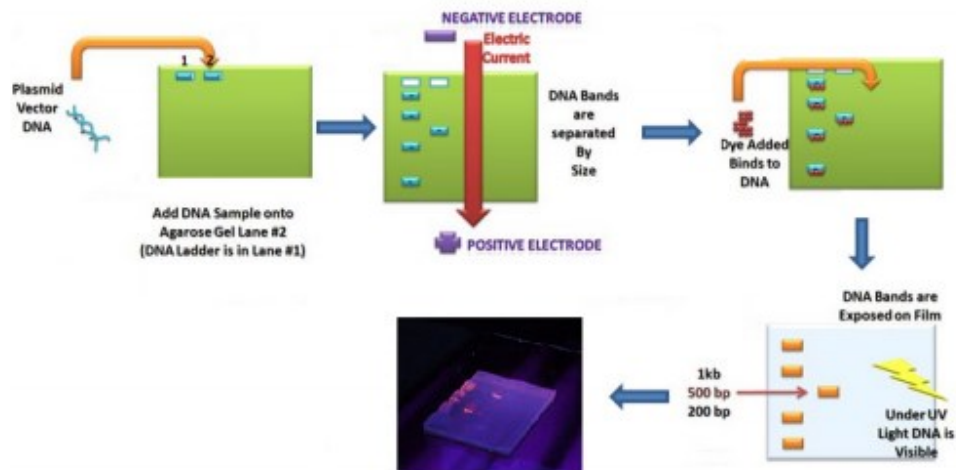
**Obr. 3** Schéma nasynetizování DNA pomocí PCR Na obrázku jsou zaznamenány jednotlivé cykly. Je vidět, že v dalších cyklech slouží jako templáty, nově nasynetizované řetězce DNA. Převzato z: Alberts et al. (2005)

Modifikací klasické PCR vznikla metoda multiplex PCR. Při multiplex PCR dochází k tomu, že část chromosomální DNA je amplifikována pomocí různých sad primerů (nikoliv jedné, jako u klasické PCR), které se liší svou specifitou a místem, kde nasedají na danou templátovou DNA.

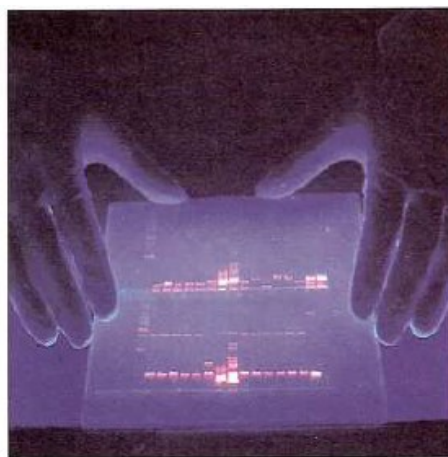
### *Gelová elektroforéza*

Gelová elektroforéza se používá k separaci a poté i detekci amplifikované sekvence. Principem této metody je schopnost rozdělit fragmenty podle jejich velikosti. Používá se agarózový nebo polyakrylamidový gel, obsahující mikroskopickou síť pórů. Do žlábků, které jsou umístěné na jednom konci gelu, se nanáší směs fragmentů získaná z předchozí PCR reakce. Gel se vkládá do elektrického pole. DNA má negativní náboj, a proto se pohybuje od záporné ke kladné elektrodě. Menší fragmenty se pohybují rychleji než větší, které neprostupují tak snadno gelem. Tím jsou rozděleny podle velikosti (Alberts et al., 2005). Výsledkem je „žebřík“ z úseků DNA s rozdílnou velikostí. Pro přibližné určení hmotnosti se na gelu současně dělí také standard DNA sestávající se z přesně velikostně definovaných úseků nazývaných velikostní marker (hmotnostní standard nebo DNA ladder). Ten tedy obsahuje fragmenty určité délky párů bází, existují různé stupnice (od 10bp do 12kb) k odhadu molekulové hmotnosti (Thermo Fisher scientific, 2015) (viz Obr. 4). DNA ale v gelu není vidět, a proto je třeba ji obarvit nebo jinak označit. K tomu se většinou používá metoda, během které dojde k reakci DNA s látkou a ta v ultrafialovém světle fluoreskuje (Alberts et al., 2005). Látka, která takto světelně reaguje a váže se na DNA, je například

ethidiumbromid nebo SYBR Green (Bitesize Bio, 2017) (viz Obr. 5). Další metodou ještě citlivější je přidání radioaktivně značených nukleotidů DNA před použitím elektroforézy. K tomuto se používá radioizotop  $^{32}\text{P}$ , ten emituje  $\beta$ -částice, detekce je poté pomocí autoradiografie (Alberts et al., 2005).



**Obr. 4** Gelová elektroforéza. Do jamek na gelu se nanese fragmenty DNA. Gel je umístěn do elektrického pole. Jelikož má DNA negativní náboj, pohybuje se od záporné katody ke kladné. Kratší fragmenty se pohybují rychleji než delší a tím dojde k rozdělení. Pak dojde k obarvení DNA a pod UV světlem se vyhodnocuje. Převzato z: Magdeldin (2012)

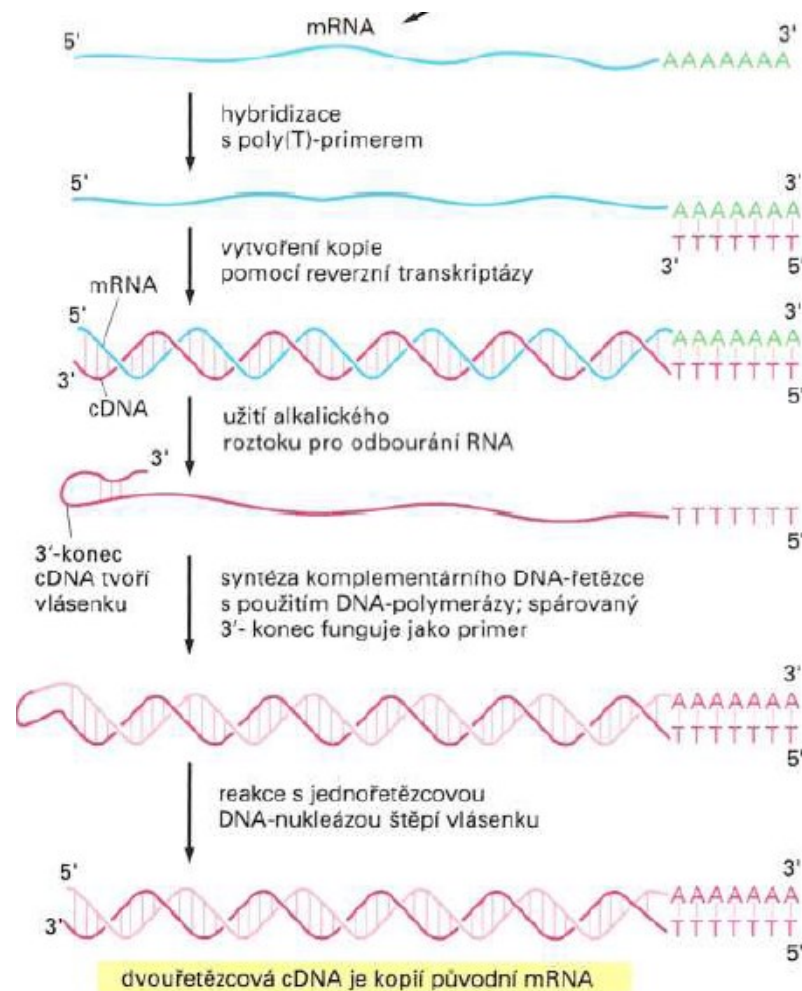


**Obr. 5** Detekce DNA fluorescencí. Převzato z: Alberts et al. (2005)

### *PCR s RNA templátem*

Tato molekulární metoda má využití v klonování úseků DNA, kde templátem může být DNA i mRNA (messenger RNA). Když je templátem mRNA, vzniká cDNA (komplementární DNA) klon. PCR vychází z izolace mRNA. Hybridizací se nejprve

připojí krátký oligonukleotid, který je komplementární s 3'-konce mDNA, tedy s poly(A)konce m-RNA. Tento konec slouží jako primer pro reverzní transkriptázu. Ta kopíruje RNA do komplementární DNA (cDNA). Tak vzniká šroubovice DNA/RNA. Pro odbourání vlákna RNA se použije alkalický roztok. Zůstane pouze cDNA, z které se stane templát pro vytvoření druhého vlákna cDNA pomocí enzymu DNA-polymerázy. 3'-konec cDNA se může otočit zpět a vznikne vlásenka na základě párování bazí. Viz. Obr.6 (Alberts et al., 2005).



Obr. 6 Syntéza cDNA Schéma PCR z mRNA. Převzato z: Alberts et al. (2005)

Vzhledem k vysoké citlivosti metody, ji lze použít k diagnostice infekcí a v soudním lékařství k identifikaci osob, ke které stačí pouze minimální stopy krve nebo tkáně, obsahující zbytky jediné buňky (Alberts et al., 2005).

Následují příklady využití PCR metod v diagnostice parazitárních onemocnění

### ***Diferenciace Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii***

PCR metoda je důležitou složkou při průkazu střevní nákazy, kterou způsobuje *Entamoeba histolytica*. U člověka lze nalézt sedm druhů střevních améb (*Entamoeba coli*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba moshkovskii*, *Endolimax nana*, *Iodamoeba bütschlii*) v lumen tlustého střeva. Patogenní je pouze *Entamoeba histolytica*, která vyvolává amébozu střevní nebo mimostřevní. *Entamoeba dispar* a *Entamoeba moshkovskii* jsou nepatogenními druhy střevní améby, ale jsou morfologicky neodlišné od *Entamoeba histolytica*. Mikroskopicky tedy nelze tyto tři druhy v lidské stolici identifikovat. Jediným používaným způsobem pro rutinní vyšetření, je užití metody PCR. Podle stanov Světové zdravotnické organizace (WHO) se mají léčit jen osoby s infekcí způsobenou *Entamoeba histolytica*, proto je důležitá diferenciace těchto druhů. Nejčastěji používaným biologickým materiálem k izolaci DNA je nefixovaný vzorek stolice, kde byly mikroskopickou metodou prokázány cysty. Po dobu izolace se vzorek uchovává v lednici (Zicklerová et al., 2013).

### ***Malárie***

Jedním z nejvýznamnějších parazitárních onemocnění je malárie. Ročně jí je vystavena asi polovina světové populace. V endemických oblastech se jí nakazí přes 500 miliónů lidí a přibližně milión jich zemře. Malárii způsobuje prvok řazený do rodu *Plasmodium*. Druhy patogenní pro člověka jsou *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* a *Plasmodium falciparum*. Pro člověka je vysoce patogenní zoonotický druh *Plasmodium knowlesi*, pocházející z makaka dlouhoocasého, vyskytující se v jihovýchodní Asii, tento druh *Plasmodia* také vyvolává infekční onemocnění malarii.

V současné době je pro diagnostiku malárie u lidí využíváno několik metod. Jedná se o krevní roztěry, detekce v tlusté kapce, sérologické testy na principu ELISA, ale velmi důležitou metodou je i molekulární diagnostika, která se používá k diferenciaci morfologicky neodlišitelných druhů *Plasmodium malariae* a *Plasmodium knowlesi*. Ze vzorku krve a stolice je metodou PCR detekovaná malárie. Bylo zjištěno, že citlivost PCR ve stolici i krvi je poměrně vysoká a srovnatelná v porovnání se všemi ostatními metodami diagnostiky této infekce (Pomajbíková et al., 2013)

## ***Toxoplazmóza***

Toxoplazmóza patří v České republice k nejrozšířenějším parazitárním nákazám. K potvrzení nebo vyloučení infekce prvokem *Toxoplasma gondii* se nejčastěji využívají nepřímé metody, tedy průkaz sérových protilátek (ELISA testy). Jako přímý průkaz z klinického materiálu se nejčastěji prokazuje DNA prvoka. Ke stanovení se používá plodová voda, nesrážlivá krev (s přídavkem citrátu sodného), nitrooční tekutina, bioptický materiál a likvor. Pro stanovení diagnózy je velmi důležitý průkaz DNA *Toxoplasma gondii* a to především u těhotných žen, novorozenců s pozitivní anamnézou, u osob po transplantaci kostní dřeně, HIV pozitivních pacientů a nemocných během imunosupresivní terapie (Plíšková et al., 2013).

## ***Molekulární diagnostika střevních tasemnic***

Pro člověka jsou tasemnice (Cestoda) závažnými původci parazitárních onemocnění. Rozeznává se okolo 740 druhů tasemnic, členěných do 18 hlavních řádů, které tvoří třídu Cestoda. Zástupci pouze dvou řádů (Cyclophyllidea, Diphyllbothriidea) parazitují na člověku a jen několik rodů parazituje v lidském střevě. Člověk je jejich definitivním hostitelem, protože tyto tasemnice dospívají a pohlavně se rozmnožují v jeho střevě. Nejrozšířenější lidské střevní tasemnice, se kterými se setkáváme i v České republice jsou rody *Taenia*, *Hymenolepis* (řád Cyclophyllidea) a *Diphyllobothrium* (řád Diphyllbothriidea). Je popsáno několik desítek druhů z těchto rodů, ale pouze některé jsou typickými lidskými parazity. Tradiční diagnostickou metodou střevních tasemnic je mikroskopický průkaz vajíček, případně článků ve stolici. Ovšem vajíčka blízké příbuzných druhů jsou morfologicky podobná, někdy zcela nerozlišitelná a to komplikuje jednoznačné určení druhu střevních tasemnic. PCR amplifikace je citlivou a spolehlivou metodou pro přesné určení druhu tasemnic. Do laboratorní praxe byla zavedena specifická molekulární metoda, založená na tzv. multiplex PCR (amplifikace několika částí DNA najednou). Výsledkem je rychlý a přesný test, využívaný k diferenciaci střevních tasemnic. U multiplex PCR, používané k diferenciaci tasemnic rodu *Diphyllobothrium*, se užívá jako cílový úsek mitochondriální gen, který kóduje podjednotku 1 cytochrom oxidázy. Tato podjednotka je pro jednotlivé zástupce tohoto rodu vysoce variabilní, a proto umožňuje navrhnout primery specifické pouze pro konkrétní druh. (Brabec, 2013).

## 8. Sérologické metody

Tyto metody jsou založené na metodě průkazu specifických protilátek, nejčastěji se dokazují v krevním séru, ale k vyšetření mohou být použity i jiné tělní tekutiny. Sérologické metody se užívají k diagnostice infekčních chorob. Známkou infekčního onemocnění je zvýšená hladina specifických protilátek. Velmi důležité je srovnávání koncentrací protilátek ve vyšetřovaném vzorku odebraném v akutní fázi onemocnění s odběrem vzorku během rekonvalescence. Reakce protilátky s antigenem tvoří základ sérologických metod. Tato reakce je za normálních podmínek neviditelná, a proto je důležitá její vizualizace. Jednotlivé sérologické metody se od sebe liší způsobem vizualizace. Detekční systémy umožňují vizualizaci reakce protilátka-antigen, ty se však liší citlivostí. Druhy sérologických metod jsou precipitace v gelu, precipitace kroužková, aglutinace bakterií, vazba komplementu, pasivní hemaglutinace, inhibice hemaglutinace, ELISA, neutralizace viru a kompetitivní radioimunoanalýza. Sérologické reakce jsou kvalitativní a kvantitativní. U kvalitativních reakcí se zjišťuje přítomnost či nepřítomnost specifických protilátek nebo antigenů. Stanovení koncentrace protilátek s použitím standardní koncentrace antigenu se označuje jako kvantitativní reakce. Koncentrace protilátek se stanovuje pomocí titrace, to znamená postupného ředění séra. Pozitivní reakce s největším zředěním, se označuje jako titer (Toman et al., 2009).

### 8.1. Metody EIA

Skupina EIA (enzymoimunoanalýza) testů využívá imunochemické reakce s enzymatickou detekcí, která umožňuje stanovit ve vzorku koncentraci antigenu nebo protilátky. Indikátorem této metody je enzymový konjugát. Podle vlastností substrátu lze detekovat reakci spektrofotometricky, nefelometricky, fluorometricky i luminometricky. EIA metody můžeme rozdělit na homogenní a heterogenní. U heterogenních EIA je třeba rozdělit volné a vázané frakce, u homogenních toto rozdělení není třeba. Heterogenní EIA metody lze dále dělit na kompetitivní a nekompetitivní v závislosti na značené protilátce či antigenu. Kompetitivní typ je charakterizován značenou protilátkou nebo značeným antigenem, u nekompetitivního typu pouze značenou protilátkou (Bartůňková et al., 2005).

## 8.2.Princip ELISA

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) je speciální druh EIA metody. Jedná se o buď o heterogenní nekompetitivní EIA, nebo heterogenní kompetitivní EIA (Bartůňková et al., 2005). ELISA se používá k detekci a kvantifikaci proteinů, lipidů, hormonů a protilátek. Při této metodě antigen (většinou ukotvený na pevné fázi) tvoří komplex s protilátkou, která je označena enzymem. Detekce se provádí na základě aktivity enzymu se substrátem, po vytvoření měřitelného barevného produktu (míra intenzity zabarvení). Nejdůležitější částí této metody je reakce mezi protilátkou a antigenem. ELISA se nejčastěji provádí v 96 - jamkových polystyrénových destičkách, ve kterých jsou pasivně vázány protilátky a proteiny (Thermo Fisher scientific, 2015).

Enzym, který se užívá k detekci, může být přímo navázán na primární protilátku (přímá ELISA) nebo je navázán na sekundární protilátku (nepřímá ELISA), která rozpoznává protilátku primární. Enzym může být také navázán (místo s protilátkou) na protein (streptavidin), který má vysokou afinitu k některé na primární protilátce navázané molekule (nejčastěji biotin) (Thermo Fisher scientific, 2015).

ELISA testy mohou být prováděny s řadou obměn základního postupu. Buď může být antigen vázán přímo na dno jamek destičky (přímá a nepřímá ELISA), nebo je zachycen protilátkou, která se nachází navázaná na dně testovací destičky (sendvičová ELISA). Nejčastěji se dnes používá „sendvičový“ ELISA test, který je citlivý se stabilními výsledky. U tohoto testu se antigen váže na povrchu destičky vázané protilátky. K detekci pak dochází podobně jako u přímé nebo nepřímé metody ELISA (Thermo Fisher scientific, 2015).

### *ELISA – Diagnostika antigenu a protilátek*

Metodou ELISA lze prokázat jak antigen, tak protilátku. V principu se obě metody liší tím, co je navázáno na pevné fázi (na dně destičky). Při průkazu antigenu je pevná fáze pokryta specifickou protilátkou. Při průkazu protilátky je pevná fáze pokryta specifickým antigenem (Toman et al., 2009).

Nepřímá ELISA je popisována jako průkaz specifických protilátek, kdy se nejdříve na plastickou mikrotitrační destičku naváže antigen. Postupně je přidáváno vyšetřované sérum a protilátka konjugovaná s enzymem. Přidávaná protilátka je proti



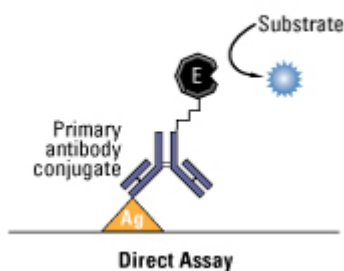
specifickým druhům imunoglobulinů (IgG, IgM nebo IgA). Nakonec je přidán detekční systém, který reaguje s enzymem nejčastěji za vzniku barevného produktu. K vyhodnocení výsledků se používá spektrofotometrie (Toman et al., 2009).

Pro průkaz antigenů se nejprve na plastickou mikrotitrační destičku naváže specifická protilátka. Postupně se přidává vyšetřované sérum, specifická protilátka pro daný antigen, protilátka proti imunoglobulinu konjugovaná s enzymem a detekční systém. Výsledkem je opět barevná reakce, která se hodnotí spektrofotometricky. Tato metoda se označuje jako sendvičová ELISA (Toman et al., 2009).

### 8.3. Přehled nepoužívanějších ELISA testů

#### *Přímá ELISA*

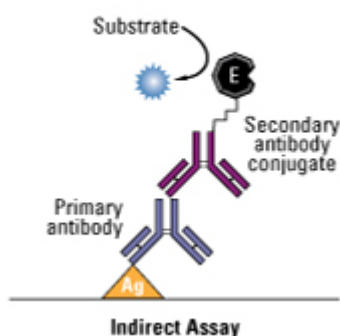
U přímé metody se používá označená primární protilátka, která přímo reaguje s antigenem na testovací destičce (viz Obr. 7). Tato metoda se převážně používá v imunohistochemickém barvení tkání a buněk. Výhodou metody je rychlost, protože je použita jenom jedna protilátka. Nevýhodou je značení primární protilátky pro každý ELISA test, které je velmi časově náročné a drahé (Thermo Fisher scientific, 2015)



**Obr. 7** Přímá ELISA. Primární protilátka reaguje přímo s antigenem na destičce. Převzato z: Thermo Fisher Scientific (2015)

## *Nepřímá ELISA*

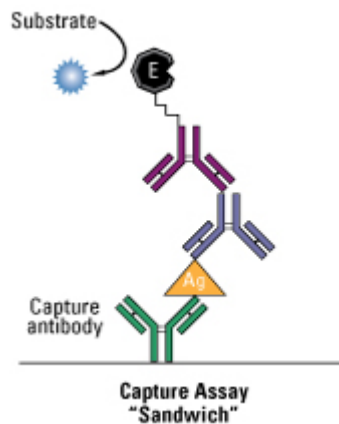
U metody nepřímé se používá k detekci označená sekundární protilátka. Tato označená protilátka je specifická k primární protilátce (viz Obr. 8) (Thermo Fisher scientific, 2015).



**Obr. 8** Nepřímá ELISA. K primární protilátce se nejdříve naváže označená sekundární protilátka, aby mohla reagovat s antigenem. Převzato z: Thermo Fisher scientific (2015)

## *Sendvičová ELISA*

V „sendvičovém“ ELISA testu, který patří do metody nepřímé, je důležité dodržovat, aby sekundární protilátka byla specifická pouze pro primární protilátku a nikoliv na protilátku vázanou na pevné vrstvě, jinak by test nebyl specifický pro antigen (viz Obr. 9). Obecně platí, že se používají obě protilátky z různých hostitelských druhů (například myší IgG a králičí IgG). Pro tyto testy je proto dobré používat sekundární protilátky, ze kterých byly odstraněny všechny protilátky, mající možnou příbuznost s vázanou protilátkou na dně destičky. Výhodou metody je, že existuje komerčně dostupná široká škála značených sekundárních protilátek. Maximální imunoreaktivita primární protilátky je zachována, protože není označena. Citlivost je zvýšená, jelikož každá primární protilátka má několik epitopů (oblastí), na které mohou být vázány sekundární protilátky a to umožňuje zesílení signálu. Nevýhodou této metody je inkubace a vznik nespecifického signálu, při použití sekundární protilátky (Thermo Fisher scientific, 2015).



**Obr. 9** Sendvičová ELISA. Sekundární protilátka se naváže na primární protilátku, pro kterou musí být specifická. Tento komplex se váže na antigen a protilátku, které jsou na destičce. Převzato z: Thermo Fisher scientific (2015)

### *Další typ ELISA testů*

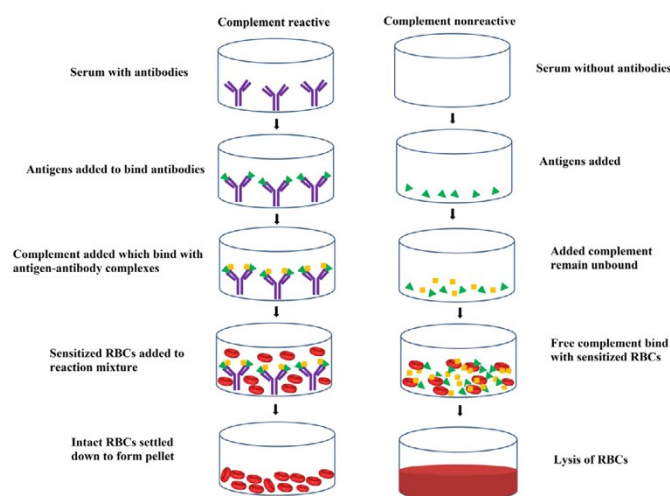
Kompetitivní ELISA test se běžně používá, pokud je antigen velmi malý a má pouze jeden epitop nebo vazebné místo pro protilátku. Neoznačené antigeny ze vzorku a označené antigeny soutěží o vazbu k sekundární protilátce. Při přítomnosti neoznačeného antigenu dochází ke snížení signálu. (Thermo Fisher scientific, 2015).

## 8.4. Komplement fixační reakce

Tato metoda diagnostiky patří mezi sérologické metody a používá se k průkazu protilátky. Hlavním principem metody komplement fixační reakce (KFR) je navázání komplementu na komplex antigen-protilátka (Bartůňková et al., 2011).

Typicky nastávají dvě situace. První situace: komplement se spotřebuje během prvního kroku reakce a nezbyde pro druhý krok, ve kterém se přidává hemolytický systém. Nedochozí tedy k hemolýze, což znamená, že ve vyšetřovaném vzorku jsou přítomny protilátky, které měl test prokázat. Druhá situace: komplement se během prvního kroku reakce nespoteřebuje a dojde k reakci s hemolytickým systémem (k lýze červených krvinek). Tento úkaz se projeví, pokud se ve vyšetřovaném vzorku prokazované protilátky nevyskytují. Komplement se totiž v prvním kroku nefixuje a zůstává volný (viz Obr. 10) (Ranjan et al., 2015).

Výsledkem je kvantitativní stanovení titrů protilátek. Titr představuje, v jakém největším zředění byl ještě průkaz protilátky ve vyšetřovaném vzorku (Říhová et al., 2009). Tato reakce se používá jak k průkazu protilátky, tak antigenu v bakteriologii, virologii a parazitologii (Šejda et al., 2005).



**Obr. 10:** princip Komplement fixační reakce. V prvním kroku se musí provést inaktivace studovaného séra, která slouží k odstranění aktivity komplementu ve vzorku. Následně se do vyšetřovaného vzorku přidá příslušný antigen a vzniká imunokomplex. Pak je přidán morčecí komplement ve vhodném zředění. Tento komplement se váže na vzniklý imunokomplex (protilátka-antigen). Když v prvním kroku nedojde k spotřebě komplementu (není přítomna sledovaná protilátka), reaguje přebytečný komplement v druhém kroku s indikátorovým komplexem (imunokomplex, hemolytický systém). Tento indikátorový komplex se skládá z ovčích erytrocytů s navázanými protilátkami z králíka, které jsou proti ovčím erytrocytům. Během této situace dochází k hemolýze erytrocytů. Převzato z: Koushlesh et al. (2015)

### *Toxoplazmóza – příklad parazitózy stanovené ELISA*

S *Toxoplasma gondii* se podle sérologických vyšetření setká 25-50% naší populace. Kočkovité šelmy jsou jedinými definitivními hostiteli. Mezihostitelem jsou teplokrevní živočichové včetně člověka. Přenos nákazy může být přímou cestou, kdy dojde k pozření oocysty z trusu definitivního hostitele. Další způsob nákazy může být pozření tkáňové cysty po nedostatečné tepelné úpravě mezihostitele. Třetí způsob nákazy je prostupování tachyzoitů, což jsou patogenní stádia, přes placentu při akutní toxoplazmóze během těhotenství. *Toxoplasma gondii* je teratogenní parazit, který ohrožuje zdraví a dokonce i život lidského plodu. Proto jsou těhotné ženy nejohroženější skupinou, další rizikovou skupinou jsou imunosuprimovaní pacienti. Toxoplazmóza se diagnostikuje buď pomocí průkazu DNA PCR metodou, nebo sérologicky, stanovením specifických protilátek. KFR se v diagnostice toxoplazmózy využívá také, avšak dnes je pouze doplňkovým testem. Primárně se diagnostikuje

pomocí ELISA metody, u které se zjišťují specifické protilátky třídy IgM, IgG, IgA a IgE (Rostami et al., 2018).

## 9. Diskuse

Parazitě se u lidstva objevují už od počátku a nejspíše se jich nikdy nezbaví. U člověka bylo identifikováno a popsáno asi 400 druhů parazitů a symbiontů, ale ne všechny způsobují zdravotní problémy. Parazitě, kteří ohrožují život člověka, tvoří jen menšinu z tohoto množství a většinu jich nalezneme v tropických oblastech. U západní civilizace se prevalence parazitárních infekcí výrazně snížila. Je to dáno zejména díky velkému důrazu na hygienu a také dostatek potravy ve vyspělých zemích. V rozvojových zemích je prevalence vyšší, což souvisí také s úrovní hygieny, ale i výživy, jelikož oslabené tělo lze snadněji napadnout (Kuchta, 2015).

Na druhou stranu se v poslední době prokázalo, že parazitě mohou některé nemoci zmírnit nebo dočasně i potlačit. Jedná se o autoimunitní onemocnění, jako jsou například alergie a Crohnova nemoc. U těchto onemocnění přítomnost parazita moduluje imunitní systém a tím pomáhá tělu se s onemocněním vyrovnat. Terapie helminty se již dostala do třetí fáze klinického zkoušení a zřejmě bude účinnou léčbou uvedených onemocnění. *Trichuris suis* je zatím nevhodnější k terapii u lidí, ale uvažuje se také o *Hymenolepis diminuta* (Kuchta, 2015).

Většina parazitů má velmi složitý vývojový cyklus. Pokud člověk nezavítá do oblastí, kde se parazitě vyskytují v infekčním stádiu, nemůže se nakazit. Jedním z příkladů je malárie. V České republice se vyskytují komáři přenášející malárii, ale *Plasmodium* není schopno svůj vývoj dokončit. Riziko malárie tak pro domácí obyvatelstvo nehrozí. Naopak malárii nacházíme u pacientů, kteří zavítali do oblastí výskytu malárie v rámci turistických nebo pracovních cest. V současnosti se lze v České republice nakazit parazity hlavně kontaminovanou vodou, potravou, hmyzem nebo prostřednictvím klíštěte (Kuchta, 2015).

Voda je kontrolována hygienickými stanicemi a proto se kontaminace vody objevuje jen zřídka a spíše u soukromých studní. Občas však dojde ke kontaminaci centrálního zásobování. V České republice je pouze několik druhů parazitů, kterými se člověk může nakazit z kontaminované vody. Jde především o lamblie střevní, patogenní améby a kryptosporidie (Kuchta, 2015).

Dalším zdrojem, který je pro člověka potenciálně nebezpečný, je syrové maso. Veškeré maso, které se v České republice prodává, je kontrolováno. Byla zde vyvinuta i

metoda na záchyt larvy svalovců (hlístic rodu *Trichinella*) trichineloskopie. I když by záchyt parazitologickou kontrolou nebyl 100%, veškeré parazity lze odstranit tepelnou úpravou nebo i mražením. Riziko nákazy je tedy hlavně při nedostatečné tepelné úpravě nebo při kontaktu s kontaminovanou potravou (Kuchta, 2015). Jeden z posledních případů záchytu tasemnic po pozření kontaminovaného masa v ČR pochází z roku 2013, kdy byla u několika desítek jedinců v oblasti Opavska nalezena tasemnice bezbranná (*Taenia saginata*) (Martinková et al., 2016).

Problémem v diagnostice parazitárních onemocnění je strach pacientů z vlastního diagnostického zákroku nebo z výsledku diagnostiky. Pacienti se stydí, a proto často hledají řešení v neodborných kruzích na internetu. V prostředí stránek a fór se pak dozvídají mylné nebo zavádějící informace. Jako jeden příklad za všechny bych ráda uvedla případ z jedné nejmenované mikrobiologické laboratoře, která se zabývá i diagnostikou parazitů u člověka. Před příchodem k lékaři měla pacientka dva roky vleklé velké obtíže. Byla jí diagnostikována přítomnost *Taenia saginata* a to v délce čtyř metrů. Důvodem k odkladu návštěvy lékaře bylo, že daná pacientka se na internetu dozvěděla, že *Taenia* během času sama odumře (pozn. *Taenia saginata* může žít až desítky let (Hoberg, 2002)). V nedávné době se v této laboratoři setkali i se svrabem způsobeném *Sarcoptes hominis*. Byl nakažen i personál na nemocničním oddělení.

V dnešní době je v rámci diagnostiky parazitárních onemocnění velký rozvoj v oblasti molekulární diagnostiky. V parazitologii se nejčastěji využívá technika PCR. Tato metoda je rychlá v porovnání s klasickými mikroskopickými metodami. Odpadá barvení preparátů a je nesporně citlivější. Daní za citlivost je riziko možné kontaminace vzorku, jelikož i malé množství DNA parazita, které se do vzorku dostane např. při neopatrné manipulaci, způsobí pozitivní záchyt (Ditrich, 2013). Vyvíjet nové diagnostické metody je nutno vždy v součinnosti se situací v daném regionu. Nicméně u některých parazitů bohatě stačí prostá mikroskopie (například u roupů Grahamův stěr, u svrabu prostá nativní mikroskopie seškrabu z kůže).

Mikroskopické metody jsou dnes považovány za klasické diagnostické metody. Stále se používají například v menších laboratořích, ale také jsou využívány pro kontrolu výsledků například z PCR.

Sérologické metody jsou využívány pro rychlou diagnostiku parazita. Na trhu jsou dostupné různé ELISA kity, kde stačí pouze malý objem vyšetřovaného vzorku. Při



diagnostice protilátek však tyto testy neříkají, zda je parazit stále v těle, ale pouze, že pacient byl daným parazitem exponován.

Pro správnou diagnostiku je vhodné kombinovat více přístupů, tedy využít dvou nebo i více metod pro spolehlivé určení daného parazita. Spolehlivé určení následně usnadní i vlastní léčbu a výběr vhodného léčiva. Na všech pracovištích se nepoužívají všechny uvedené diagnostické metody. Malá laboratorní pracoviště využívají pro záchyt parazita pouze klasické diagnostické metody, na specializovaných pracovištích jsou dostupné i molekulární a sérologické metody a to proto, aby bylo jejich používání hospodárné.

## 10. Závěr

Byť jsou v dnešní době v civilizovaném světě onemocnění parazity na ústupu, nelze význam diagnostiky zlehčovat, nebo jej dokonce opomíjet. Jak volné možnosti cestování do exotických zemí, které přinášejí pro pacienta riziko nákazy, tak migrující obyvatelstvo ze zemí třetího světa k nám přicházející, by mělo podstupovat preventivní prohlídky a nechat se na případnou nákazu parazity testovat.

V současné době se firmy snaží vyvinout co nejrychlejší a nejjednodušší testovací soupravy pro diagnostiku jednotlivých parazitů. Jednotlivé metody se co do náročnosti velmi liší a nové metody přinášejí rutinní a standardizované postupy, které diagnostiku usnadňují a automatizují. Přes to všechno mají osvědčené „staré“ metodiky v současné diagnostice své místo. Vhodné je tak kombinovat více přístupů, tedy využít alespoň dvou metod pro spolehlivé určení daného parazita.

## 11. Seznam použité literatury

### 11.1. Tištěná literatura

- AHMED, Nishat, Hussain. Cultivation of parasites. *Tropical Parasitology*. 2014, 4(2), 8089. DOI: 10.4103/2229-5070.138534.
- ALBERTS, Bruce, Dennis BRAY, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS a kolektiv. *Základy buněčné biologie*. 2. Praha: Espero Publishing, 2005. ISBN 80-902906-2-0.
- BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 1. Praha: Grada Publishing, a.s., 2005. ISBN 978-80-247-0691-7.
- BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, Milan PAULÍK a kolektiv. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. Praha: Grada Publishing, a.s., 2011. ISBN 978-80-247-7090-1.
- BEDNÁŘ, Marek, Věra FRAŇKOVÁ, Jiří SCHINDLER, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA. *Lékařská mikrobiologie*. 1. Praha: Triton, 1996. ISBN 859-4-315-0528-0.
- BRABEC, Jan. Molekulární diagnostika střečních tasemnic. *Molekulární diagnostika v parazitologii: Sborník referátů z odborného semináře*. Praha: Česká parazitologická společnost, 2013, 21-24.
- DITRICH, Oleg. Parazitologie v éře molekulární diagnostiky. *Molekulární diagnostika v parazitologii: Sborník referátů z odborného semináře*. Praha: Česká parazitologická společnost, 2013, 33-40.
- Hoberg, Eric. Taenia tapeworms: their biology, evolution and socioeconomic significance. *Microbes and Infection* 4 (2002) 859–866
- JÍLEK, Petr, Vladimír BUCHTA, Vladimír HORÁK a Renata PÁCALTOVÁ. *Kapitoly z mikrobiologie pro farmaceuty*. 1. Praha: Karolinum, 1996. ISBN 80-7184-070-X.

- JÍROVEC, Otto. *Parazitologie pro lékaře*. 2. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1954. ISBN 12.
- MAGDELDIN, Sameh. *Gel Electrophoresis – Principles and Basics*. Croatia: InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0458-2.
- MARTINKOVÁ, Irena, Helena ŠEBÁKOVÁ, Vera VRÁBLIKOVÁ, Renata BRABLCOVÁ a Hana BÍLKOVÁ FRÁNKOVÁ. *Epidemický výskyt tasemnice bezbranné na Opavsku v roce 2013*. *Practicus*. 2016, **15**(1), 26-29. MELTER, Oto a Annika MALMGREN. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, 2014. ISBN 978-80-246-2545-4.
- PLÍŠKOVÁ, Lenka, Zuzana ČERMÁKOVÁ a Radka KUTOVÁ. Molekulárně biologická diagnostika toxoplazmózy. *Molekulární diagnostika v parazitologii: Sborník referátů z odborného semináře*. Praha: Česká parazitologická společnost, 2013, 13.
- POMAJBÍKOVÁ, Kateřina, Milan JIRKŮ, Klára PETRŽELKOVÁ, Zuzana HŮZOVÁ, David MODRÝ a Julius LUKEŠ. Molekulární detekce malárie ve stolici. *Molekulární diagnostika v parazitologii: Sborník referátů z odborného semináře*. Praha: Česká parazitologická společnost, 2013, 11-12.
- PRANTLOVÁ RAŠKOVÁ, Veronika a Pavla WAGNEROVÁ. *Obrazový atlas parazitů pro praktická cvičení z Veterinární parazitologie*. České Budějovice: D Print, 2013.
- RANJANK., Prasad, M. Application of Molecular and Serological Diagnostics in Veterinary Parasitology. 2016. 2(4), 80-99 DOI: 10.14737/journal.jap/2015/2.4.80.99.
- ROZINA, Jozef, Jana VRÁNOVÁ, Hana KOLÁŘOVÁ a Jiří STANEK. *Biofyzika: Pro zdravotnické a biomedicínské obory*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2013. ISBN 978-80-247-8499-1.
- ŘÍHOVÁ, Eva a kolektiv. *Uveitidy*. 1. Praha: Grada Publishing, a.s., 2009. ISBN 978-80-247-2897-1.

- ŠEJDA, Jan, Zdeněk ŠMERHOVSKÝ a Dana GÖPFERTO VÁ. *Výkladový slovník epidemiologické terminologie*. 1. Praha: Grada Publishing, a.s., 2005. ISBN 978-80-247-6188-6.
- TOMAN, Miroslav a kolektiv. *Veterinární imunologie*. 2. Praha: Grada Publishing, a.s., 2009. ISBN 978-80-247-6762-8.
- VISVESVARA, G. S. a L. S. GARCIA. Culture of Protozoan Parasites. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002, **15**(3), 327-328 DOI: 10.1128/CMR.15.3.327-328.2002. ISSN 0893-8512.
- VOTAVA, Miroslav a kolektiv. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. Brno: Neptum, 2003. ISBN 80-902896-6-5.
- VOTAVA, Miroslav a kolektiv. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Brno: Neptum, 2010. ISBN 978-80-86850-04-8.
- ZEIBIG, Elizabeth. *Clinical Parasitology a practical approach*. 2. St.Louis, Missouri: Elsevier Health Sciences, 2013. ISBN 978-1-4160-6044-4.
- ZICKLEROVÁ, Ivana, Aneta LOJÍKOVÁ a Eva NOHÝNKOVÁ. Molekulární diagnostika *Pneumocystis jirovecii* a PCR diferenciacie *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii*. *Molekulární diagnostika v parazitologii: Sborník referátů z odborného semináře*. Praha: Česká parazitologická společnost, 2013, 6-10.

## 11.2. Internetové zdroje

- Bitesize Bio, 2017. Ethidium Bromide: The Alternatives [WWW Document]. [cit. 2017-08-15]. URL <http://bitesizebio.com/417/ethidium-bromide-the-alternatives/>
- KUCHTA, Roman, Iva KOLÁŘOVÁ, Martin KAŠNÝ, Oleg DITRICH a Petr HORÁK. Pravda o parazitech a jejich vymítačích. *Vesmír*. 2015. [cit. 2016-08-30]. URL <http://vesmir.cz/2015/09/24/pravda-parazitech/>
- Maratová, K. Fixace tkáně [WWW Document]. [cit. 2016-07-15]. URL <http://biologie.pedf.cuni.cz/maratova/fixace-tkan-.html>
- Pazdziora, E., 2011. Laboratorní diagnostika trichomonózy a její současný význam [WWW Document]. [cit. 2016-07-15]. URL <https://www.zuova.cz/Home/Clanek/Laboratorn-diagnostika-trichomonozy-a-jeji-soucasny-vyznam> (accessed 8.15.16).
- Rostami, A., Karanis, P. a Fallahi, S. *Infection* (2018) 46: 303. [cit. 2019-08-30]. URL <https://doi.org/10.1007/s15010-017-1111-3>
- Rozsypal, H. Infekce tropických a subtropických oblastí [WWW Document]. [cit. 2017-08-15]. URL <http://www1.lf1.cuni.cz/~hrozs/trop1.htm#Odkaz2>
- Thermo Fisher Scientific, 2015. DNA Size Markers & Mass Ladders [WWW Document]. [cit. 2016-06-20]. URL <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/dna-ladders/dna-size-markers-mass-ladders.html>
- Thermo Fisher scientific, 2015. Overview of ELISA [WWW Document]. [cit. 2016-06-20]. URL <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html#3>