

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

*Toxocara canis*

Barbora Žáková

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Barbora Voxová

HRADEC KRÁLOVÉ, 2022

## **Poděkování**

Chtěla bych moc poděkovat svojí školitelce PharmDr. Barboře Voxové za užitečné rady, pomoc a odborné vedení při psaní této bakalářské práce. Děkuji za Váš vlídný přístup a ochotu. Také bych ráda poděkovala svojí rodině a přátelům za podporu v těchto časech.

„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 12.5.2022

Barbora Žáková

# 1. OBSAH

2.	ABSTRAKT.....	7
3.	ABSTRACT.....	8
4.	ÚVOD.....	9
5.	ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE .....	10
6.	TEORETICKÁ ČÁST.....	11
6.1	Historie.....	11
6.2	Taxonomie.....	11
6.3	Epidemiologie.....	12
6.3.1	Šíření.....	12
6.3.2	Výskyt .....	13
6.3.3	Rizikové faktory.....	14
6.4	Morfologie.....	15
6.4.1	Třetí larvální stádium .....	15
6.4.2	Dospělá škrkavka.....	16
6.4.3	Vajíčka .....	17
6.5	Vývojový cyklus .....	17
6.5.1	<i>Toxocara canis</i> .....	18
6.5.2	<i>Toxocara cati</i> .....	19
6.5.3	Vývoj u paratenického hostitele .....	19
6.6	Formy infekce a symptomy .....	19
6.6.1	Viscerální forma (larva migrans visceralis) .....	20
6.6.2	Oční forma (larva migrans ocularis) .....	20
6.6.3	Neurologická forma.....	20
6.7	Prevence .....	21
6.8	Terapie .....	21
7.	LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA .....	23
7.1	Přímý průkaz.....	23
7.1.1	Histologie (z bioptického materiálu) .....	23
7.1.2	PCR (Polymerázová řetězová reakce).....	24

Nepřímý průkaz (sérologie) .....	25
7.1.3    Komplement fixační reakce .....	25
7.1.4    Přímá nekompetitivní sendvičová ELISA.....	26
7.1.5    Imunoblot (western blot) .....	28
7.1.6    Stanovení avidity IgG.....	28
7.2    Pomocná laboratorní vyšetření .....	29
7.2.1    Eozinofilie .....	29
7.2.2    Hypergamaglobulinémie .....	30
7.2.3    Hyperleukocytóza .....	30
8.    EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	31
8.1    Složení soupravy .....	31
8.2    Detekce IgG protilátek proti <i>Toxocara sp.</i> .....	32
8.2.1    Princip testu.....	32
8.2.2    Pracovní postup .....	32
8.2.3    Hodnocení výsledku .....	34
8.3    Avidita .....	35
8.3.1    Princip testu.....	35
8.3.2    Pracovní postup .....	35
8.3.3    Hodnocení výsledku .....	38
9.    VÝSLEDKY .....	39
9.1    Vyšetřovaní pacienti .....	39
9.1.1    Dle pohlaví.....	39
9.1.2    Dle věku .....	40
9.1.3    Dle roku vyšetření .....	41
9.2    Pozitivní pacienti .....	42
9.2.1    Pozitivní dle pohlaví .....	43
9.2.2    Pozitivní dle věku .....	44
9.2.3    Pozitivní dle roku vyšetření .....	45
9.3    Avidita u pozitivních pacientů .....	47
9.4    Výsledky vyšetření za období 2009-2013.....	48
9.4.1    Vyšetřovaní pacienti dle roku vyšetření.....	48
9.4.2    Pozitivní pacienti.....	49
9.4.3    Pozitivní vyšetřovaní pacienti dle pohlaví .....	50

9.4.4	Pozitivní vyšetřování pacienti dle roku vyšetření .....	51
9.4.5	Avidita u pozitivních pacientů.....	52
9.5	Porovnání výsledků za období 2009-2013 s výsledky za období 2017-2021 .....	53
9.5.1	Vyšetřování pacienti.....	53
9.5.2	Vyšetřování pacienti dle roku vyšetření .....	54
9.5.3	Pozitivní pacienti.....	55
9.5.4	Pozitivní vyšetřování pacienti dle pohlaví .....	56
9.5.5	Pozitivní vyšetřování pacienti dle roku vyšetření .....	57
9.5.6	Avidita u pozitivních pacientů.....	58
10.	DISKUSE.....	59
11.	ZÁVĚR.....	62
12.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	63
13.	SEZNAM TABULEK .....	64
14.	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	65
15.	SEZNAM GRAFŮ.....	65
16.	POUŽITÁ LITERATURA.....	66

## 2. ABSTRAKT

Cílem práce je porovnání séroprevalence pacientů z FNHK mezi lety 2017 a 2021 proti toxokaře. Následně jsou tyto výsledky porovnány s výsledky studie PharmDr. BarboryVoxové a Čermákové z let 2009-2013.

Metody pro vyšetřování byly zvoleny nepřímé sérologické. Ve studiích se v obou případech (z let 2009-2013 a 2017-2021) testovalo Elisa metou na přítomnost IgG protilátek v séru. Pokud byla přítomnost v séru potvrzena, tak se provedl test na aviditu. Tento test se dělal modifikovanou metodou ELISA za použití močoviny.

Za období 2017-2021 bylo celkově za pět let vyšetřeno 609 pacientů (282 mužů a 327 žen). Největší skupinu vyšetřovaných tvořili pacienti mezi 50-60 roky, nejmenší skupině vyšetřovaných bylo nad 80 let. 7 % pacientů mělo pozitivní výsledek (47 % tvořili muži a 53 % ženy). Nejvíce pozitivních (11) bylo ve věkové skupině 70-80 let a nejméně (0) ve věkové skupině 0-10. Z pozitivních mělo 31 % nízkou aviditu, 8 % hraniční a 61 % vysokou.

Za období 2009-2013 bylo celkem vyšetřeno 1083 pacientů. 10 % pacientů mělo pozitivní výsledek (53 % tvořili muži a 47 % ženy). Z pozitivních mělo 11 % nízkou aviditu a 89 % vysokou.

Počty vyšetření se mezi pracemi rapidně snížily. V letech 2009-2013 jich bylo 1083, v letech 2017-2021 už jen 609. Přitom nejméně (94) vyšetření bylo provedeno v roce 2020 a nejvíce (277) v roce 2009. S vyšetřeními se snížil i počet pozitivních výsledků z 10 % na 7 %. A nakonec s nižším počtem pozitivních výsledků se zvýšilo množství výsledků s nízkou aviditou. (Voxová a Čermáková,2014)

**Klíčová slova:** *Toxocara canis*, sérologie, protilátky proti *T. canis*

### 3. ABSTRACT

The aim of this work is to compare seroprevalence against *Toxocara* of patients from FN HK between 2017 and 2021. Finally these results are compared with the results of the study of PharmDr. Barbora Voxová and Čermáková from 2009-2013.

The methods of investigation were chosen indirect serological. It was testing by ELISA methods on present of IgG antibodies in the serum in both of studies (from 2009-2013 and 2017-2021). If the presence of antigen in serum was confirmed, an avidity test was made. This avidity test was made by modified ELISA method using of urea.

During period 2017 to 2021 a total of 609 patients were examined (282 men and 327 women). The largest group of patients consisted of patients aged 50-60, the smallest group of patients was over 80 years. 7 % of patients had positive result (47 % were men and 53 % were women). The most positive (11) were in the age group 70-80 years, the least (0) in the age group 0-10 years. 31 % of positive had low avidity, 8 % had borderline avidity and 61 % had high avidity.

During period 2009 to 2013 a 1083 patients were examined. 10 % of patients had positive result (53 % were men and 47 % were women). 11 % positive had low avidity and 89 % had high avidity.

The number of examinations decreased rapidly between the two studies. In the years 2009-2013 there were 1083 examinations, in the years 2017-2021 only 609 examinations. The least (94) examinations were made in 2020 and the most (277) examinations in 2009. The number of positives decreased with the examination from 10 % to 7 %. Finally the number of low-avidity increased with a smaller number of positive result. (Voxová a Čermáková, 2014)

**Key words:** *Toxocara canis*, serology, the antibodies against *T. canis*



## 4. ÚVOD

*Toxocara canis* je parazitární onemocnění psů, *Toxocara cati* koček. Může postihnout i člověka, ale u něj larva nedokáže dokončit svůj vývoj a vytvoří jen cysty ve tkáních. Onemocnění je většinou asymptomatické, ale jinak záleží na tom, kde se cysty vytvoří. Pokud se vytvoří v oku, tak hrozí oslepnutí. V případě srdce nebo CNS hrozí dokonce i úmrtí. Z tohoto důvodu je důležité se touto problematikou zabývat, ale hlavně včas a správně onemocnění diagnostikovat. Nejlepším způsobem je snažit se předejít nákaze. To dokážeme nejlépe pravidelným odčervováním našich domácích mazlíčků, správnou hygienou, hlídáním dětí, aby si nestrkaly ruce od hlíny do pusy a odklizením exkrementů našich zvířat. Také je důležité proinformovat společnost o možnostech nákazy a prevenci tohoto onemocnění. V Evropě je jedna z nejnižších séroprevalencí (11 %). Řadí se hned za východní středomoří, které má nejmenší hodnoty (8 %). (Bílková Fránková, 2014; Finterer a Auer, 2007; Ma et al., 2020; Nicoletti, 2013; Uhlíková a Hübner, 1983; Weller a Leder, 2020)

Diagnostika *T. canis* se nejčastěji provádí pomocí sérologických metod. Tyto metody patří mezi nepřímé např. ELISA, KFR a western blot. Také do této skupiny můžeme zařadit test na aviditu. Tento test provádíme pouze v případě, pokud nám test na protilátky vyjde pozitivní. Z výsledků tohoto testu lze zjistit stáří nákazy. Další možností diagnostiky je přímý průkaz. Do této skupiny se řadí PCR testy a histologický nálezy cysty. Tyto metody jsou využívány méně. V neposlední řadě se k diagnostice dají využít pomocná laboratorní vyšetření. Sem spadají testy na eozinofilii, hypergamaglobulinémii a hyperleukocytózu. (Bílková Fránková et al., 2014; Kubáčková, 2019; Mazur-Melewska, 2020)

Je důležité co nejvíce testovat, abychom nemoc odhalili v brzkém stádiu a mohli nasadit léčbu.

## **5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE**

Práce pojednává obecně o toxokaře. Kapitoly jsou tu věnovány informacím o životním cyklu, morfologii, rozmnožování, epidemiologii, léčbě či historii. Dále práce popisuje diagnostiku toxokarózy. Zabývá se metodikou a vyhodnocením výsledků.

V experimentální části práce více přibližuje metody, které se používají k diagnostice protilátek proti toxokaře a vyšetření na aviditu ve FN HK.

Cílem práce bylo zpracovat soubor z roku 2019-2021 z Ústavu klinické mikrobiologie ve FN HK a následně ho porovnat s údaji z roku 2009-2013 ze stejné laboratoře. Výsledky byly také porovnány s dalšími autory.

## 6. TEORETICKÁ ČÁST

### 6.1 Historie

*Toxocara canis* a *Toxocara cati* jsou známy jako paraziti šelem už přes 200 let (poprvé byly popsány roku 1782). První popis larvární toxokarózy, tedy patogenního působení škrkavek u lidí, pochází z roku 1950, kdy byla nalezena larva v granulomu na sítnici oka dítěte. V následujícím roce byla larva nalezena v mozku, konkrétněji v thalamu, mrtvého chlapce, který zemřel na zánět mozkových blan. V roce 1952 pak byla Paulem Beaverem a jeho spolupracovníky poprvé prokázána první viscerální forma. Paul Beaver s dalšími identifikovali škrkavku v jaterní tkáni pacienta a zjistili, že může způsobovat závažné stavy a mnohdy i úmrtí.

Roku 1956 a 1958 byly vysvětleny celé životní cykly *T. cati* a *T. canis* australským parazitologem Sprentem. (Bílková Fránková et al., 2014; Finsterer a Auer, 2007; Uhlíková a Hübner, 1983)

U nás se první záznam o larvární toxokaróze (konkrétně o oční formě v dětském věku) objevuje v roce 1967. (Uhlíková a Hübner, 1983)

Při diagnóze bylo dříve nejzásadnější nalézt larvu nebo její zbytky ve tkáni a identifikovat ji, protože sérologie nedávala uspokojivé výsledky a zaostávala. Citlivost sérologických testů nebyla nijak vysoká a antigeny připravované z dospělých červů škrkavky nebyly všeobecně ani rodově specifické.

Proto byl roku 1964 Woodruffem zaveden kožní test. Problém byl, že výsledky tohoto testu byly sporné. V roce 1960 Olson se spolupracovníky začal k diagnostice využívat efektu vylučování sekrečního antigenu produkovaného živými larvami. De Savigny využil přípravu tohoto antigenu v definovaném tekutém prostředí a jeho použitím v enzymatické reakci ELISA získal roku 1977 vysoce citlivou sérologickou diagnostickou metodu. (Uhlíková a Hübner, 1983)

### 6.2 Taxonomie

Škrkavky způsobují nemoc pojmenovanou larvární toxokaróza. Hlavní dva druhy škrkavek jsou *Toxocara canis* a *Toxocara cati*. Jako další bychom do této skupiny mohli

zařadit *Toxocara tanuki*, *Toxocara mackerassae*, *Toxocara pteropodis* a *Toxocara vitulorum*. Každá z těchto škrkavek má jiného konečného hostitele např. *T. vitulorum* skot a buvoly, *T. pteropodis* kaloně, *T. mackerassae* myši a krysy, *T. tanuki* psa mývalovitého, *T. canis* psovité šelmy a *T. cati* kočkovité šelmy.

Škrkavky řadíme mezi zoonotické helminty/červy třídy nematoda/hlístice. (Bowman, 2020a; Macpherson, 2013; Uhlíková a Hübner, 1983)

**Tabulka č. 1 Taxonomie**

<b>Kmen</b>	<i>Aschelminthes</i>	oblovcí
<b>Podkmen</b>	<i>Nemathelminthes</i>	hlístové
<b>Třída</b>	<i>Nematoda</i>	hlístice
<b>Řád</b>	<i>Ascarididea</i>	škrkavky
<b>Čeleď</b>	<i>Ascarididae</i>	škrkavkovití
<b>Rod</b>	<i>Toxocara</i>	škrkavka
<b>Druh</b>	<i>T. canis</i>	škrkavka psí
	<i>T. cati</i>	škrkavka kočičí

Zdroj: (Uhlíková a Hübner, 1983)

## 6.3 Epidemiologie

### 6.3.1 Šíření

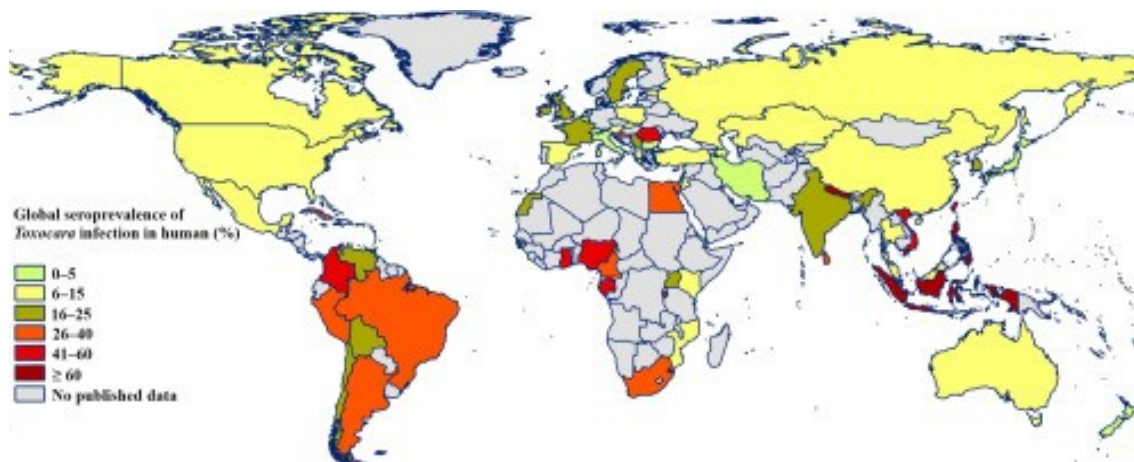
Psovité nebo kočkovité šelmy se můžou nakazit pohlcením třetího larválního stádia z vnějšího prostředí anebo pozřením paratenických hostitelů s larvami. U psa i kočky je možný přenos mlékem (laktogenní/transmamární přenos). Psi se můžou infikovat i transplacentárně. (Anonymous, 2013; Bílková Fránková et al., 2014)

Člověk se může nakazit stejně jako psovité nebo kočkovité šelmy per os pozřením vajíček s larvami třetího stádia z vnějšího prostředí (např. špatná hygiena, syrová zelenina) nebo pokud sní syrové maso jiného paratenického hostitele. (Anonymous, 2013; Bílková Fránková et al., 2014; Finsterer a Auer, 2007)

### 6.3.2 Výskyt

*T. canis* je kosmopolitní organismus, vyskytuje se tedy napříč celým světem od Subarktidy až po tropy. Nachází se spíše v oblasti tropického pásu než v oblasti mírného podnebného pásu. Její larvy se totiž nejlépe vyvíjí při teplotě >10 °C. Účinnost vývoje přitom klesá s klesající teplotou. (Macpherson, 2013; Weller a Leder, 2020)

**Obrázek č. 1 Globální séroprevalence infekce toxocarózou u lidí**



Zdroj: (Ma et al., 2020)

Výše na obrázku je znázorněna séroprevalence sérových protilátek proti *Toxocara species* tedy *T. canis* a *T. cati*.

Nejvyšší výskyt nad 80 % je v tropických a subtropických oblastech Indonésie, Kašmíru, Nepálu, Nigerie a Marshallových ostrovů. Nejmenší séroprevalence se naopak nachází v Evropě a východním Středomoří.

Světová séroprevalence je 19 %, tedy asi 1,47 miliardy jedinců má pozitivní sérologický test, z čehož největší část tvoří Afrika, jihovýchodní Asie a Jižní Amerika. (Ma et al., 2020; Rostami et al., 2019)

Studie Kateřiny Skulinové a kolektivu uvádí data o séroprevalenci larvární toxocarózy v České republice. Data byla shromážděna z let 2012-2016 Národní referenční laboratoří pro tkáňové helminthózy. Studie uvádí přítomnost protilátek u 160 lidí z 4428 testovaných (3,6 %). Byly však zjištěny velké meziregionové rozdíly od 1,4 do 7,5 %. (Skulinova et al., 2020)

Níže v tabulce č.2 je uvedeno porovnání séroprevalence na různých světadílech. V tabulce č. 3 je vypsaná globální séroprevalence u lidí a globální prevalence u psů a koček. (Ma et al., 2020; Rostami et al., 2019)

**Tabulka č. 2 Séroprevalence v různých oblastech**

**Tabulka č. 3 Globální prevalence**

Oblast	Séroprevalence	
Afrika	38 %	
Jihovýchodní Asie	34 %	
Západní Tichomoří	24 %	
Amerika	23 %	
	Severní 13 %	Jižní 28 %
Evropa	11 %	
Východní Středomoří	8 %	

Odhad prevalence u psů	11 %
Odhad prevalence u koček	17 %
Séroprevalence u lidí	19 %

Zdroj tabulky č. 2 a 3: (Ma et al., 2020)

### 6.3.3 Rizikové faktory

Analýza A. Rostamiho a jeho kolektivu, která dohromady srovnávala data z mnoha studií, ukázala, že do nejrizikovější skupiny pro pozitivní sérové protilátky patří muži mladšího věku, obyvatelé žijící na venkově mající vyšší kontakt se psy, kočkami a pūdou. Tito lidé taky pijí neupravenou pitnou vodu a konzumují syrové maso. Vyšší séropozitivitu také vykazují obyvatelé chudinských čtvrtí. (Despommier, 2003; Rostami et al., 2019)

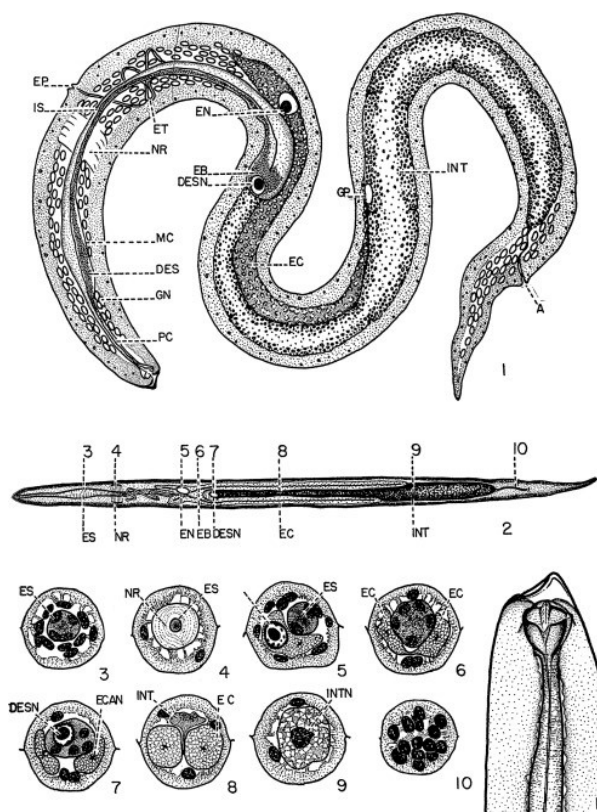
Do tabulky č. 4 jsou pro srovnání uvedeny dva rizikové faktory: věk a pohlaví.

**Tabulka č. 4 Rizikové faktory**

Rizikové faktory	Pohlaví		Věk				
	Muž	Žena	≤10	11-20	21-40	41-60	≥60
Séroprevalence	25,5 %	21,6 %	22,5 %	19,2 %	16,2 %	17,4 %	18,1 %

Zdroj: (Rostami et al., 2019)

## 6.4 Morfologie



**Obrázek č. 2 Anatomie larvy**

Zdroj: (Bowman, 2020b)

Vysvětlivky: A, řitní otvor; DES, dorzální jícnová žláza; DESN, jádro hřbetní jícnové žlázy; EB, jícnový bulbus; EC, vylučovací kanál; ECAN, vylučovací kanálek; EN, jádro vylučovací buňky; EP, vylučovací pór; ET, vylučovací tubulus; GN, gangliové jádro; GP, genitální primordium; INT, střevo; INTN, jádro střevní buňky; JE, šíje; MC, metacarpus (zadní část jícnu); NR, nervový prstenec; PC, procorpus (přední část jícnu)

### 6.4.1 Třetí larvální stádium

Třetí larvální stádium je infekční pro paratenické i definitivní hostitele. V tomto stádiu larvy přetrvávají ve tkáních paratenického hostitele. Larvy jsou vylíhlé z vajíček a většinou jsou v tkáni obklopeny granulomem, který obsahuje eozinofily. Toto stádium je dlouhé asi 0,4 mm a 0,02 mm široké. *T. canis* je přítom o něco širší než *T. cati*.

Larvy jsou obklopeny kutikulárními obaly, které v průběhu vývoje svlékají.

Kutikula je ze speciální formy kolagenu a je tvořena hypodermis, která se pod ní nachází.

Škrkavky mají na předním konci laterální křídélka, která jim pomáhají při pohybu skrz tkáň.

Nervová soustava se skládá ze dvou nervových provazců, hřbetního a břišního. Okolo jícnu se nachází nervový prstenec a před ním shluk ganglií. U ústního otvoru je z každé strany jeden chemoreceptor (amfid). Další papily, které jsou podobné amfidám, jsou v blízkosti špiček ocasů (phasmidy).

Pohlavní orgány se tvoří až ve čtvrtém larválním stádiu. Vyskytují se ve druhé třetině délky těla na břišní stěně.

Trávicí soustava začíná ústním otvorem. Poté následuje jícen, který tvoří asi 30 % délky těla larvy. Lumen jícnu je vystlaná kutikulou. Lumen střeva už není viditelná. Vše je zakončeno řitním otvorem.

Největší buněčnou strukturou je vylučovací buňka. Tvoří asi 45 % délky larvy. S dospíváním se stává menší. Nachází se u jícnu. Nabývá tvaru H, z jehož mostu uprostřed vychází klikatý kanál, který vyúsťuje na povrch vylučovacím otvorem. (Bowman, 2020b; Mazur-Melewska et al., 2020)

#### 6.4.2 Dospělá škrkavka



Dospělý červ je obalen vrstvou bílé kutikuly. Konce těla má zašpičatělé. Na předním konci škrkavky se nalézají laterální křídélka, u samečka na zadním konci konusovitý prstencovitý výběžek. Samečci jsou menší než samičky, měří 8-10 x 0,2 - 0,25 cm. Samičky jsou dlouhé 6-20 x 0,25 – 0,3 cm. *T. canis* je delší než *T. cati*, protože samečci od *T. cati* měří 5-6 cm a samičky 6-10 cm. (Bílková Fránková et al., 2014; Kolářová, 2010)

**Obrázek č. 3 Dospělá škrkavka**

Zdroj: (Flukeman, 2008)



### 6.4.3 Vajíčka

Samice mohou produkovat až tisíce vajíček denně. Vajíčka jsou robustní a vysoce odolná vůči nepříznivému venkovnímu prostředí a různým dezinfekčním prostředkům. Za příznivých podmínek mohou přežívat i několik let.

V takovémto vhodném prostředí se vyvíjí a stávají se po 2-3 týdnech infekčními, přičemž první dělení probíhá po 4 dnech.



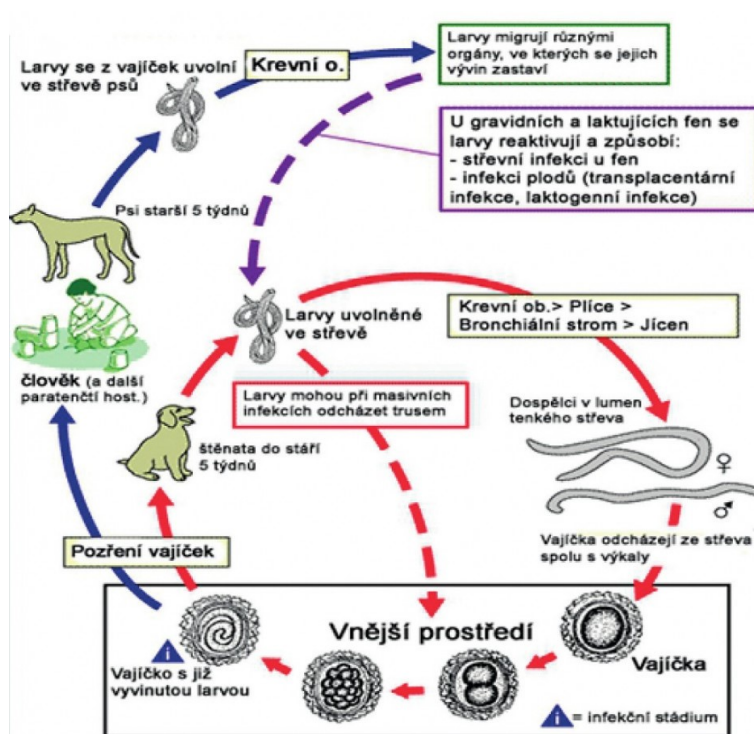
Vajíčka *T. canis* jsou tmavě hnědožluté barvy a vaječná stěna je drsného důlkovaného vzhledu. Jelikož mají podobnou velikost a morfologii jako vajíčka *T. cati*, tak jsou od sebe těžko rozeznatelná. (Chen et al., 2012; von Dohlen et al., 2017)

Obrázek č. 4 Vajíčka

Zdroj: (Červená a Fenyková, 2017)

### 6.5 Vývojový cyklus

Obrázek č. 5 Vývojový cyklus



Zdroj: (Bílková Fránková et al., 2014)

*Toxocara canis* zakončuje svůj životní cyklus u psových šelem, *Toxocara cati* u kočkovitých šelem. Jsou tedy jejich definitivními hostiteli. Člověk je jen paratenickým/rezervoárovým hostitelem, jelikož v něm *Toxocara* nemůže dokončit svůj vývoj. (Anonymous, 2013; Bílková Fránková et al., 2014)

Dospělé škrkavky žijí v tenkém střevě definitivního hostitele. Samička naklade nezralá, oplozená vajíčka, která pak s výkaly hostitele odejdou.

Ve vnějším prostředí se ve vajíčku za vhodných podmínek vyvine larva. Prvně vzniká rýhováním larva první generace. Aby larva přešla do dalších dvou stádií (druhého a třetího), tak musí ve vajíčku svléknout svou kutikulární pochvu toho předchozího stádia. Třetí larvální stádium už je zralé, infekční a může být pohlceno definitivním nebo paratenickým hostitelem.

Po pohlcení hostitelem dochází k vylíhnutí larvy z vajíčka. Tento proces trvá asi 2-4 hodiny. Larva poté proniká do střevní sliznice a tady vstupuje do krevního řečiště. Krevním oběhem se dostane do jater a poté do plic. Po tuto dobu trvá migrace asi 72-96 hodin a dále už se liší podle typu hostitele nebo druhu škrkavky. (Anonymous, 2013; Bílková Fránková et al., 2014; Uhlíková a Hübner, 1983)

### **6.5.1 *Toxocara canis***

V plicích dochází k dalšímu vývoji larvy ze třetího stádia do čtvrtého a poté ze čtvrtého do pátého stádia třetím a čtvrtým svlékáním. U mladších psů pak larvy putují plícemi a dostávají se do průdušnice. Vykašláním a polknutím se dostanou znovu do tenkého střeva, kde probíhá poslední páté svlékání. Z larvy páté generace se tak stává dospělý červ. Celý tento migrační cyklus trvá přibližně 10 dní od požití vajíček po dospělé vyvinutou škrkavku. Odtud probíhá celý cyklus nanovo.

Výše popsanému cyklu se říká tracheální migrace. (Anonymous, 2013; Bílková Fránková et al., 2014; Uhlíková a Hübner, 1983)

U starších psů se objevuje věková rezistence. S narůstajícím věkem psa je méně larev schopno dokončit celý cyklus (prodělat tracheální migraci) a prodělávají spíše jenom somatickou migraci. Larvy na konci somatické migrace vytvoří cysty ve tkáních.

U březích fen se larvy mohou znovu aktivovat a předat nákazu transplacentárně. Larvy migrují do jater plodu a tam zůstávají až do porodu. Ihned

po porodu začínají svoji migraci z jater do plic a tenkého střeva, kde se vyvinou v dospělé červy. Nákaza štěněte je možná i transmamárně. (Anonymous, 2013; Uhlíková a Hübner, 1983)

### **6.5.2 *Toxocara cati***

Rozdíl ve vývojovém cyklu *T. cati* od *T. canis* je, že třetí svlékání může probíhat v plicích nebo žaludeční stěně. Čtvrté svlékání probíhá v žaludečním obsahu. (Uhlíková a Hübner, 1983)

### **6.5.3 Vývoj u paratenického hostitele**

Pro paratenické hostitele je typická somatická migrace. Larvy třetího stádia se dostávají z plic do krevního oběhu a jsou roznášeny do široké škály tkání (svaloviny, jater, podkoží, plic, mozku, srdce, ale i třeba oka). V těchto orgánech se usazují, opouzdřují kolagenní reakcí a mohou v nich tímto způsobem nějaký čas přežívat. Přitom jsou metabolicky aktivní produkujíce enzymy, odpadní produkty a kutikulární složku. Tyto vyloučené produkty způsobují poškození okolní tkáně, nekrózu a zánět.

Životní cyklus je uzavřen, pokud paratenického hostitele sežere definitivní hostitel. (Anonymous, 2013; Bílková Fránková et al., 2014; Finsterer a Auer, 2007; Uhlíková Hübner, 1983)

## **6.6 *Formy infekce a symptomy***

Infekce toxokarou je většinou asymptomatická. Výsledkem může být běžná nebo skrytá oční, viscerální či neurologická forma. Existují i multisystémové případy, kdy má člověk více forem najednou. Tento stav se poté nazývá smíšená forma.

U člověka mohou larvy migrovat do jakéhokoliv orgánu. Nejčastěji to právě bývá centrální nervová soustava (CNS) anebo oko. Ve tkáních způsobují krvácení, nekrózu a tvorbu eozinofilního granulomu. Závažnost souvisí s počtem a lokací larev. Smrt může nastat v případech respiračního selhání, srdeční arytmie a poškození mozku ke kterému vede poškození tkáně migrací larev. (Finsterer a Auer, 2007; Goering et al., 2008; Murray et al., 2013)

### **6.6.1 Viscerální forma (larva migrans visceralis)**

Viscerální forma je onemocnění způsobené migrací larev tkáněmi lidských vnitřností. Příznaky viscerální formy se odvíjí od toho, jaké orgány jsou postiženy. Závažnost těchto symptomů závisí na počtu larev a věku hostitele. U člověka se může objevit snížená chuť k jídlu, anorexie, bolest břicha, nauzea, horečka, kašel, dušnost, ale i hepatosplenomegalie. Většinou je nakažení toxokarou klinicky nezjevné. Typickým znakem tohoto onemocnění je i eozinofilie, leukocytóza a hypergamaglobulinémie. Úmrtí se vyskytují jen zřídka, a to většinou v důsledku invaze do srdce. (Finsterer a Auer, 2007; Hurych a Štícha, 2020; Nicoletti, 2013)

### **6.6.2 Oční forma (larva migrans ocularis)**

Pokud se larvy toxokary usadí v oku, pak tuto formu nemoci nazýváme oční. Je to bezbolestné onemocnění. Vede ke zhoršenému vidění až ke ztrátě zraku, a to v průběhu dnů až týdnů. Pokud má infekce mírné projevy, může být objevena až během běžného očního vyšetření. U této formy se nenalézá eozinofilie jako u ostatních forem, ale je doprovázena bezbolestným zánětem vnitřních tkání oka neboli endoftalmitidou. Na sítnici se pak kolem larvy objevují granulomatózní léze, které mohou způsobit její oddělení.

Nesprávná diagnóza může vést až k zbytečnému odstranění oka, pokud dojde k záměně se zhoubným nádorem sítnice retinoblastomem. (Bednář et al., 1996; Goering et al., 2008; Hurych a Štícha, 2020; Nicoletti, 2013)

### **6.6.3 Neurologická forma**

Klinické projevy při postižení nervového systému jsou vzácné, přestože larvy do mozku migrují často.

Mezi projevy při napadení CNS patří: demence, myelitida, meningoencefalitida, oční neuritida, cerebrální vaskulitida nebo epilepsie. Závažnost onemocnění má souvislost s počtem larev proniklých do mozku a zánětem. Pacienti si při tom stěžují na bolesti hlavy, přecitlivělost na světlo, zhoršené vidění, slabost, zmatenost, horečku a únavu.

Při napadení periferní nervové soustavy patří mezi symptomy zánět míšních

kořenů, postižení muskuloskeletálního systému a postižení hlavových nervů.

U této formy je důležitá včasná diagnóza, protože hrozí úmrtí. Naopak při včasné zachytu je prognóza pro pacienta příznivá. (Finsterer a Auer, 2007; Nicoletti, 2013)

## **6.7 Prevence**

Podstatné je zabránit výkalům s vajíčky škrkavek, aby se nedostávaly volně do země a nekontaminovaly potraviny nebo místa, kde si hrají děti (písek nebo hlínu). Možnost nákazy také sníží správné hygienické návyky (mytí rukou před jídlem, po práci a důkladné omytí ovoce a zeleniny) nebo pravidelné čištění reterátů domácích zvířat. (Bílková Fránková et al., 2014; Jírovec a Jírovcová, 1945)

Dalším neméně důležitým krokem při prevenci je pravidelné odčervování volně žijících koček a psů. Také je vhodné preventivní podání anthelmintik před krytím feny a po narození štěňat. (Bílková Fránková et al., 2014)

## **6.8 Terapie**

Léčba se liší podle počtu larev, napadené tkáně a vážnosti symptomů. (Weller a Leder, 2020)

U lehkých případů příznaky odezní samy do několika týdnů. Delší dobu, až několik měsíců, může přetrvávat eozinofilie z důvodu přetrvávající antigenní stimulace mrtvými larvami. Může dojít i k reinfekci skrz kontaminovanou půdu, jídlo atd.

V případě středně těžkých a závažných symptomů viscerální formy se k terapii využívá albendazol. Pokud jsou napadeny i dýchací cesty, srdce nebo CNS, tak se současně předepisuje i prednison.

Když jsou postiženy oči, tak se k léčbě používá albendazol stejně jako u viscerální formy. Navíc je dobré použít kortikosteroidy kvůli svým protizánětlivým účinkům. U komplikovaných případů může dojít až k chirurgickému zákroku. (Despommier, 2003; Weller a Leder, 2020)

Albendazol lze nahradit mebendazolem. Má jedinou nevýhodu, že neprochází skrz hematoencefalitickou bariéru, a proto se při očních nebo neurologických formách raději předepisuje albendazol. Mebendazol tedy zůstává jako léčivo druhé volby. Také se dá albendazol nahradit diethylkarbamazinem, který ale nepůsobí na všechny případy a má větší vedlejší účinek než zmiňovaný albendazol. U nás navíc ani není tento lék spolu s thiabendazolem registrován. (Despommier, 2003; Hurych a Štícha, 2020; Weller a Leder, 2020)

Albendazolu se předepisuje 400 mg, mebendazolu 100-200 mg dvakrát za den po dobu pěti dnů. Diethylkarbamazinu se berou 4 mg/kg za den 21 dní v kuse. První dávka diethylkarbamazinu se pro dospělé liší, jelikož činí 25 mg/den. (Despommier, 2003; Weller a Leder, 2020)

Při terapii se sleduje pokles eozinofilie. Sledování poklesu IgE není spolehlivé a IgG klesá velmi pomalu. (Weller a Leder, 2020)

## 7. LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

Jelikož u člověka nedochází k vývoji larev v dospělce, tak nemůžeme diagnostiku zacílit na přímém průkazu nalezení červa. Nejčastěji se tedy využívá sérologický nepřímý průkaz IgG protilátek pomocí ELISA. Délku nákazy poté můžeme zjistit přes aviditu IgG protilátek k antigenu inkubací s močovinou. Dalším využívanějším sérologickým testem je western blot a KFR. (Bílková Fránková et al., 2014; Kubáčková, 2019)

Mimo sérologické metody se používají jako nepřímý průkaz zobrazovací metody výpočetní tomografií (CT) nebo magnetickou rezonancí (MRI), u oční formy se provádí oční vyšetření. Přímým průkazem se *T. canis* prokazuje histologickým nálezem. Tento náález lze doplnit molekulárním vyšetřením např. PCR testem (Chen et al., 2012; Kolářová, 2010; Kubáčková, 2019; Mazur-Melewska et al., 2020)

Dalším důležitým důkazem jsou pomocná vyšetření na eozinofilii, leukocytózu, hypergamaglobulinémii. U toxokarózy se zvyšují hodnoty IgG a IgE (Bílková Fránková et al., 2014)

Jako materiál se k diagnostice nejčastěji využívá srážlivá krev, také se dá použít neředěný likvor pro diagnostiku neurologické formy, či v případě oční formy nitrooční tekutina. (Kolářová, 2010)

Spolu s laboratorní diagnostikou musí brát lékař ohled na historii a průběh onemocnění. Jestli daný jedinec přišel v poslední době do kontaktu se zvířaty, jaké má hygienické nebo stravovací návyky, ale i cestovatelskou anamnézu. Lékař by měl zjistit, jaký má pacient průběh onemocnění, tedy jeho nespecifické příznaky (např. horečka, bolest hlavy, dušnost, nechutenství). (Mazur-Melewska et al., 2020)

### 7.1 Přímý průkaz

#### 7.1.1 Histologie (z bioptického materiálu)

Histologický průkaz toxokarózy za pomoci bioptického materiálu má spoustu omezení. Prvním z nich je časová náročnost a těžká proveditelnost vyšetření. Druhým omezením je, že touto diagnostickou metodou se nemůže dokázat skrytá forma

toxokarózy, protože není známá lokace larvy v těle. Další omezení spočívá v malé velikosti larev, které mohou migrovat a špatně se proto hledají. Na tuto metodu je proto potřeba zkušený odborník. (Mazur-Melewska et al., 2020)

### 7.1.2 PCR (Polymerázová řetězová reakce)

Jednou z dalších metod identifikace háďat toxokary je PCR. Tato metoda slouží jako doplňkové vyšetření k histologickému nálezu, jelikož nám umožňuje přesně určit druh toxokary. Morfologicky se totiž druhy rozeznávají těžko, protože si jsou navzájem hodně podobné. (Chen et al., 2012; Mazur-Melewska et al., 2020)

Při tomto vyšetření dochází k amplifikaci tedy namnožení DNA v přístroji zvaném termocykler. Celá reakce se skládá ze tří kroků za určité teploty.

- V prvním kroku dochází k oddělení vláken denurací dvoušroubovice za vysoké teploty.
- Ve druhém kroku dochází k ochlazení a připojení primerů o určité sekvenci nukleotidů komplementárních k vláknům matrice. Primery nám vymezí hledaný úsek DNA, který se zamplifikuje a začíná od nich syntéza komplementárního řetězce.
- Třetí krok se skládá ze samotného zmnožení DNA pomocí enzymu polymeráza (nejčastěji jím je Taq-polymeráza, která se získává z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*).

Jednotlivé kroky reakce se neustále opakují, takže z dceřiných vláken vznikají matrice pro vznik nových dceřiných vláken v dalším cyklu reakce. Vzniklé řetězce detekujeme (např. elektroforeticky). (Schindler, 2014; Votava, 2005)



## ***Nepřímý průkaz (sérologie)***

### **7.1.3 Komplement fixační reakce**

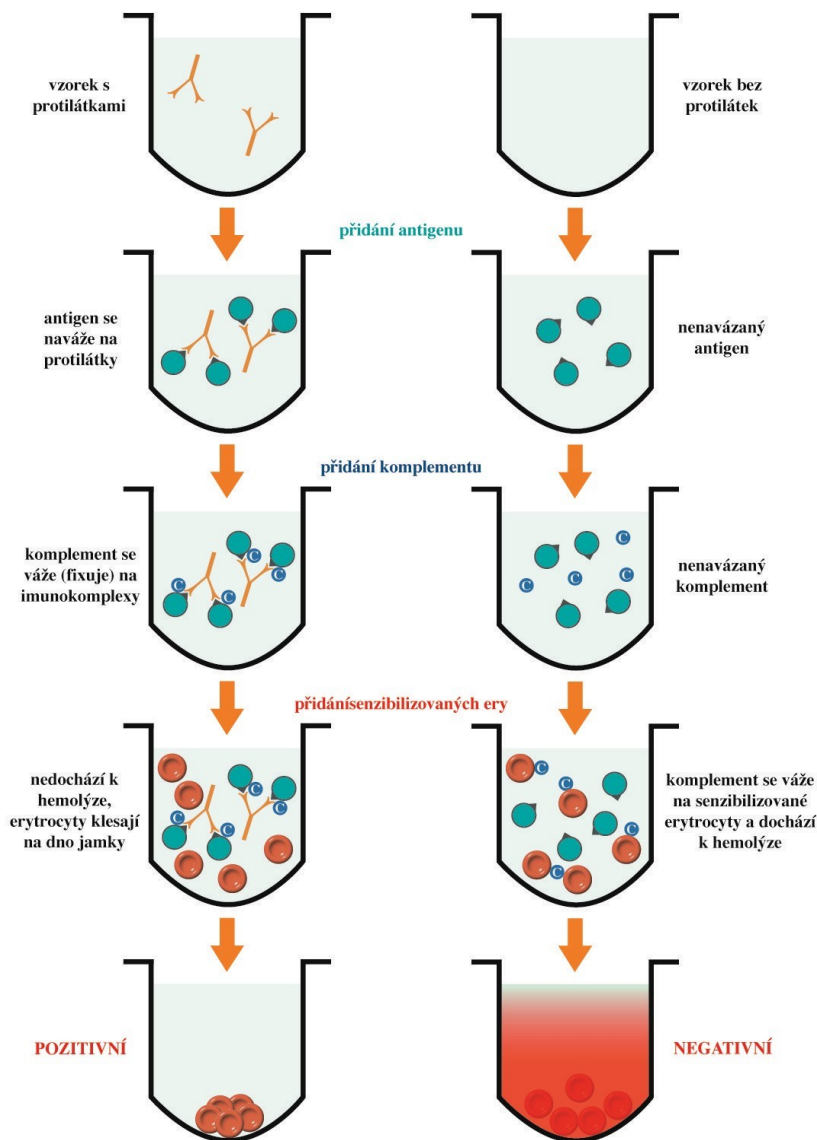
Komplement fixační reakce (KFR) je metoda za použití komplementu. Komplement se váže na komplex antigen-protilátka. Ve volné formě způsobuje lýzu erytrocytů. Reakce se skládá ze dvou kroků:

- V první fázi se vytvoří komplex antigen-protilátka. Do reakce se následně přidává komplement, který se na vzniklý komplex naváže.
- V další fázi se přidává indikátorový/hemolytický systém (obvykle beraní erytrocyty senzibilizované králičí protilátkou). V případě, že v séru byly přítomny protilátky a vytvořil se komplex antigen-protilátka, je komplement vyvázn z první fáze. V opačném případě zůstal komplement volný a naváže se tedy až v druhé fázi na senzibilizované erytrocyty a spustí tak jejich hemolýzu.

Síla reakce se hodnotí na kříže. Čím více se hemolýze zabrání, tím více křížů reakce má. Výsledek může být:

- pozitivní → bez hemolýzy (protilátky v séru jsou přítomny)
- negativní → hemolýza je přítomna (protilátky v séru nejsou přítomny)

Zdrojem komplementu je morčecí sérum. (Julák,2015; Votava, 2000)



**Obrázek č. 6**  
**Princip KFR**

Zdroj: (Anonymous,  
[b.r.]

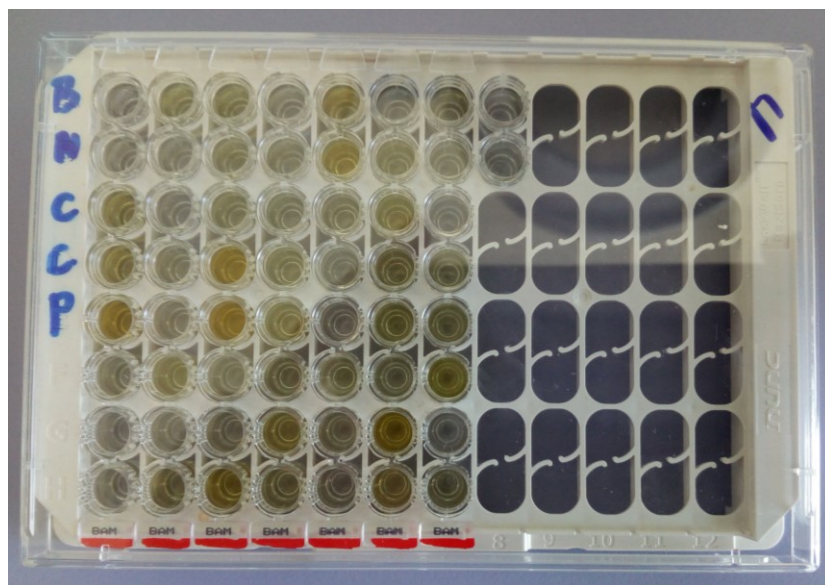
#### 7.1.4 Přímá nekompetitivní sendvičová ELISA

ELISA (z angl. enzyme linked immunosorbent assay) je sérologická imunoenzymatická (EIA=z angl. enzyme immuno assay) metoda, která má mnoho modifikací, mezi něž můžeme zařadit např. přímou, nepřímou, kompetitivní a nekompetitivní. K detekci IgG protilátek proti toxokaře se využívá přímá nekompetitivní sendvičová ELISA. Název sendvičová má z důvodu, že se protilátky nachází mezi dvěma antigeny.

*Princip přímé nekompetitivní sendvičové metody ELISA:* Antigeny jsou navázány na pevnou fázi (nejčastěji jamky mikrotitrační destičky). Do jamky se napipetuje pacientovo vyšetřované sérum a pokud se v něm nachází protilátky, navážou se

na antigen a vytvoří komplex antigen-protilátka. Následuje promytí a přidání konjugátu (protilátka s navázaným enzymem). Jako enzym se často využívá alkalická fosfatáza či křenová peroxidáza. Znovu se vše promyje a přikape se substrát. Tím začne probíhat reakce, která se ukončí okyselením. Vyhodnocení probíhá na základě odečtu různě intenzivně zbarveného produktu. K tomuto kroku lze využít spektrofotometr. Velkou výhodou je, že celý tento postup lze lehce automatizovat. (Carey et al., 2011; Votava, 2000)

**Obrázek č. 7 ELISA**



Zdroj: (Foto autor)

### 7.1.5 Imunoblot (western blot)

Western blot slouží jako doplňující test pro průkaz protilátek proti jednotlivým antigenům. Je jednou z variant ELISA testu.



Mechanismem je rozdělení jednotlivých antigenů elektroforézou v polyakrylamidovém gelu podle jejich velikosti molekuly a náboje.

Antigeny jsou z gelu přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (tomuto kroku se říká blotování/otisknutí). Membrána je rozstříhána na proužky (stripy) a přidá se k ní sérum. Pokud jsou v séru přítomné protilátky,

navážou se na příslušný separovaný antigen na stripu. Dojde k promytí a vizualizaci reakce např. enzymovou technikou za dodání detekčního enzymu, který se váže na vzniklý komplex

antigen-protilátka. Přidáním indikátoru se na místě pozitivity (komplex antigen-protilátka-enzym) objeví barevné proužky (páskové zóny).

Nakonec se výsledek porovná s referenčními proužky kvůli zjištění,

s jakými antigeny naše sérum reaguje. (Carey et al., 2011; Julák, 2015; Krejsek a Kopecký, 2004)

**Obrázek č. 8 Western blot**

*Zdroj: (Anonymous, 2020)*

### 7.1.6 Stanovení avidity IgG

Změřením avidity protilátek, tzn. jak pevně se protilátky vážou na antigen, se zjišťuje stáří infekce. U toxokarózy se stanovuje avidita IgG protilátek.

**Tabulka č. 5 Interpretace výsledků vyšetření avidity**

Index avidity (IAv) v %	Hodnocení avidity	Interpretace výsledků
<40	Nízká	Časná nákaza (akutní fáze) nejčastěji do 5 měsíců po nákaze
41-50	Hraniční	Zhruba 5-7 měsíců po vzniku nákazy
51-100	Vysoká	Stará nákaza (chronická infekce)

*Zdroj: (Anonymous, 2018)*

Síla vazby se zjišťuje pomocí testu ELISA nebo imunofluorescenčně a mechanismem je porovnání intenzity normálně proběhlé reakce s intenzitou reakce, při které došlo k porušení vazby mezi antigenem a protilátkou. K rozrušení vazby se používá roztok urey. (Votava, 2000; Votava, 2005)

## **7.2 Pomocná laboratorní vyšetření**

### **7.2.1 Eozinofilie**

Na larvy a jejich antigeny nejvíce reagují eozinofily, proto je jejich počet zvýšen. Tento jev je nazýván eozinofilie. Eozinofily cestují z periferní krve do tkání, kde jsou lokálně zvýšeny v místě antigenů a larev. Přitom je počet eozinofilů v periferní krvi úměrný počtu v tkáních.

Mezi počtem eozinofilů a formou onemocnění existuje souvislost. Nejvyšší hodnoty má viscerální forma ( $2000-3000 \text{ buněk/mm}^3=2-3 \cdot 10^{12}/l$ ), méně mají asymptomatické a skryté případy ( $400 \text{ buněk/mm}^3=4 \cdot 10^{11}/l$ ) a skoro normální hladina tedy  $0-0,45 \cdot 10^9/l$  se nachází u izolované oční formy. Tento stav lze vysvětlit nízkou zátěží protilátek toxokary v krvi.

Sledování počtu leukocytů nám pomáhá zaznamenat úspěch léčby. (Mazur-Melewska et al., 2020; Murray et al., 2013)

### **7.2.2 Hypergamaglobulinémie**

Případ, kdy jsou zvýšeny imunoglobuliny nad normální meze, nazýváme hypergamaglobulinémie. U tohoto onemocnění jsou vysoce zvýšeny hodnoty IgG a IgE protilátek.

Mechanismem je zpracování antigenu toxokary buňkami prezentujícími antigen. Tyto buňky aktivují T-lymfocyty, které následně indukují proliferaci B-lymfocytů. B-lymfocyty jsou dále diferenciovány na plazmatické buňky, které produkují protilátky. (Delves a Roitt, 1998; Weller a Leder, 2020)

### **7.2.3 Hyperleukocytóza**

Hyperleukocytóza znamená výrazně zvýšený počet bílých krvinek nad normální počet  $4,5-11 \cdot 10^9/l$ . Zvýšení záleží na velikosti infekce. Nejvíce se přitom počty zvyšují při viscerální formě. (Mazur-Melewska et al., 2020; Murray et al., 2013)

## 8. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část bakalářské práce pojednává o diagnostice protilátek proti toxokaře ve Fakultní nemocnici Hradec Králové (FN HK).

V této nemocnici se k vyšetření používá EIA metoda. Nejprve se zjišťuje přítomnost protilátek ve vzorku. Pokud jsou protilátky ve vzorku přítomné a výsledek je tedy pozitivní, přistupuje se k testování avidity. Na oba tyto testy se ve FN HK používá jedna testovací souprava EIA *Toxocara* IgG od firmy TestLine Clinical Diagnostic. (Anonymous, 2018)

### 8.1 Složení soupravy

Souprava obsahuje tyto složky potřebné pro testování na přítomnost protilátek a avidity:

- **potaženou destičku s navázaným antigenem** o rozměrech 12x18 jamek
- **negativní kontrolu** v pracovním ředění (roztok, který neobsahuje specifické lidské protilátky proti toxokaře)
- **CUT-OFF** v pracovním ředění (roztok, který obsahuje specifické lidské protilátky v hraniční koncentraci)
- **pozitivní kontrolu** v pracovním ředění (roztok, který obsahuje specifické lidské protilátky)
- **Konjugát** v pracovním ředění (roztok, který obsahuje zvířecí imunoglobulin proti lidskému IgG, tento imunoglobulin je značený peroxidázou)
- **ředící roztok vzorků 2** v pracovním ředění (pufr se stabilizátory bílkovin)
- **TMB-Complete 2** v pracovním ředění (jednosložkový substrátový roztok, který obsahuje TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- **promývací roztok** (20x koncentrovaný pufr)
- **zastavovací roztok** v pracovním ředění (roztok kyseliny)
- **avidní roztok 2** (stabilizovaný roztok močoviny)

- **pracovní návod**

(Anonymous, 2018)

## **8.2 Detekce IgG protilátek proti *Toxocara sp.***

### **8.2.1 Princip testu**

Souprava detekuje přítomnost IgG protilátek proti toxokaře v lidském séru nebo v citrátové plazmě sendvičovou metodou. To znamená, že antigen je navázán na pevnou fázi (dno jamky), na něj se váže protilátka z vyšetřovaného vzorku, na kterou se váže protilátka značená enzymem křenovou peroxidázou. Po přidání substrátu s TMB směs v případě positivity zmodrá. Reakce se ukončuje zastavovacím roztokem. Dochází ke změně zbarvení z modré na žlutou. Měříme intenzitu žlutého zbarvení, která je úměrná koncentraci protilátek. Intenzita se měří na fotometru při 450 nm.

Antigen navázaný na dno destičky je exkrečně-sekreční a získává se inkubací larev *T. canis*. (Anonymous, 2018)

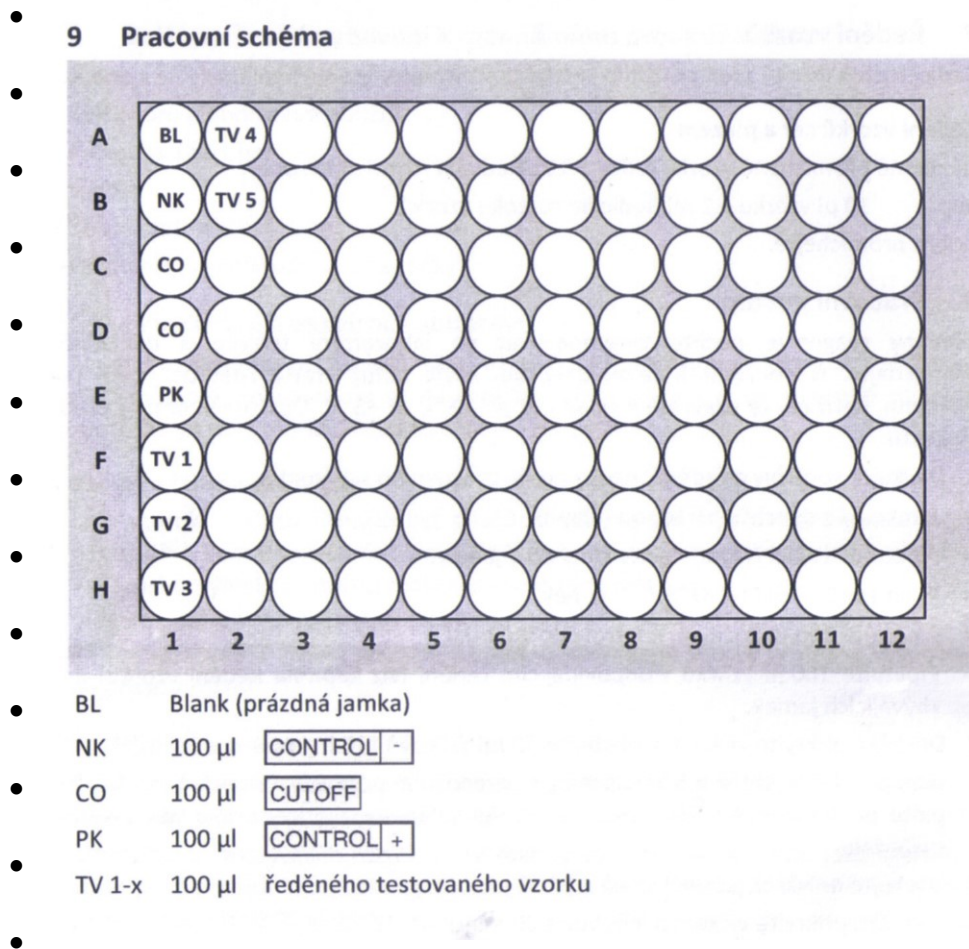
### **8.2.2 Pracovní postup**

Nejprve je nutné všechny reagentie nechat navyknout laboratorní teplotě a promíchat je.

Promývací roztok se zředí 1:20 destilovanou vodou. Pokud by se v roztoku vytvořily krystalky, je potřeba ho před použitím zahřát ve vodní lázni. Plazma nebo sérum se zředí 1:101 ředícím roztokem vzorků.



### Obrázek č. 9 Pracovní schéma na vyšetření IgG protilátek



Zdroj: (Anonymous, 2018)

- První jamka A1 se ponechává prázdná (blank), do druhé jamky B1 se pipetuje 100  $\mu$ l negativní kontroly, do dalších dvou jamek C1 a D1 po 100  $\mu$ l CUT-OFF a do páté jamky E1 100  $\mu$ l pozitivní kontroly. Do zbývajících jamek se napipetuje po 100  $\mu$ l vzorku.
- Destička se přikryje víčkem a inkubuje se 30 minut při 37 °C.
- Obsah jamek se odsaje a pětkrát promyje promývacím roztokem, nakonec se zbytek roztoku vyklepe do svého materiálu.
- Do všech jamek kromě první (A1), kde se nachází blank, se dává po 100  $\mu$ l konjugátu.
- Destička se znovu přikryje víčkem a inkubuje se 30 minut při 37 °C.

- Obsah jamek se odsaje a pětkrát promyje promývacím roztokem, nakonec se zbytek roztoku vyklepe do svého materiálu.
- Do všech jamek se nadávkuje po 100 µl TMB-Complete substrátu.
- Destička se přikryje víčkem a inkubuje se tentokrát 15 minut při 37°C.
- Reakce se zastaví po přidání 100 µl zastavovacího roztoku. Důležité je roztok dávkovat po stejných intervalech a ve stejném pořadí jako byl dávkován substrát.
- Nakonec se změří intenzita zbarvení roztoků proti blanku (v jamce A1) na fotometru do 30 minut po přidání zastavovacího roztoku.

(Anonymous, 2018)

### 8.2.3 Hodnocení výsledku

Ke zjištění výsledku je zapotřebí vypočítat index positivity (IP).

$$IP = \text{Absorbance vzorku} / \text{průměrná absorbance CUT-OFF}$$

**Tabulka č. 6 Interpretace výsledků vyšetření detekce IgG protilátek**

Index positivity (IP)	Hodnocení
<0,9	negativní
0,9-1,1	hraniční
>1,1	pozitivní

Zdroj: (Anonymous, 2018)

Hraniční výsledky s hodnotou 0,9-1,1 je nutné znovu vyšetřit z nového odběru za 2-6 týdnů. (Anonymous, 2018)

## **8.3 Avidita**

### **8.3.1 Princip testu**

Dochází k narušení vazby mezi antigenem a protilátkou avidním roztokem ze soupravy, tím je roztok močoviny. Při časně nákaze se tvoří protilátky s nízkou aviditou, proto jsou z vazby na antigen uvolněny a vymyty pomocí avidního roztoku. S nárůstem avidity i přes působení avidního roztoku zůstávají protilátky navázány na antigen. Stanovení spočívá v modifikovaném testu ELISA. Oproti normálnímu postupu v ELISA se navíc přidává avidní roztok.

Tento test se používá jen v případě pozitivního výsledku na protilátky.  
(Anonymous, 2018)

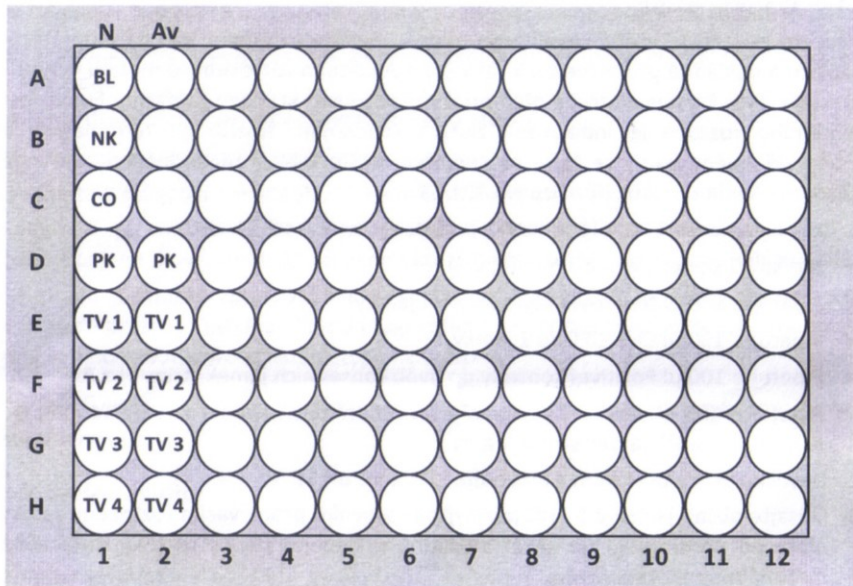
### **8.3.2 Pracovní postup**

Nejprve je nutné všechny reagenty nechat navyknout laboratorní teplotě a promíchat je.

V avidním roztoku se mohou vytvořit krystalky solí. Pokud tak nastane, je třeba roztok před použitím krátce zahřát. Plazma nebo sérum se ředí 1:101 ředícím roztokem vzorků.

### Obrázek č. 10 Pracovní schéma na vyšetření avidity

#### 14.5 Pracovní schéma



N	strip pro normální test (bez Aviditního roztoku)
Av	strip pro aviditní test (inkubace s Aviditním roztokem)
BL	Blank (prázdná jamka)
NK	100 $\mu$ l <input type="text" value="CONTROL -"/>
CO	100 $\mu$ l <input type="text" value="CUTOFF"/>
PK	100 $\mu$ l <input type="text" value="CONTROL +"/>
TV 1-x	100 $\mu$ l řaděného testovaného vzorku

Zdroj: (Anonymous, 2018)

- První jamka A1 se ponechává prázdná (blank), do druhé jamky B1 se pipetuje 100  $\mu$ l negativní kontroly, do třetí jamky C1 100  $\mu$ l CUT-OFF a do dalších dvou sousedních jamek, stripu N a Av, D1 a D2 po 100  $\mu$ l pozitivní kontroly. Do zbývajících sousedních jamek stripů N a Av se pipetuje po 100  $\mu$ l vzorku.
- Destička se přikryje víčkem a inkubuje se 30 minut při 37 °C.
- Obsah jamek se odsaje a pětkrát promyje promývacím roztokem, nakonec se zbytek roztoku vyklepe do svého materiálu.
- Do všech jamek stripů Av se dává po 100  $\mu$ l avidního roztoku.
- Do všech jamek stripů N se dává po 100  $\mu$ l promývacího roztoku.
- Destička se znovu přikryje víčkem a inkubuje se 20 minut při laboratorní teplotě.

- Obsah jamek se odsaje a pětkrát promyje promývacím roztokem, nakonec se zbytek roztoku vyklepe do svého materiálu.
- Do všech jamek kromě první (A1), kde se nachází blank, se dává po 100  $\mu$ l konjugátu.
- Destička se přikryje víčkem a inkubuje se 30 minut při 37 °C.
- Obsah jamek se odsaje a pětkrát promyje promývacím roztokem, nakonec se zbytek roztoku vyklepe do svého materiálu.
- Do všech jamek se nadává po 100  $\mu$ l TMB-Complete substrátu.
- Destička se přikryje víčkem a inkubuje se tentokrát 15 minut při 37°C.
- Reakce se zastaví po přidání 100  $\mu$ l zastavovacího roztoku. Důležité je roztok dávkovat po stejných intervalech a ve stejném pořadí jako byl dávkován substrát.
- Nakonec se změří intenzita zbarvení roztoků proti blanku (v jamce A1) na fotometru do 30 minut po přidání zastavovacího roztoku.

(Anonymous, 2018)

### 8.3.3 Hodnocení výsledku

Ke zjištění výsledku je třeba vypočítat index avidity (IAv), který nám udává, kolik protilátek v % zůstalo navázáno na antigen i přes působení avidního roztoku.

$$IAv = (\text{Absorbance vzorku na stripu Av} / \text{Absorbance vzorku na stripu N}) * 100 [\%]$$

**Tabulka č. 7 Interpretace výsledků vyšetření avidity**

Index avidity (IAv) v %	Hodnocení avidity	Interpretace výsledků
<40	Nízká	Časná nákaza (akutní fáze) nejčastěji do 5 měsíců po nákaze
41-50	Hraniční	Zhruba 5-7 měsíců po vzniku nákazy
51-100	Vysoká	Stará nákaza (chronická infekce)

*Zdroj: (Anonymous, 2018)*

Hraniční výsledky s hodnotou 41-50 je nutné znovu vyšetřit z nového odběru za 2-6 týdnů. (Anonymous, 2018)

## 9. VÝSLEDKY

V této kapitole jsou porovnána data vyšetřovaných pacientů ve FN HK na přítomnost protilátek proti *Toxocara sp.* v séru z průběhu let 2017-2021. Pacienti byli vyšetřováni metodou ELISA.

### 9.1 Vyšetřování pacientů

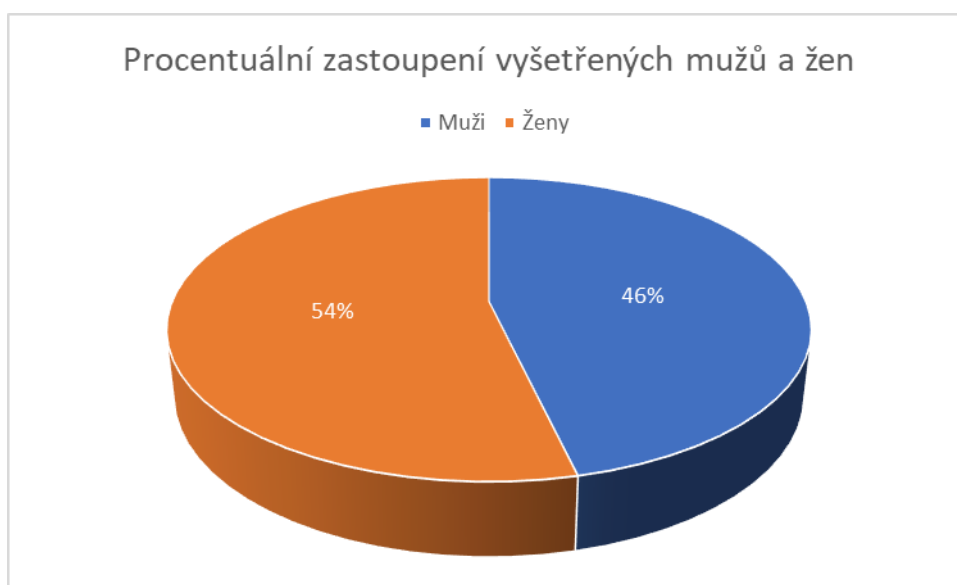
#### 9.1.1 Dle pohlaví

Tabulka č. 8 Rozdělení pacientů podle pohlaví

	Počet pacientů	Procenta
Muži	282	46 %
Ženy	327	54 %
Celkem	609	

Zdroj: (Zpracováno autorem)

Graf č. 1 Procentuální zastoupení vyšetřených mužů a žen



Zdroj: (Zpracováno autorem)

Za pět let bylo celkem vyšetřeno 609 pacientů, z nichž 327 (54 %) bylo žen a 282 (46 %) mužů. Počet vyšetřených je tedy podobný, nepatrně převládají ženy.

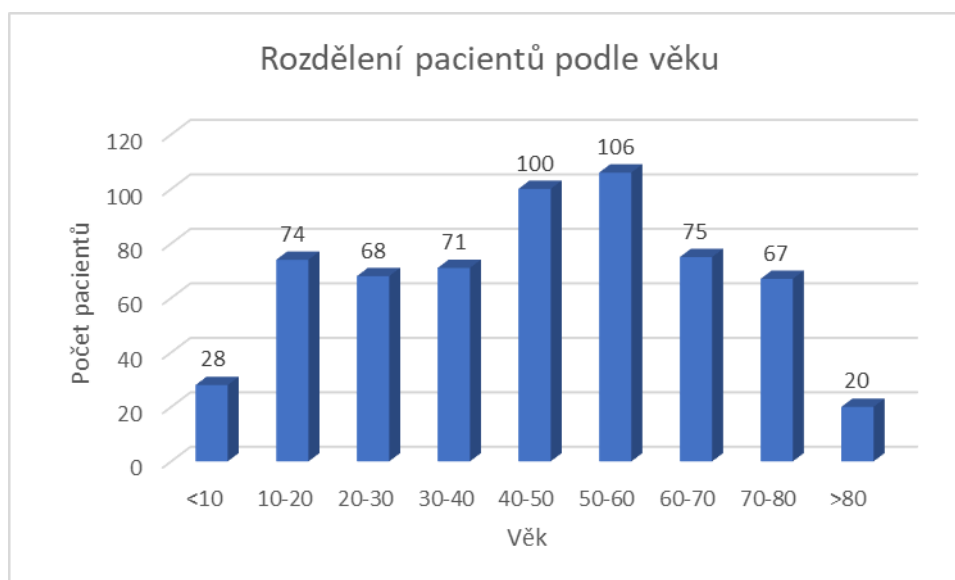
### 9.1.2 Dle věku

**Tabulka č. 9 Rozdělení pacientů podle věku**

Věk	<10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	>80
Počet pacientů	28	74	68	71	100	106	75	67	20

Zdroj: (Zpracováno autorem)

**Graf č. 2 Rozdělení pacientů podle věku**



Zdroj: (Zpracováno autorem)

Nejvíce vyšetřených pacientů se nalézají ve skupině od 50 do 60 let (106). Naopak nejmenší skupinou vyšetřených tvoří pacienti nad 80 let (20). Graf má nejprve stoupající charakter až po věk 50-60let, poté začíná klesat.



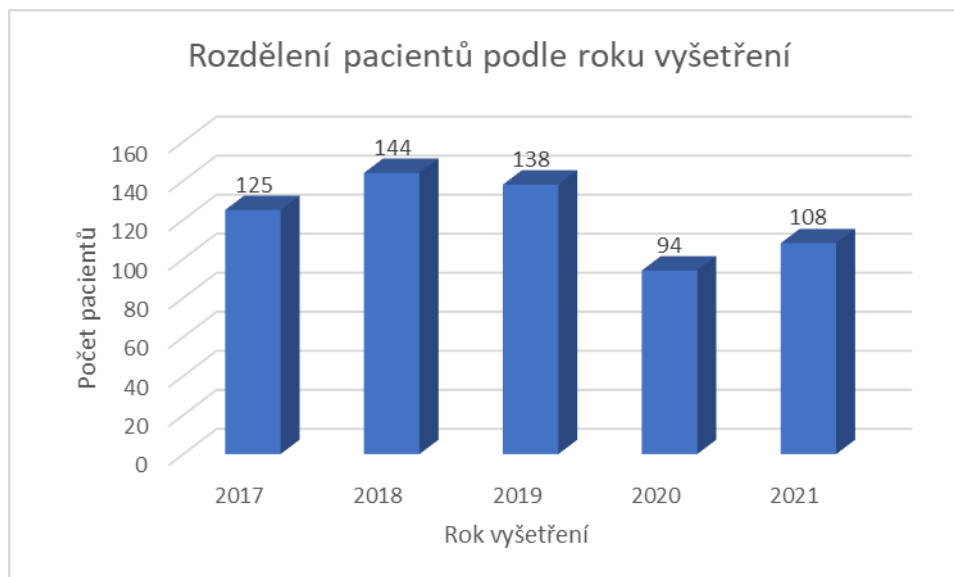
### 9.1.3 Dle roku vyšetření

**Tabulka č. 10 Rozdělení pacientů podle roku vyšetření**

Rok	2017	2018	2019	2020	2021
Muži	53	65	73	48	43
Ženy	72	79	65	46	65
Celkem	125	144	138	94	108

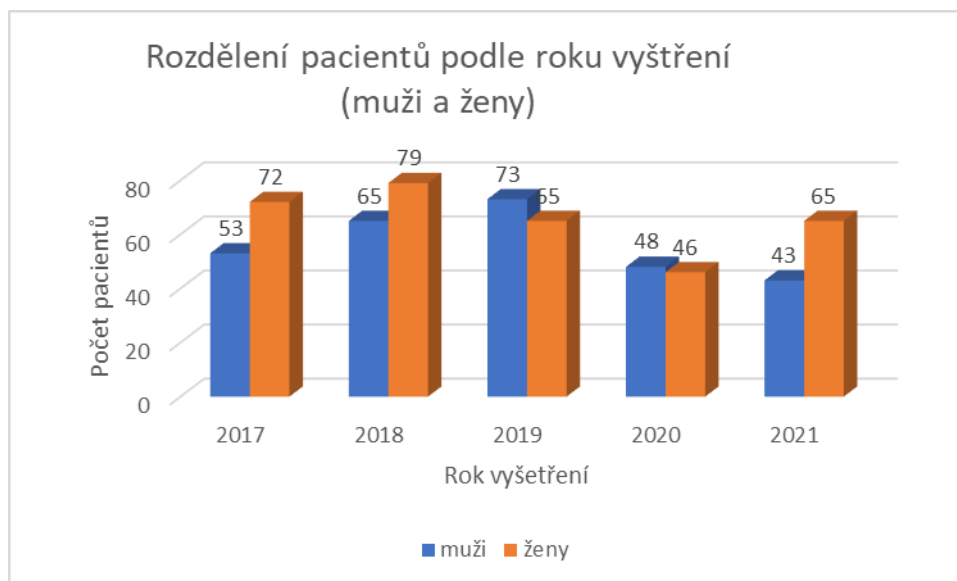
*Zdroj: (Zpracováno autorem)*

**Graf č. 3 Rozdělení pacientů podle roku vyšetření**



*Zdroj: (Zpracováno autorem)*

**Graf č. 4 Rozdělení pacientů podle roku vyšetření (muži a ženy)**



Zdroj: (Zpracováno autorem)

Za průběžných pět let bylo nejvíce vyšetřených pacientů v roce 2018 (144) a nejméně v roce 2020 (94). Tři z pěti roků ovládly vyššími počty vyšetření ženy.

## 9.2 Pozitivní pacienti

Negativní výsledek na přítomnost protilátek vychází do 0,9. Pozitivní výsledek nad 1,1 a hraniční se nachází mezi hodnotami 0,9-1,1. V případě hraničního výsledku se test musí po 2-6 týdnech opakovat. (Anonymous, 2018)

**Tabulka č. 11 Rozdělení pacientů podle výsledků na IgG protilátky**

	Počet pacientů	Procenta
<b>Pozitivní</b>	40	7 %
<b>Hraniční</b>	6	1 %
<b>Negativní</b>	563	92 %
<b>Celkem</b>	609	

Zdroj: (Zpracováno autorem)

**Graf č. 5** Procentuální zastoupení výsledků na IgG protilátky



Zdroj: (Zpracováno autorem)

S velkou převahou zvítězily negativní výsledky s hodnotou 563 (92 %), pozitivních výsledků bylo 40 (7 %) a hraničních výsledků bylo naměřeno jen 6 (1 %) z celkového počtu 609 testování.

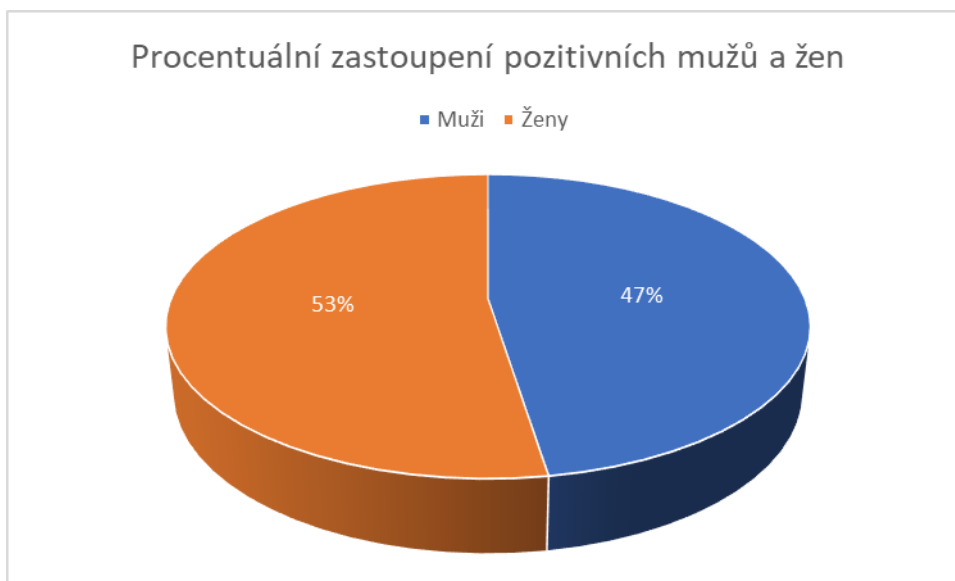
### 9.2.1 Pozitivní dle pohlaví

**Tabulka č. 12** Rozdělení pozitivních pacientů podle pohlaví

	Počet pozitivních	Procenta
<b>Muži</b>	19	47 %
<b>Ženy</b>	21	53 %
<b>Celkem</b>	40	

Zdroj: (Zpracováno autorem)

**Graf č. 6** Procentuální zastoupení pozitivních mužů a žen



Zdroj: (Zpracováno autorem)

Počet pozitivních výsledků byl nepatrně vyšší u žen 21 (53 %), mužů bylo pozitivních 19 (47 %).

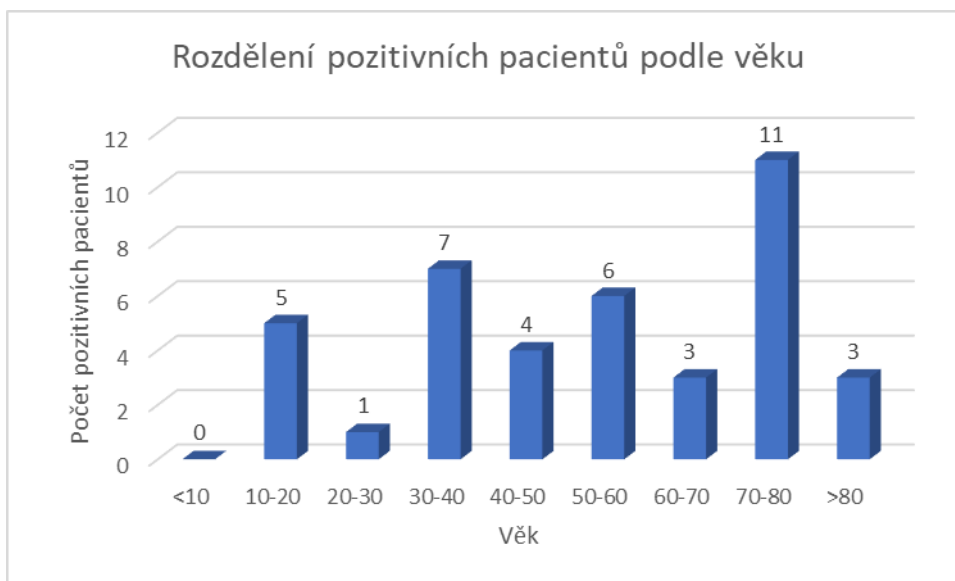
### 9.2.2 Pozitivní dle věku

**Tabulka č. 13** Rozdělení pozitivních pacientů podle věku

Věk	<10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	>80
Počet pozitivních	0	5	1	7	4	6	3	11	3

Zdroj: (Zpracováno autorem)

**Graf č. 7 Rozdělení pozitivních pacientů podle věku**



*Zdroj: (Zpracováno autorem)*

Nejvíce pozitivních pacientů se nalézá ve skupině od 70 do 80 let (11). Naopak nejmenší skupinu pozitivních tvoří děti pod deset let (0) a poté pacienti od 20 do 30 let (1).

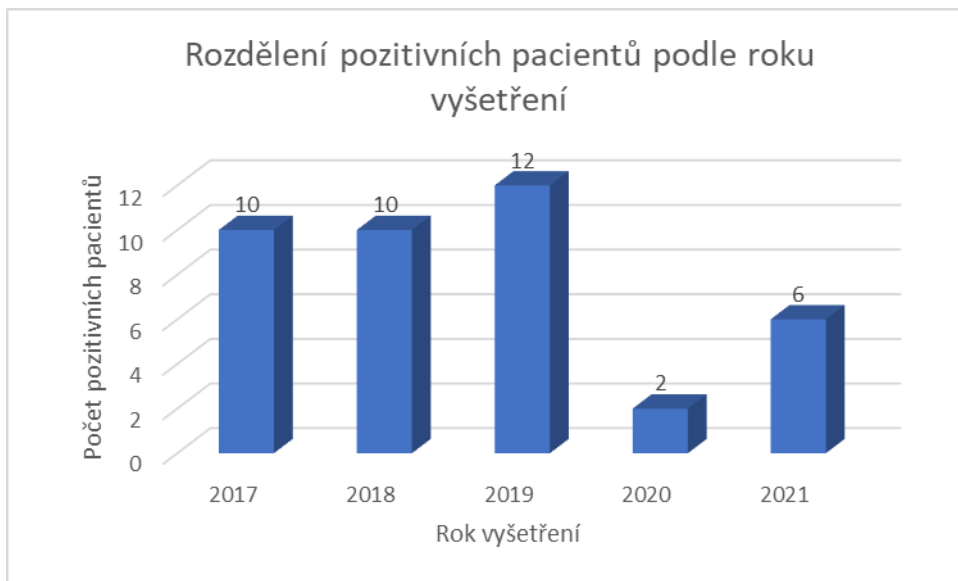
### 9.2.3 Pozitivní dle roku vyšetření

**Tabulka č. 14 Rozdělení pozitivních pacientů podle roku vyšetření**

Rok	2017	2018	2019	2020	2021
Pozitivní muži	4	6	5	1	3
Pozitivní ženy	6	4	7	1	3
Celkem pozitivních	10	10	12	2	6

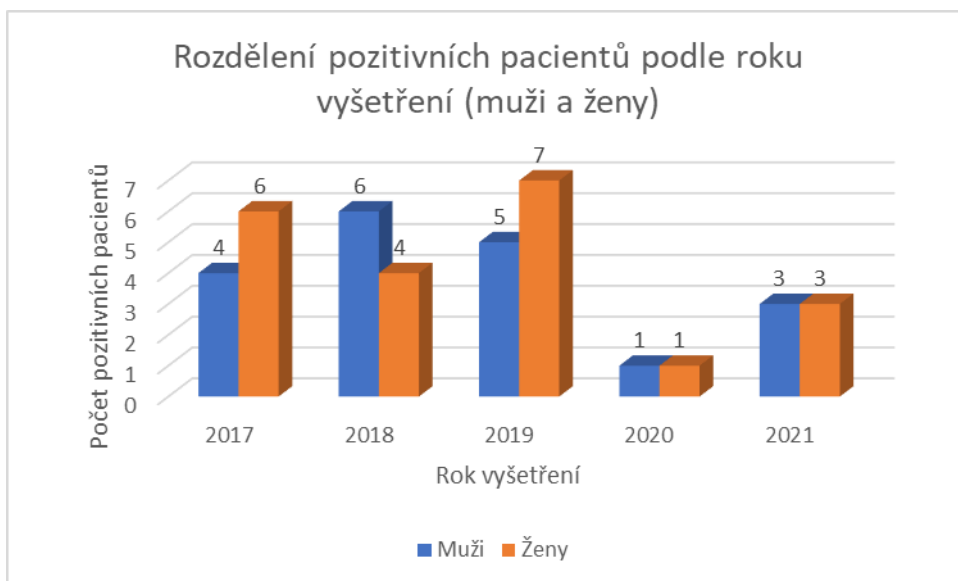
*Zdroj: (Zpracováno autorem)*

**Graf č. 8 Rozdělení pozitivních pacientů podle roku vyšetření**



Zdroj: (Zpracováno autorem)

**Graf č. 9 Rozdělení pozitivních pacientů podle roku vyšetření (muži a ženy)**



Zdroj: (Zpracováno autorem)

Za průběžných pět let bylo nejvíce pozitivních pacientů v roce 2019 (12) a nejméně v roce 2020 (2). Výsledky pro muže a ženy z průběhu let si jsou podobné.

### 9.3 Avidita u pozitivních pacientů

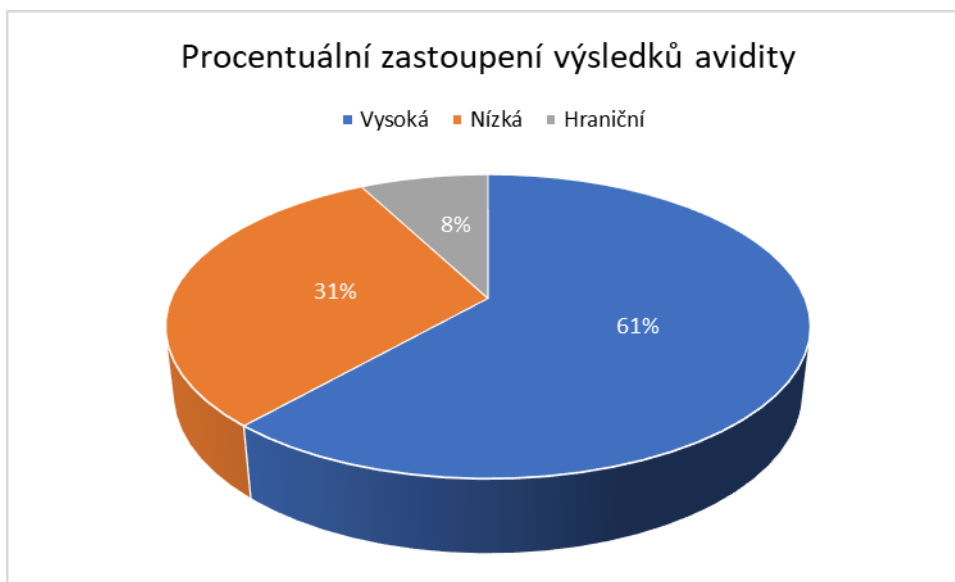
Avidita se měří u pozitivních výsledků na přítomnost IgG protilátek. Nízká avidita (<40) značí časnou nákazu, vysoká avidita (51-100) naopak starší nákazu. Hraniční výsledek (41-50) se musí po 2-6 týdnech přeměřit. (Anonymous, 2018)

**Tabulka č. 15 Rozdělení pacientů podle výsledků avidity**

	Počet pacientů	Procenta
Nízká	12	31 %
Hraniční	3	8 %
Vysoká	24	61 %
Celkem	39	

Zdroj: (Zpracováno autorem)

**Graf č. 10 Procentuální zastoupení výsledků avidity**



Zdroj: (Zpracováno autorem)

Nejvíce pacientů (24; 61 %) má vysokou aviditu IgG protilátek. Protilátky už tedy mají v těle déle. Pacientů s nízkou aviditou je méně (12; 31 %), tito pacienti byli právě nakaženi. Hraniční avidita byla naměřena u 3 (8 %) pacientů.

Jeden pozitivní pacient na IgG protilátky neměl uvedené hodnoty z vyšetření na aviditu. V tabulce proto není uvedeno 40 pacientů, kterým vyšly testy na protilátky pozitivně, ale jenom 39.

## 9.4 Výsledky vyšetření za období 2009-2013

V této části jsou porovnána data vyšetřovaných pacientů ve FN HK na *T. canis* a *T. cati* z průběhu let 2009-2013. Data byla zpracována PharmDr. Barborou Voxovou a Z. Čermákovou. Autor data použil a přepracoval je do bakalářské práce. (Voxová a Čermáková, 2014)

### 9.4.1 Vyšetřovaní pacienti dle roku vyšetření

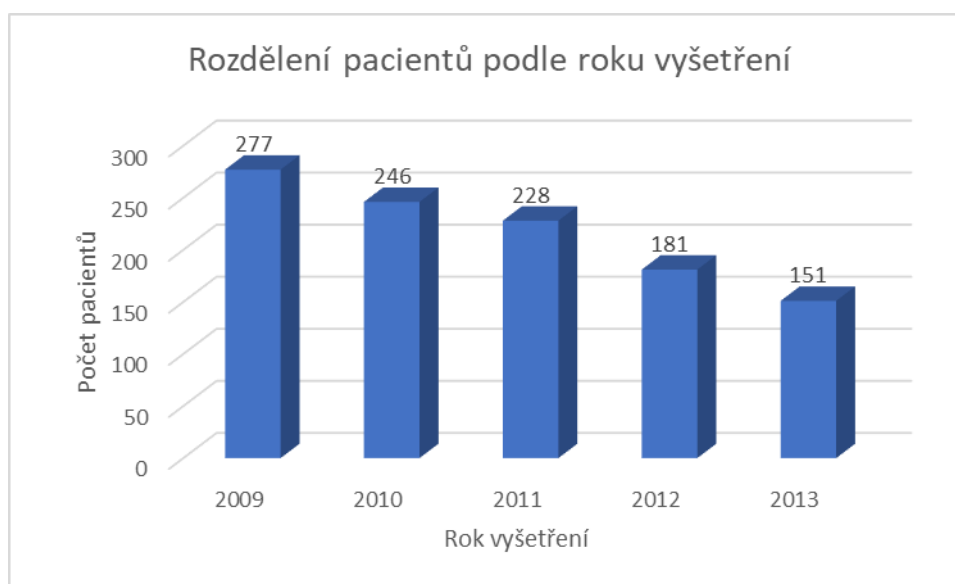
Tabulka č. 16 Rozdělení pacientů podle roku vyšetření

Rok	2009	2010	2011	2012	2013
Celkem	277	246	228	181	151

Zdroj: Voxová a Čermáková, 2014 (Zpracováno autorem)

Celkově bylo za pět let vyšetřeno 1083 pacientů.

Graf č. 11 Rozdělení pacientů podle roku vyšetření



Zdroj: Voxová a Čermáková, 2014 (Zpracováno autorem)



Za průběžných pět let bylo nejvíce vyšetřených pacientů v roce 2009 (277) a nejméně v roce 2013 (151). Graf má klesající charakter, což znamená, že počty vyšetření se v průběhu let se snížily. (Voxová a Čermáková, 2014)

#### 9.4.2 Pozitivní pacienti

**Tabulka č. 17 Rozdělení pacientů podle výsledků na IgG protilátky**

	Počet pacientů	Procenta
<b>Pozitivní</b>	106	10 %
<b>Negativní</b>	977	90 %
<b>Celkem</b>	1083	

Zdroj: Voxová a Čermáková, 2014 (Zpracováno autorem)

**Graf č. 12 Procentuální zastoupení výsledků na IgG protilátky**



Zdroj: Voxová a Čermáková, 2014 (Zpracováno autorem)

S velkou převahou je negativních výsledků (977; 90 %) více než výsledků pozitivních (106; 10 %) z celkového počtu 1083 testování. (Voxová a Čermáková, 2014)

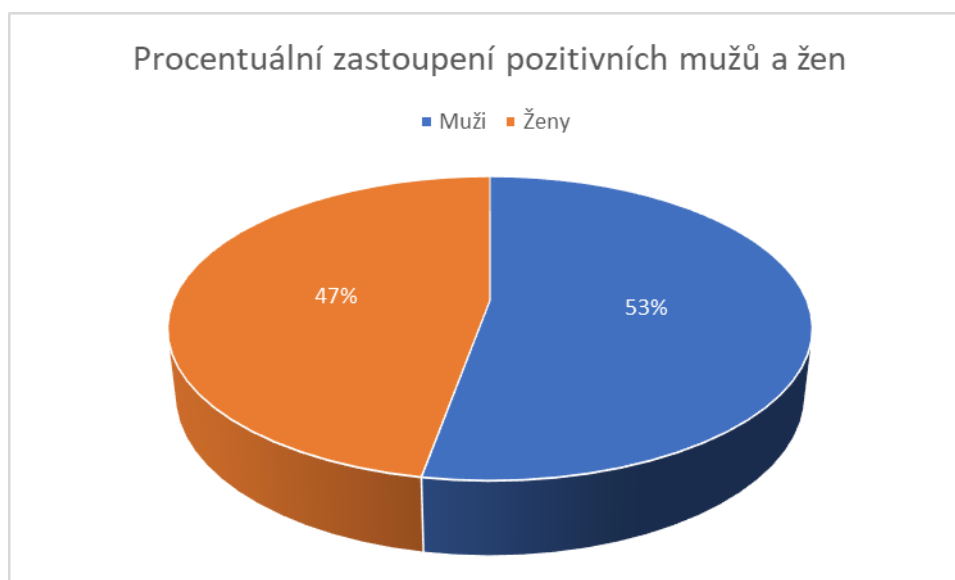
### 9.4.3 Pozitivní vyšetřovaní pacienti dle pohlaví

**Tabulka č. 18 Rozdělení pozitivních pacientů podle pohlaví**

	Počet pozitivních	Procenta
<b>Muži</b>	56	53 %
<b>Ženy</b>	50	47 %
<b>Celkem</b>	106	

*Zdroj: Voxová a Čermáková, 2014 (Zpracováno autorem)*

**Graf č. 13 Procentuální zastoupení pozitivních mužů a žen**



*Zdroj: Voxová a Čermáková, 2014 (Zpracováno autorem)*

Počet pozitivních výsledků byl nepatrně vyšší u mužů 56 (53 %), žen bylo pozitivních 50 (47 %). (Voxová a Čermáková, 2014)

#### 9.4.4 Pozitivní vyšetřovaní pacienti dle roku vyšetření

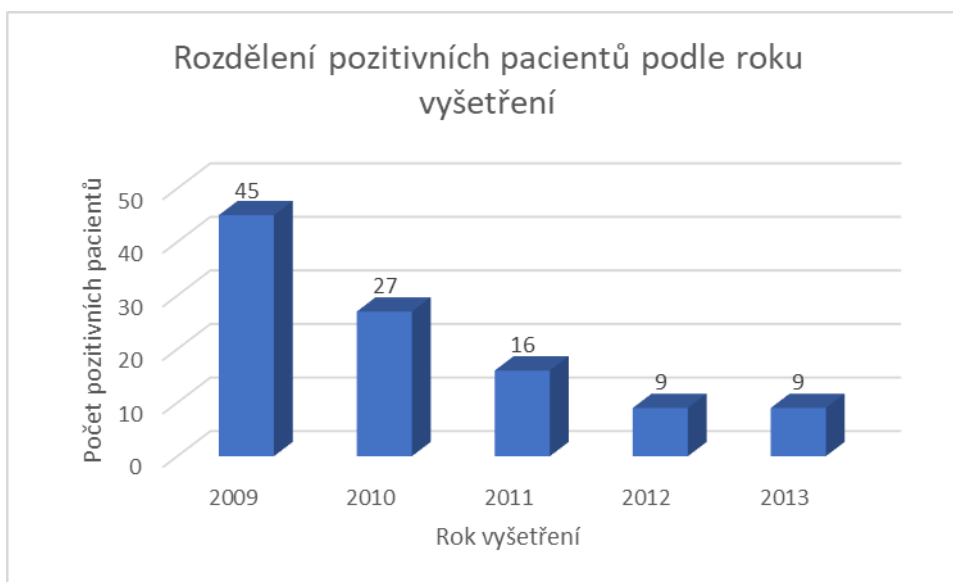
**Tabulka č. 19 Rozdělení pozitivních pacientů podle roku vyšetření**

Rok	2009	2010	2011	2012	2013
Pozitivní pacienti	45	27	16	9	9

Zdroj: Voxová a Čermáková, 2014 (Zpracováno autorem)

*Celkově bylo za pět let 106 pozitivních výsledků.*

**Graf č. 14 Rozdělení pozitivních pacientů podle roku vyšetření**



Zdroj: Voxová a Čermáková, 2014 (Zpracováno autorem)

Za průběžných pět let bylo nejvíce pozitivních pacientů v roce 2009 (45) a nejméně v roce 2013 (9). Graf má klesající charakter, což znamená, že počty pozitivních výsledků se v průběhu let snížily. (Voxová a Čermáková, 2014)

#### 9.4.5 Avidita u pozitivních pacientů

**Tabulka č. 20 Rozdělení pacientů podle výsledků avidity**

	Počet pacientů	Procenta
Nízká	12	11 %
Vysoká	94	89 %
Celkem	106	

Zdroj: Voxová a Čermáková, 2014 (Zpracováno autorem)

**Graf č. 15 Procentuální zastoupení výsledků avidity**



Zdroj: Voxová a Čermáková, 2014 (Zpracováno autorem)

Nejvíce pacientů (94; 89 %) má vysokou aviditu IgG protilátek. Protilátky už tedy mají v těle déle. Pacientů s nízkou aviditou je méně (12; 11 %), tito pacienti byli právě nakaženi. (Voxová a Čermáková, 2014)

## 9.5 Porovnání výsledků za období 2009-2013 s výsledky za období 2017-2021

V této části kapitoly jsou spolu porovnána již výše uvedená data z období 2009-2013 s daty z období 2017-2021. Data vyšetřovaných pacientů pochází z FN HK. (Voxová a Čermáková, 2014)

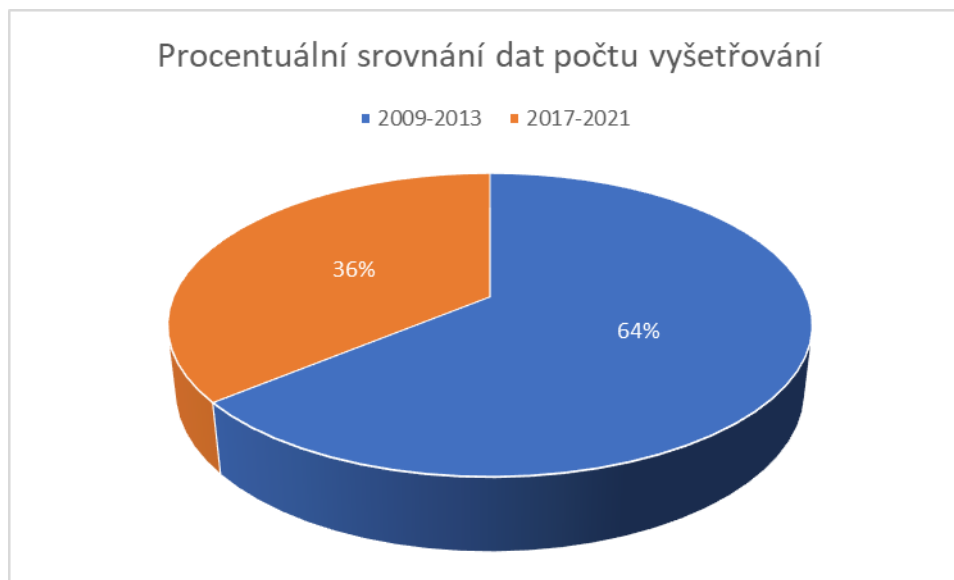
### 9.5.1 Vyšetřování pacienti

**Tabulka č. 21 Porovnání dat počtu vyšetření**

	2009-2013	2017-2021
Počet vyšetření	1083	609
Procenta	64 %	36 %

Zdroj: Voxová a Čermáková, 2014 (Zpracováno autorem)

**Graf č. 16 Procentuální porovnání dat počtu vyšetření**



Zdroj: Voxová a Čermáková, 2014 (Zpracováno autorem)

Za roky 2009-2013 proběhlo 1083 (64 %) vyšetření, za roky 2017-2021 609 (36 %) vyšetření. Počty vyšetření se tedy rapidně snížily. (Voxová a Čermáková, 2014)

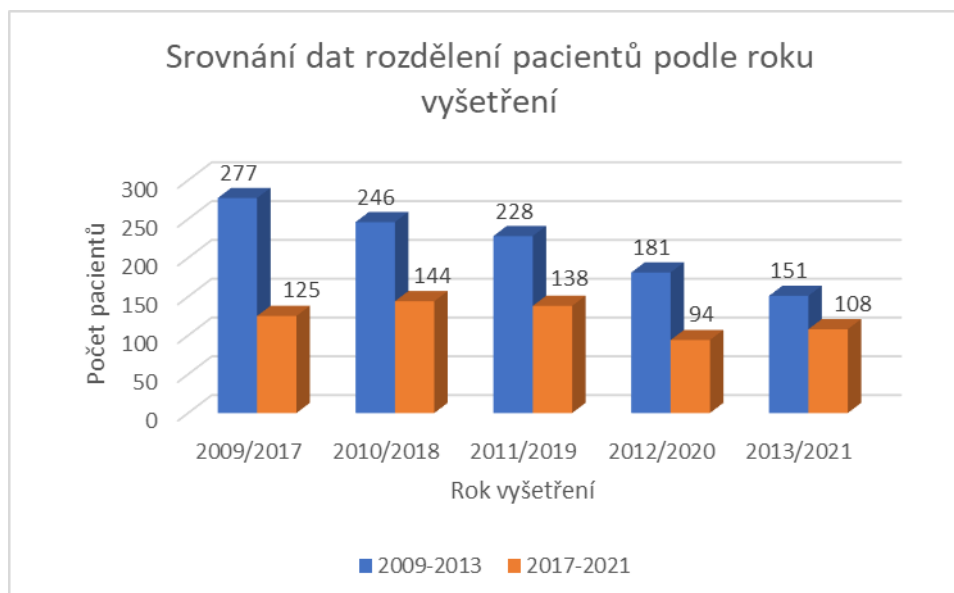
## 9.5.2 Vyšetřování pacienti dle roku vyšetření

**Tabulka č. 22 Porovnání dat rozdělení pacientů podle roku vyšetření**

Rok	1.	2.	3.	4.	5.
2009-2013	277	246	228	181	151
2017-2021	125	144	138	94	108

Zdroj: Voxová a Čermáková, 2014 (Zpracováno autorem)

**Graf č. 17 Porovnání dat rozdělení pacientů podle roku vyšetření**



Zdroj: Voxová a Čermáková, 2014 (Zpracováno autorem)

Podle grafu je zřejmé, že počty vyšetření neustále klesají. Nejméně vyšetření bylo provedeno v roce 2020 (94) a nejvíce v roce 2009 (277). (Voxová a Čermáková, 2014)

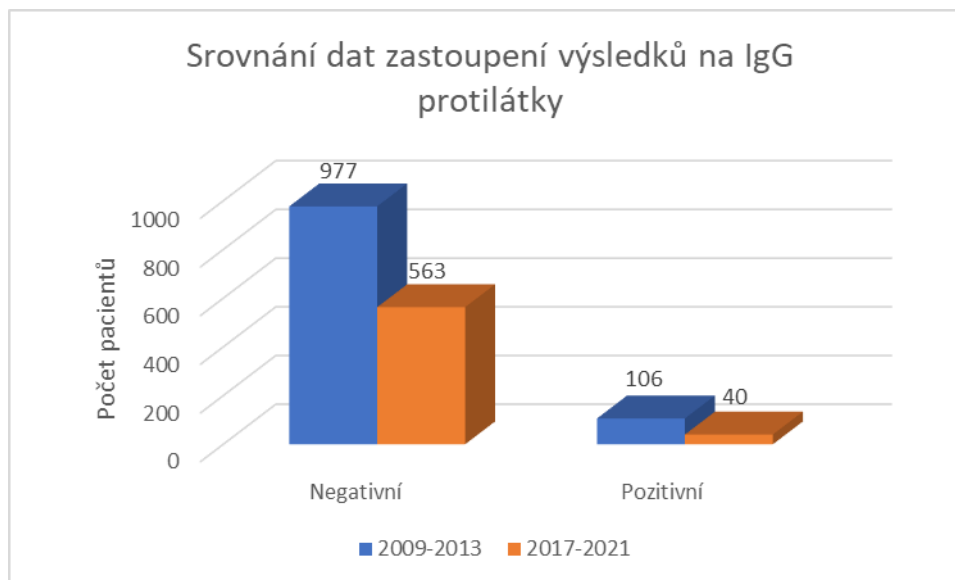
### 9.5.3 Pozitivní pacienti

**Tabulka č. 23 Porovnání dat zastoupení výsledků na IgG protilátky**

	2009-2013	2017-2021
<b>Pozitivní</b>	106	40
<b>Negativní</b>	977	563
<b>Celkem</b>	1083	609

*Zdroj: Voxová a Čermáková, 2014 (Zpracováno autorem)*

**Graf č. 18 Porovnání dat zastoupení výsledků na IgG protilátky**



*Zdroj: Voxová a Čermáková, 2014 (Zpracováno autorem)*

S počtem vyšetření klesl i počet pozitivních výsledků na počet negativních. Pozitivních výsledků v letech 2009-2013 bylo 106 na 977 negativních a v letech 2017-2021 jen 40 na 563 negativních. (Voxová a Čermáková, 2014)

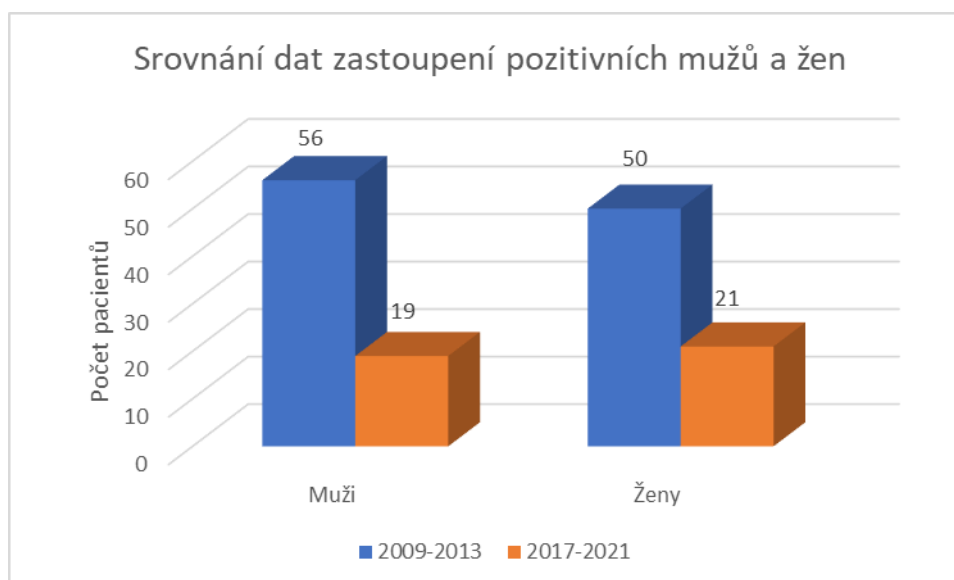
#### 9.5.4 Pozitivní vyšetřovaní pacienti dle pohlaví

**Tabulka č. 24 Porovnání dat zastoupení pozitivních mužů a žen**

	2009-2013	2017-2021
Muži	56	19
Ženy	50	21
Celkem	106	40

*Zdroj: Voxová a Čermáková, 2014 (Zpracováno autorem)*

**Graf č. 19 Porovnání dat zastoupení pozitivních mužů a žen**



*Zdroj: Voxová a Čermáková, 2014 (Zpracováno autorem)*

Podle dat je nyní více pozitivních žen (21) než mužů (19). Dříve tomu bylo naopak. Pozitivních žen bylo 50 a mužů 56. (Voxová a Čermáková, 2014)



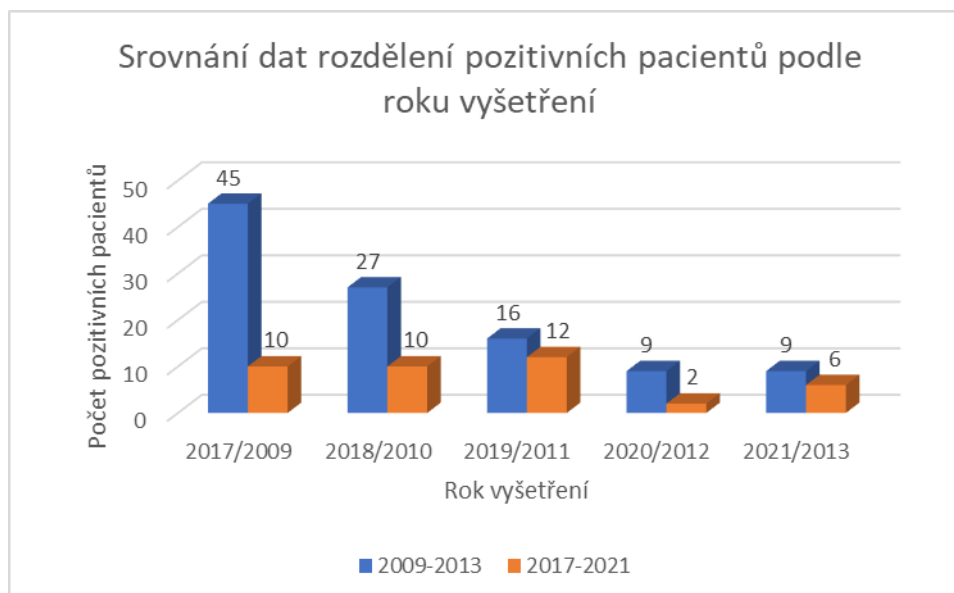
### 9.5.5 Pozitivní vyšetřovaní pacienti dle roku vyšetření

**Tabulka č. 25 Porovnání dat rozdělení pozitivních pacientů podle roku vyšetření**

Rok	1.	2.	3.	4.	5.
2009-2013	45	27	16	9	9
2017-2021	10	10	12	2	6

Zdroj: Voxová a Čermáková, 2014 (Zpracováno autorem)

**Graf č. 20 Porovnání dat rozdělení pozitivních pacientů podle roku vyšetření**



Zdroj: Voxová a Čermáková, 2014 (Zpracováno autorem)

Graf má kromě několika menších výkyvů klesající charakter. Znamená to, že počet pozitivních záchytů se snižuje. Nejméně záchytů bylo v roce 2020 (2), nejvíce v roce 2009 (45). (Voxová a Čermáková, 2014)

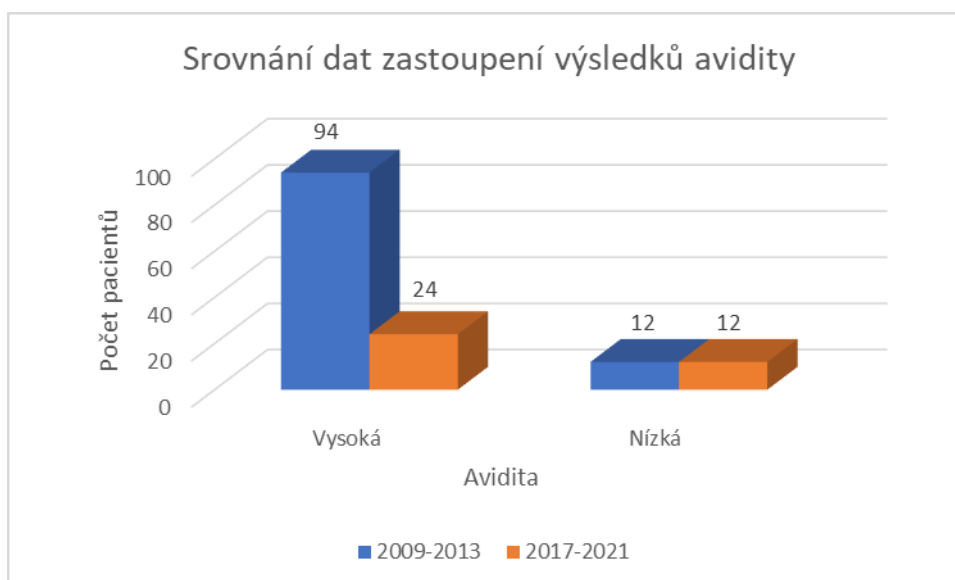
## 9.5.6 Avidita u pozitivních pacientů

**Tabulka č. 26 Porovnání dat zastoupení výsledků avidity**

	2009-2013	2017-2021
Nízká	12	12
Vysoká	94	24
Celkem	106	36

Zdroj: Voxová a Čermáková, 2014 (Zpracováno autorem)

**Graf č. 21 Porovnání dat rozdělení pozitivních pacientů podle roku vyšetření**



Zdroj: Voxová a Čermáková, 2014 (Zpracováno autorem)

Přestože je méně pozitivních záchytů, přibývá jich více s nízkou aviditou.  
(Voxová a Čermáková, 2014)

## 10. DISKUSE

Hlavním účelem této práce bylo zhodnotit výsledky pacientů z průběhu let 2017-2021 na přítomnost protilátek proti *Toxocara sp.* a poté i aviditu těchto protilátek. Práce zahrnuje i data ze studie PharmDr. Barbory Voxové a Z. Čermákové z let 2009-2013. Data byla vzata z FN HK. Ve výsledcích jsem je následně porovnávala.

Zjistila jsem, že ve FN HK v průběhu let klesl počet vyšetření na IgG protilátky proti toxokaře. Otázkou je, co by za tímto negativním markerem mohlo stát. V naší době se neustále řeší Covid-19, na ostatní vyšetření se díky tomu zapomíná. Z grafu 17 je patrné, že počty vyšetření mají klesající tendenci již od roku 2009, kdy Covid-19 ještě nebyl. Odhaduji tedy, že covidová epidemie mohla výsledky ovlivnit jen nepatrně. Pozitivní je, že na menší počet záchytů nemocných připadá více s nízkou aviditou. Tento marker znamená, že více pacientů bylo odhaleno na počátku onemocnění, mohou být tedy dříve zaléčeni. Zároveň ale klesl i počet pozitivních výsledků na počet negativních. Zjistila jsem také, že dnes je o trochu více pozitivních žen než mužů, přičemž v letech 2009-2013 tomu bylo naopak. (Voxová a Čermáková, 2014)

V knize od *M. Uhlíkové et al.* se uvádí výsledky vyšetření dětí do 10 let a dospělých dárců krve z různých měst v ČR. Vyšetřování probíhalo v roce 1979 formou ELISA testů. Pozitivních vyšlo celkem 18,9 % z 1336 vyšetřovaných (z toho 11,4 % dětí do 10 let z 936 vyšetřovaných a 25,7 % dospělých z 400 vyšetřovaných). *M. Uhlíková et al.* tedy uvádí vyšší promořenost dospělé populace než dětí do 10 let. Vysvětluje to dlouhodobějším přetrváváním protilátek. Já ve svých výsledcích dokonce nemám žádný záchyt dítěte do 10 let. Přitom jako rizikový faktor se v publikacích uvádí nízký věk (viz. kapitola rizikové faktory). Podle mých výsledků se počty pozitivních začaly výrazněji zvedat až od věku 30 let a výše. Rizikový faktor nižšího věku se tedy nepotvrdil ani v jednom případě.

Počet celkových pozitivních výsledků se také zmenšil, jelikož *M. Uhlíková et al.* jich uvádí 18,9 %, PharmDr. Barbora Voxová a Z. Čermáková už jen 10 % a moje práce už jen 7 %.

*M. Uhlíková et al.* dokonce porovnali i rozdíly v pozitivitě mezi pacienty z města a pacienty z vesnice. Tyto rozdíly jsou značné. Počty pozitivních převládají mezi

venkovskou populací. Bohužel jsem tyto údaje neměla k dispozici, takže jsem toto hledisko nemohla zohlednit ve svých výsledcích. (Uhlíková Hübner, 1983; Voxová a Čermáková, 2014)

*Skulinova K. et al.* ve své studii uvádí výsledky vyšetření z let 2012-2016 z České republiky. Jako nejvíce promořený kraj vyšel Ústecký se 7,5 %, naopak Zlínský kraj měl nejnižší séropozitivitu s 1,4 %. Celkový počet vyšetřovaných byl 4428. Protilátky byly detekovány u 160 z nich (3,6 %; 74 žen = 3,4 % a 86 mužů = 3,8 %). V porovnání s výsledky PharmDr. Barbory Voxové a Z. Čermákové (10 %) a s mými výsledky (7 %) bylo o dost méně pozitivních. 16 ze 160 (3,9 %) pozitivních výsledků ve studii *Skulinove K. et al.* bylo dětí do 19 let. Počet pozitivních žen vyšel nižší než mužů. Stejný výsledek vyšel i PharmDr. Barboře Voxové a Z. Čermákové. Mně naopak vyšlo více pozitivních mužů. Přitom publikace uvádí (viz. kapitola rizikové faktory), že ve větší rizikové skupině jsou muži. Toto stanovisko potvrdil jako jediný můj výsledek. (Skulinova et al., 2020, Voxová a Čermáková, 2014)

Podle *Ma et al.* je světová séroprevalence 19 % a evropská 11 %. Počty pozitivních výsledků v mojí práci za období 2017-2021 (7 %) jsou nižší než data udávaná celosvětově i v Evropě. Počty pozitivních výsledků v práci PharmDr. Barbory Voxové a Z. Čermákové za období 2009-2013 (10 %) jsou srovnatelné s evropskými a odlišné od celosvětových. (Ma et al., 2020; Voxová a Čermáková, 2014)

Jako jeden z rizikovějších faktorů se podle dat z období 2017-2021 a studie *M. Uhlíkové et al.* jeví vyšší věk, i když publikace často naopak uvádí vyšší séropozitivitu u pacientů s nižším věkem. Je to proto, že se děti často hrabou v hlíně, kam chodí rády kočky a psi vykonávat svoji potřebu. Poté si neumyjí ruce a strkají je do pusy.

Dalším očekávaným výsledkem bylo, že více nakažených je mužů. Myslím, že tento předpoklad je proto, že muži většinou pracují s hlínou v zemědělství. Toto stanovisko potvrdil jen můj výsledek.

Dalším důležitým faktorem je vyšší výskyt positivity u vesnické populace. Tento fakt jsem bohužel do své práce nemohla zahrnout. Myslím si ale, že je důležitý. Lidé žijící na vesnici daleko více přicházejí do kontaktu s půdou, mají např. zahrádky,

o které se starají. Tento fakt zohlednila pouze práce *M. Uhlíkové et al.* a vyšel podle předpokladů. (Uhlíková a Hübner, 193)

## 11. ZÁVĚR

Práce popisuje vyšetřování na protilátky proti *Toxocara sp.* u pacientů z FN HK. Vyšetřování probíhalo metodou ELISA a bylo prováděno v letech 2019-2021, výsledky práce byly porovnány s výsledky z období 2009-2013 ze stejné laboratoře.

Počty vyšetřovaných materiálů každým rokem rapidně klesají. S počtem vyšetření klesl i počet záchytů s pozitivním výsledkem. Naopak s nižším počtem pozitivních výsledků stoupl počet nízkoaviditních záchytů. Nemocní jsou dnes tedy odhalováni daleko dříve. Nejvíce testovaných bylo ve věkové skupině mezi 50-60 roky. Nejméně testovaných bylo ve věku od 80 let a výše.

Vyšší věk vyšetřovaných pacientů se jeví jako pozitivní faktor, jelikož nejvíce pozitivních pacientů bylo detekováno ve věkové skupině 70-80 let. Je zajímavé, že v našem souboru nebyly testovány žádné děti ve věku do deseti let, když literární údaje často uvádějí právě v této věkové skupině zvýšený záchyt. Zdá se, že u nás je u dětí toto onemocnění silně poddiagnostikováno. Bylo by určitě přínosné zaměřit se s touto problematikou na dětské lékaře, neboť je zřejmé, že řada onemocnění uniká jejich pozornosti.

## 12. POUŽITÉ ZKRATKY

Zkratka	Význam zkratky	Český význam
[b.r.]	-	Bez roku
CNS	Central nervous system	Centrální nervová soustava
CT	Computerized tomography	Počítačová tomografie
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay	Enzymoimunoanalýza s adsorbční reakční složkou na vhodný povrch
EIA	Enzyme immuno-assay	Enzymoimunoanalýza
FN HK	University hospital Hradec Králové	Fakultní nemocnice Hradec Králové
Iav	Avidity index	Index avidity
IgE	Immunoglobulin E	Imunoglobulin E
IgG	Immunoglobulin G	Imunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M	Imunoglobulin M
IP	Positivity index	Index positivity
KFR	Complement fixation reaction	Komplement fixační reakce
MRI	Magnetic resonance imaging	Magnetická rezonance
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerázová řetězová reakce
RIA	Radioisotope immuno-assay	Radioimunoanalýza
<i>T. canis/cati</i>	<i>Toxocara canis/cati</i>	Škrkavka psí/kočičí
<i>Toxocara sp.</i>	<i>Toxocara species</i>	Druh škrkavky

## 13. SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1 Taxonomie.....	12
Tabulka č. 2 Séroprevalence v různých oblastech .....	14
Tabulka č. 3 Globální prevalence .....	14
Tabulka č. 4 Rizikové faktory .....	15
Tabulka č. 5 Interpretace výsledků vyšetření avidity .....	29
Tabulka č. 6 Interpretace výsledků vyšetření detekce IgG protilátek.....	34
Tabulka č. 7 Interpretace výsledků vyšetření avidity .....	38
Tabulka č. 8 Rozdělení pacientů podle pohlaví .....	39
Tabulka č. 9 Rozdělení pacientů podle věku .....	40
Tabulka č. 10 Rozdělení pacientů podle roku vyšetření.....	41
Tabulka č. 11 Rozdělení pacientů podle výsledků na IgG protilátky .....	42
Tabulka č. 12 Rozdělení pozitivních pacientů podle pohlaví.....	43
Tabulka č. 13 Rozdělení pozitivních pacientů podle věku .....	44
Tabulka č. 14 Rozdělení pozitivních pacientů podle roku vyšetření .....	45
Tabulka č. 15 Rozdělení pacientů podle výsledků avidity .....	47
Tabulka č. 16 Rozdělení pacientů podle roku vyšetření.....	48
Tabulka č. 17 Rozdělení pacientů podle výsledků na IgG protilátky .....	49
Tabulka č. 18 Rozdělení pozitivních pacientů podle pohlaví.....	50
Tabulka č. 19 Rozdělení pozitivních pacientů podle roku vyšetření .....	51
Tabulka č. 20 Rozdělení pacientů podle výsledků avidity .....	52
Tabulka č. 21 Porovnání dat počtu vyšetření .....	53
Tabulka č. 22 Porovnání dat rozdělení pacientů podle roku vyšetření.....	54
Tabulka č. 23 Porovnání dat zastoupení výsledků na IgG protilátky .....	55
Tabulka č. 24 Porovnání dat zastoupení pozitivních mužů a žen .....	56
Tabulka č. 25 Porovnání dat rozdělení pozitivních pacientů podle roku vyšetření .....	57
Tabulka č. 26 Porovnání dat zastoupení výsledků avidity .....	58



## 14. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1 Globální séroprevalence infekce toxocarózou u lidí .....	13
Obrázek č. 2 Anatomie larvy.....	15
Obrázek č. 3 Dospělá škrkavka .....	16
Obrázek č. 4 Vajíčka .....	17
Obrázek č. 5 Vývojový cyklus.....	17
Obrázek č. 6 Princip KFR.....	26
Obrázek č. 7 ELISA.....	27
Obrázek č. 8 Western blot.....	28
Obrázek č. 9 Pracovní schéma na vyšetření IgG protilátek .....	33
Obrázek č. 10 Pracovní schéma na vyšetření avidity .....	36

## 15. SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1 Procentuální zastoupení vyšetřených mužů a žen.....	39
Graf č. 2 Rozdělení pacientů podle věku.....	40
Graf č. 3 Rozdělení pacientů podle roku vyšetření .....	41
Graf č. 4 Rozdělení pacientů podle roku vyšetření (muži a ženy).....	42
Graf č. 5 Procentuální zastoupení výsledků na IgG protilátky .....	43
Graf č. 6 Procentuální zastoupení pozitivních mužů a žen.....	44
Graf č. 7 Rozdělení pozitivních pacientů podle věku .....	45
Graf č. 8 Rozdělení pozitivních pacientů podle roku vyšetření .....	46
Graf č. 9 Rozdělení pozitivních pacientů podle roku vyšetření (muži a ženy) .....	46
Graf č. 10 Procentuální zastoupení výsledků avidity .....	47
Graf č. 11 Rozdělení pacientů podle roku vyšetření.....	48
Graf č. 12 Procentuální zastoupení výsledků na IgG protilátky .....	49
Graf č. 13 Procentuální zastoupení pozitivních mužů a žen.....	50
Graf č. 14 Rozdělení pozitivních pacientů podle roku vyšetření .....	51
Graf č. 15 Procentuální zastoupení výsledků avidity .....	52
Graf č. 16 Procentuální porovnání dat počtu vyšetření .....	53
Graf č. 17 Porovnání dat rozdělení pacientů podle roku vyšetření .....	54
Graf č. 18 Porovnání dat zastoupení výsledků na IgG protilátky.....	55
Graf č. 19 Porovnání dat zastoupení pozitivních mužů a žen.....	56
Graf č. 20 Porovnání dat rozdělení pozitivních pacientů podle roku vyšetření .....	57
Graf č. 21 Porovnání dat rozdělení pozitivních pacientů podle roku vyšetření .....	58

## 16. POUŽITÁ LITERATURA

- 1) ANONYMOUS. Centers for disease control and prevention. *Parasites - Toxocariasis (also known as Roundworm Infection)* [online]. 2013 [cit. 2021-12-01]. Dostupné z: <http://medbox.iiab.me/modules/en-cdc/www.cdc.gov/parasites/toxocariasis/biology.html>
- 2) ANONYMOUS. IMUNOCHEMICKÉ TESTY přehled a principy metod: 2. část hemolytické testy. In: *INCHEBIO: Inovace studijních programů Speciální chemicko-biologické obory na Univerzitě Pardubice* [online]. [b.r.] [cit. 2022-03-20]. Dostupné z: <https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/imunochemie/imunochemie-seminare-hemolyticke-testy-vk.pdf>
- 3) ANONYMOUS. *Návod pro použití EIA Toxocara IgG: Souprava pro profesionální použití*. Verze 27. Brno: TestLine Clinical Diagnostics, 2018.
- 4) ANONYMOUS. TOXOCARA Western Blot IgG. In: *LDBIO Diagnostics* [online]. 2020 [cit. 2022-03-07]. Dostupné z: <https://ldbiodiagnostics.com/en/our-products/immunoblots/toxocara-western-blot-igg/>
- 5) BEDNÁŘ, Marek, Věra FRAŇKOVÁ, Jiří SCHINDLER, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996, 560 s. ISBN 978-80-2380-297-9.
- 6) BÍLKOVÁ FRÁNKOVÁ, H., A. HOZÁK, J. POVOVÁ a V. JANOUT. Praktický lékař. *Epidemiologie a diagnostika larvální toxokarózy* [online]. 2014, (5) [cit. 2021-12-02]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/prakticky-lekar/2014-5/epidemiologie-a-diagnostika-larvalni-toxokarozy-50652>
- 7) BOWMAN, Dwight D. History of *Toxocara* and the associated larva migrans. *Toxocara and Toxocariasis* [online]. Elsevier, 2020a, 2020, 17-38 [cit. 2022-02-04]. Advances in Parasitology. ISBN 9780128209585. Dostupné z: doi:10.1016/bs.apar.2020.01.037

- 8) BOWMAN, Dwight D. The anatomy of the third-stage larva of *Toxocara canis* and *Toxocara cati*. *Toxocara and Toxocariasis* [online]. Elsevier, 2020b, 2020, 39-61 [cit. 2021-12-15]. Advances in Parasitology. ISBN 9780128209585. Dostupné z: doi:10.1016/bs.apar.2020.03.002
- 9) CAREY, Roberta B., Mindy Gail SCHUSTER a Karin L. MCGOWAN. *Lékařská mikrobiologie v klinických případech*. Praha: Triton, 2011. ISBN 978-807-3874-803.
- 10) CHEN, Jia, Dong-Hui ZHOU, Alasdair J. NISBET, Min-Jun XU, Si-Yang HUANG, Ming-Wei LI, Chun-Ren WANG a Xing-Quan ZHU. Advances in molecular identification, taxonomy, genetic variation and diagnosis of *Toxocara* spp. *Infection, Genetics and Evolution* [online]. Elsevier, 2012, 2020, **12**(7), 1344-1348 [cit. 2022-02-18]. Advances in Parasitology. ISBN 9780128209585. ISSN 15671348. Dostupné z: doi:10.1016/j.meegid.2012.04.019
- 11) ČERVENÁ, Barbora a Tereza FENYKOVÁ. Elektronický atlas významných parazitologických koproskopických nálezů u domácích zvířat: TEST. In: *Veterinární a farmaceutická univerzita Brno: Ústav patologické morfologie a parazitologie* [online]. 2017 [cit. 2022-02-04]. Dostupné z: [https://www.vfu.cz/files/1230\\_05\\_vystup\\_testzverejnit.pdf](https://www.vfu.cz/files/1230_05_vystup_testzverejnit.pdf)
- 12) DELVES, Peter a Ivan ROITT. *Encyclopedia of Immunology*. 2. vydání. Londýn: Academic press, 1998. ISBN 978-0-12-226765-9.
- 13) DESPOMMIER, Dickson. Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2003, **16**(2), 265-272 [cit. 2021-12-08]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.16.2.265-272.2003
- 14) FINSTERER, Josef a Herbert AUER. Neurotoxocarosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* [online]. 2007, **49**(5), 279-287 [cit. 2021-12-01]. ISSN 0036-4665. Dostupné z: doi:10.1590/S0036-46652007000500002

- 15) FLUKEMAN. File:T. canis adult worms wiki.JPG. In: *Wikimedia* [online]. 2008 [cit. 2022-03-08]. Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:T.\\_canis\\_adult\\_worms\\_wiki.JPG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:T._canis_adult_worms_wiki.JPG)
- 16) GOERING, Richard, Hazel DOCKRELL, Mark ZUCKERMAN, Derek WAKELIN, Ivan ROITT, Cedric MIMS a Peter CHIODINI. *Mims' Medical Microbiology*. 4 vyd. Mosby, 2008. ISBN 978-0-323-04475-2.
- 17) HURYCH, Jakub a Roman ŠTÍCHA. *Lékařská mikrobiologie: repetitorium*. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2020. ISBN 978-80-7553-844-4.
- 18) JÍROVEC, Otto a Marie JÍROVCOVÁ. *Parasiti člověka: cizopasníci z říše živočišné*. Praha: Česká grafická unie, 1945.
- 19) JULÁK, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 2. vydání. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2015. ISBN 978-802-4632-100.
- 20) KOLÁŘOVÁ, Libuše. LÉKAŘSKÁ PARAZITOLOGIE: HELMINTOLOGIE. 1. LF UK a VFN: Ústav imunologie a mikrobiologie [online]. 2010 [cit. 2022-02-17]. Dostupné z: [http://tropy.lf1.cuni.cz/Data/files/TROPY/Prezentace\\_EN/ascaris-toxocara-enterobius-2010-web.pdf](http://tropy.lf1.cuni.cz/Data/files/TROPY/Prezentace_EN/ascaris-toxocara-enterobius-2010-web.pdf)
- 21) KREJSEK, Jan a Otakar KOPECKÝ. *Klinická imunologie*. [Hradec Králové]: Nucleus HK, 2004. ISBN 80-862-2550-X.
- 22) KUBÁČKOVÁ, Petra. PARAZITOLOGIE: OKM FN BRNO [online]. 2019 [cit. 2022-02-17]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/med/podzim2019/MBKM071p/um/19\\_Mgr\\_Parazitologie.pdf](https://is.muni.cz/el/med/podzim2019/MBKM071p/um/19_Mgr_Parazitologie.pdf)
- 23) MACPHERSON, Calum N.L. The epidemiology and public health importance of toxocarasis: A zoonosis of global importance. *International Journal for Parasitology* [online]. 2013, **43**(12-13), 999-1008 [cit. 2021-12-02]. ISSN 00207519. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpara.2013.07.004

- 24) MA, Guangxu, Ali ROSTAMI, Tao WANG, Andreas HOFMANN, Peter J. HOTEZ a Robin B. GASSER. Global and regional seroprevalence estimates for human toxocariasis: A call for action. *Toxocara and Toxocariasis* [online]. Elsevier, 2020, 2020, 275-290 [cit. 2021-12-02]. Advances in Parasitology. ISBN 9780128209585. Dostupné z: doi:10.1016/bs.apar.2020.01.011
- 25) MAZUR-MELEWSKA, Katarzyna, Anna MANIA, Wojciech SLUZEWSKI a Magdalena FIGLEROWICZ. Clinical pathology of larval toxocariasis. *Toxocara and Toxocariasis* [online]. Elsevier, 2020, 2020, 153-163 [cit. 2022-02-18]. Advances in Parasitology. ISBN 9780128209585. Dostupné z: doi:10.1016/bs.apar.2020.01.004
- 26) MURRAY, Patrick, Ken ROSENTHAL a Michael PFALLER. *Medical microbiology*. 7. vydání. Filadelfie: Elsevier/Saunders, 2013. ISBN 9780323086929.
- 27) NICOLETTI, Alessandra. Toxocariasis. *Neuroparasitology and Tropical Neurology* [online]. Elsevier, 2013, 2013, 217-228 [cit. 2021-12-01]. Handbook of Clinical Neurology. ISBN 9780444534903. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-53490-3.00016-9
- 28) ROSTAMI, Ali, Seyed Mohammad RIAHI, Celia V. HOLLAND, et al. Seroprevalence estimates for toxocariasis in people worldwide: A systematic review and meta-analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases* [online]. 2019, **13**(12) [cit. 2021-12-02]. ISSN 1935-2735. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pntd.0007809
- 29) SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2014. Sestra (Grada). ISBN 978-802-4747-712.
- 30) SKULINOVA, Katerina, Jan NOVAK, Martin KASNY a Libuse KOLAROVA. Seroprevalence of Larval Toxocarosis in the Czech Republic. *Acta Parasitologica* [online]. 2020, **65**(1), 68-76 [cit. 2022-04-16]. ISSN 1230-2821. Dostupné z: doi:10.2478/s11686-019-00121-0
- 31) UHLÍKOVÁ, Marcela a Jiří HÜBNER. *Larvální toxokaróza*. Praha 1: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, 1983, 176 s. ISBN 08-049-83.

- 32) VON DOHLEN, Alexa Rosypal, Alice E. HOUK-MILES, Anne M. ZAJAC a David S. LINDSAY. Flotation of *Toxocara canis* Eggs in Commercial Bleach and Effects of Bleach Treatment Times on Larval Development in These Eggs. *Journal of Parasitology* [online]. 2017, **103**(2), 183-186 [cit. 2022-02-04]. ISSN 0022-3395. Dostupné z: doi:10.1645/16-123
- 33) VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie II: přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii*. Brno: Masarykova univerzita, 2000. ISBN 80-210-2272-8.
- 34) VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-868-5000-5.
- 35) VOXOVÁ, B. a Z. ČERMÁKOVÁ. *Toxokaróza stále aktuální: Parazitologické dny*. Stará Lesná, Slovenská republika, 2014.
- 36) WELLER, Peter a Karin LEDER. Up to date. *Toxocariasis: Visceral and ocular larva migrans* [online]. 2020 [cit. 2021-12-02]. Dostupné z: [https://www-uptodate-com.ezproxy.is.cuni.cz/contents/toxocariasis-visceral-and-ocular-larva-migrans?search=toxocara%20canis&source=search\\_result&selectedTitle=1~40&usage\\_type=default&d](https://www-uptodate-com.ezproxy.is.cuni.cz/contents/toxocariasis-visceral-and-ocular-larva-migrans?search=toxocara%20canis&source=search_result&selectedTitle=1~40&usage_type=default&d)