

Polymerázová řetězová reakce (PCR) pro detekci *Toxoplasma gondii*

Tomková J.¹, Novotný D.¹, Bednaříková J.¹, Rusiňáková Z.², Bartková M.¹, Schmiedová L.¹, Spurná S.¹

¹Oddělení klinické biochemie, Úsek molekulární biologie, Fakultní nemocnice Olomouc

²Hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc

SOUHRN

Cíl práce: Shrnout dosavadní výsledky získané v diagnostice toxoplazmózy pomocí metody polymerázová řetězová reakce na našem pracovišti.

Materiál a metody: Byl vyšetřován různý biologický materiál od pacientů. K izolaci DNA byly použity dva komerční kity: QIAamp DNA Mini kit a QIAamp DNA Blood Mini kit (QIAGEN, Německo). Pro amplifikaci byla vybrána oblast genu TGR1E. Konvenční polymerázová řetězová reakce byla prováděna na přístroji Peltier Thermal Cycler.

Výsledky: V období od roku 2005 do března 2008 bylo vyšetřeno celkem 337 biologických vzorků od 222 pacientů. DNA *Toxoplasma gondii* byla detekována u pěti pacientů.

Závěr: Polymerázová řetězová reakce je důležitou metodou pro stanovení diagnózy toxoplazmózy u rizikových skupin pacientů (gravidní ženy a imunodeficitní pacienti).

Klíčová slova: toxoplazmóza, *Toxoplasma gondii*, polymerázová řetězová reakce.

SUMMARY

Tomková J., Novotný D., Bednaříková J., Rusiňáková Z., Bartková M., Schmiedová L., Spurná S.: Polymerase Chain Reaction (PCR) for detection of *Toxoplasma gondii*

Objective: The aim of the work was to summarize results obtained in the diagnostics of toxoplasmosis by a method of polymerase chain reaction in our workplace.

Material and methods: Various biological materials were examined. DNA was isolated by QIAamp DNA Mini kit and QIAamp DNA Blood Mini kit. For amplification TGR1E was selected and conventional polymerase chain reaction was performed on Peltier Thermal Cycler instrument.

Results: 337 biological samples from 222 patients were examined from 2005 to March 2008. *Toxoplasma gondii* DNA was detected in five patients.

Conclusion: Polymerase chain reaction is important method for the diagnosis of toxoplasmosis in the risk group of the patients (pregnant women and immunodeficiency patients).

Key words: toxoplasmosis, *Toxoplasma gondii*, polymerase chain reaction.

Úvod

Toxoplazmóza je infekční onemocnění způsobené prvokem *Toxoplasma gondii* a postihuje asi jednu třetinu světové populace. V životním cyklu tohoto parazita se střídají tři stadia: sporozoity, tachyzoity a bradyzoity [1]. V České republice se séropozitivita (přítomnost protilátek v krvi) vyskytuje u 34,1 % žen a 26,3 % mužů. U HIV+ osob je výskyt toxoplazmózy v ČR vyšší než u ostatní populace – u žen je prevalence 42,7% a u mužů 42,8% [2].

U pacientů s oslabenou imunitou (pacienti s AIDS nebo pacienti po imunosupresivní či cytostatické terapii) se většinou jedná o reaktivaci onemocnění, kdy se bradyzoity v tkáňových cystách mění zpět na rychle se množící tachyzoity. U těchto rizikových skupin reaktivace infekce postihuje hlavně CNS, což vede k toxoplazmové encefalitidě (TE). Včasná zahájení léčby je důležité, protože neléčená mozková toxoplazmóza končí vždy smrtí a správná diagnóza je většinou určena až *post mortem* [3].

Další rizikovou skupinou jsou gravidní ženy, kdy infekce není nebezpečná pro ně samotné, ale pro plod. K poškození plodu může dojít v kterémkoliv stadiu vývoje. Rozsah poškození plodu je závislý

na délce gravidity. V prvním trimestru těhotenství je riziko přenosu infekce malé, ale pokud k přenosu dojde, je postižení plodu nejtěžší a často těhotenství končí abortem.

Toxoplazmóza je obvykle diagnostikována na základě stanovení protilátek [4]. Výjimku tvoří imunodeficitní pacienti, u kterých se využívá PCR. Existují různé sérologické testy na stanovení jednotlivých protilátek, které jsou schopny zachytit vzestup nebo pokles daných protilátek v závislosti na časovém odstupu po infekci.

Pro diagnózu toxoplazmózy bylo vyvinuto i několik PCR technik: konvenční PCR, nested PCR nebo real-time PCR pro různý klinický materiál – krev, plováková voda, cerebrospinalní tekutina, biopsie tkání [5], bronchoalveolární výplach a komorová voda [6]. Mezi výhody PCR patří rychlost, citlivost (5–10 kopií/ml), specifita, přímý průkaz a jednoznačný výsledek buď pozitivní, nebo negativní. Mezi nevýhody PCR by se dala zařadit rozdílná citlivost, u které záleží na typu odebraného materiálu. Pokud je biologickým materiálem likvor, je citlivost PCR metody nízká. Vzhledem ke skutečnosti, že *Toxoplasma gondii* je intracelulární parazit a nachází se v likvoru jen velmi vzácně. Další nevýhodou jsou falešně negativní výsledky po nasazení ATB (antibiotikové) terapie.

Materiál a metody

K průkazu DNA *Toxoplasma gondii* byly vyšetřovány následující typy biologického materiálu: plazma, likvor, plodová voda, bronchoalveolární laváž (BAL) a nesrážlivá krev. Nesrážlivá krev byla odebírána do zkumavky Greiner. Jednalo se o fialovou zkumavku pro hematologii s přísadkou etylendiamintetraoctové kyseliny. U dospělého člověka se odebíralo minimálně 5 ml krve a u dětí 3 ml. Likvor byl odebírán do sterilní odběrové zkumavky pro likvor, a to v množství minimálně 0,5 ml. Plodová voda byla odebírána do injekční stříkačky v množství minimálně 2 ml. BAL byla odebírána do sterilní odběrové zkumavky bez úpravy nebo do injekční stříkačky, a to v množství minimálně 0,5 ml. Odebraný biologický materiál byl do jedné hodiny transportován při teplotě 2–8 °C na naše pracoviště. Výjimkou byla nesrážlivá krev, kdy teplota pro transport mohla být až 25 °C. Biologický materiál byl uchováván při -20 °C. Biologický materiál pocházel především od pacientů z Hemato-onkologické kliniky a od pacientek z Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny Fakultní nemocnice Olomouc.

Suspenzi tachyzoitů v myším exsudátu nám poskytl Státní zdravotní ústav Praha, Referenční laboratoř pro toxoplazmózu. Suspenze tachyzoitů byla třikrát promyta pomocí fyziologického roztoku fosfátového pufru. Po posledním promytí byl k sedimentu přidán fyziologický roztok. Promyté tachyzoity byly skladovány při -20 °C, v případě dlouhodobého uchování při -70 °C.

Nesrážlivá krev a plazma nevyžadovaly žádnou speciální přípravu před vlastní izolací DNA. V případě likvoru, plodové vody a BAL bylo nutné před vlastní izolací vzorek centrifugovat (5 minut při 3000 g) a sediment byl použit k izolaci DNA.

Izolace DNA (pro všechny vyšetřované materiály kromě nesrážlivé krve) byla provedena podle instrukcí výrobce pomocí QIAamp DNA Mini kitu (QIAGEN, Německo). Izolace z nesrážlivé krve byla provedena pomocí QIAamp DNA Blood Mini kitu.

Jako metoda volby byla použita jedнокroková kvalitativní PCR v konvenčním formátu adaptovaná podle literatury [7], která byla verifikována pomocí suspenze tachyzoitů získaných z referenční laboratoře.

Amplifikace izolované DNA byla prováděna z jedné oblasti genomu *T. gondii*. Jednalo se o oblast genu TGR1E, který se v genomu *T. gondii* opakuje 35krát, s následujícími primery T1: 5'-ATG GTC CGG CCG GTG TAT GAT ATG CGA T-3' a T2: 5'-TCC CTA CGT GGT GCC GCA TTG CCT-3' (Generi Biotech, Česká republika).

Kontrola izolace a inhibice PCR reakce byla prováděna pomocí koamplifikace části lidského genu pro beta-globin s primery IC291: 5'-ACA GAA CTG TGT TCA CTA GC-3' a IC292: 5'-CAT CAG TGG ACA GAT CC-3' (Generi Biotech, Česká republika).

Celkový objem pro jednu PCR byl 25 µl, z toho 5 µl izolované DNA. Pro PCR reakce byl použit LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes kit (Roche, Německo), který obsahoval LightCycler FastStart Enzyme, LightCycler FastStart Reaction Mix,

25 mmol/l roztok MgCl₂ a sterilní vodu. Koncentrace všech použitých primerů byla 10 pmol/µl. K reakční směsi byl přidáván i enzym uracyl-N-glukosyláza (UNG) k zabránění kontaminace vzorku. Každý vzorek byl analyzován v dubletu a každá série obsahovala pozitivní a negativní kontrolu. Negativní kontrola byl vzorek neobsahující DNA *Toxoplasma gondii*. Jako pozitivní kontrola byly použity zředěné tachyzoity.

Konvenční PCR byla prováděna na přístroji Peltier Thermal Cycler (PTC 200, Biotech, Česká republika) za následujících podmínek: inkubace s UNG 20 °C 10 min, úvodní denaturace 94 °C 3 min, denaturace 94 °C 30 s, annealing 60 °C 30 s, extenze 72 °C 30 s, 40 cyklů, závěrečná extenze 72 °C 7 min. Výsledkem PCR reakce byl produkt o velikosti 191 bp. Produkty byly detekovány pomocí gelové elektroforézy (2% agarózový gel) po obarvení ethidiumbromidem pod UV lampou (obr. 1).

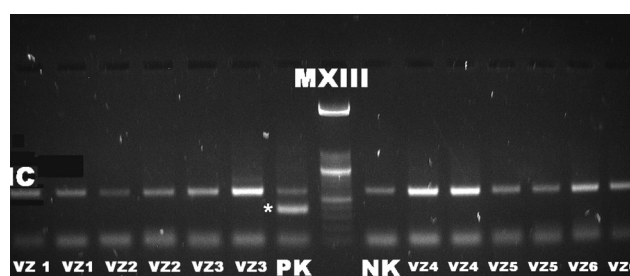


Fig. 1. Amplified products analyzed by electrophoresis in 2 % agarose gel

MXIII – weight marker, IC – internal control, * – 191 bp amplification fragment with T1/T2 primers, PK – positive control, Nk – negative control and vz1–vz6 are patient negative samples.

Výsledky a diskuse

Při verifikaci metody bylo opakovaně dosaženo meze detekce 10 tachyzoitů na mililitr biologického materiálu (měřeno pomocí vzorků plazmy). PCR metoda prochází pravidelně a úspěšně mezilaboratorním porovnáním – externím hodnocením kvality, a to účastí v cyklu PARASITOLOGY (MALARIA): toxoplasmgenom (M.11) (INSTAND e. V., Německo).

Souběžně s konvenční PCR metodou byla vyvíjena i real-time PCR metoda. Z tohoto důvodu byl u obou metod použit LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes kit, aby se zabránilo případné kontaminaci vzorku. Real-time PCR nám poskytovala falešně pozitivní výsledky, a proto se od této metody upustilo.

V období od roku 2005 do března 2008 bylo celkem vyšetřeno 337 biologických vzorků od 222 pacientů, mezi nimiž bylo 309 vzorků plazmy, 20 vzorků likvoru, 5 vzorků plodové vody, 2 vzorky BAL a 1 vzorek nesrážlivé krve. 254 vzorků pocházelo z Hemato-onkologické kliniky, 81 vzorků z Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny Fakultní nemocnice Olomouc a 2 vzorky z jiných oddělení nemocnice. Nejčastějším vyšetřovaným vstupním materiálem byla plazma, která nám poskytla dostatečnou citlivost pro záchyt tachyzoitů, a to i přesto, že citlivějším vstupním materiálem

pro izolaci DNA *Toxoplasma gondii* je nesrážlivá krev nebo leukocyty.

Za výše uvedené období jsme zjistili pozitivitu u pěti pacientů. U dvou pacientů se jednalo o pozitivní likvor a plazmu a u dalších tří pacientů byly pozitivní vzorky plazmy. Ostatní vyšetřované biologické materiály byly negativní.

Všichni pozitivní pacienti byli léčeni na Hemato-onkologické klinice. U těchto pacientů byla diagnóza toxoplazmózy stanovena na základě klinického obrazu, CT (počítačová tomografie) nebo MR (magnetická rezonance) nálezu a PCR positivity. Při léčbě toxoplazmózy neexistuje standardní postup. První pacient byl po alogenní příbuzenské transplantaci a po 195 dnech po ní zemřel na následky toxoplazmové encefalidity. U druhé pacientky byla diagnostikována Hodgkinova choroba, několik let poté byla provedena alogenní příbuzenská transplantace. V potransplantačním období byly na MR mozku objeveny drobné léze v oblasti levé postranní komory a DNA *Toxoplasma gondii* byla zachycena v likvoru a v plazmě. Na základě těchto vyšetření byla diagnostikována neurotoxoplazmóza. Třetí pacientka byla po alogenní nepříbuzenské transplantaci. Kvůli neurologickým potížím byl vyšetřen vzorek plazmy a likvoru pomocí metody PCR, kde byla zachycena DNA *Toxoplasma gondii* v obou vzorcích. MR mozku byla bez patologických změn. U pacientky byla zahájena kombinovaná terapie daraprimem a dalacinem. Postupně došlo k vymizení neurologických obtíží, nicméně kvůli opakovaným transplantacím a lymfopenii v meziobdobí se v imunopresivní léčbě pokračovalo dále. U čtvrtého pacienta byla na základě pozitivního nálezu DNA *Toxoplasma gondii* v plazmě, cytologii a neurologického nálezu diagnostikována toxoplazmová meningoencefalitida a pneumonie. Jelikož pozitivita pátého pacienta byla zjištěna v nedávné době, nemáme u něj kazuistiku k dispozici.

Profylaktické podávání biseptolu všem pacientům po transplantaci snižuje riziko vzniku infekce. Pacientům s toxoplazmózou ve Fakultní nemocnici Olomouc je podávána kombinace léků daraprim (účinná složka je pyrimetamin) a dalacin (účinná složka je klindamycin). V zahraničí se místo dalacinu používá sulfadiazin. V České republice není tento lék registrovaný, proto nemůže být pacientům ordinován. V případě vysokých dávek daraprimu se musí navíc podávat leukovorin pro zmírnění myelotoxicity tohoto léku. Dalším lékem je biseptol, který je podáván minimálně po dobu trvání lymfopenie.

Závěr

Výše uvedená metoda byla dostatečně citlivá pro všechny vyšetřované biologické materiály. Tato metoda je důležitá při stanovení diagnózy toxoplazmózy u rizikových skupin pacientů, jako jsou gravidní ženy a imunodeficitní pacienti. U gravidních žen by měla být vyšetřováním materiálem nejen plodová voda, ale i krev matky, aby se zjistilo, zda je ještě riziko přestupu tachyzoitů do prostředí plodu.

Literatura

1. **Provazník, K., Komárek, L., Kříž, B.** *Manuál prevence v lékařské praxi : IV. Základy prevence infekčních onemocnění.* Praha : SZU, 1996, 126 s. ISBN 80-7168-400-7.
2. **Machala, L., Kodym, P., Rozsypal, H., Staňková, M., Sedláček, D.** Doporučený postup diagnostiky a terapie toxoplazmózy u osob s HIV infekcí. *Klin. Mikrobiol. Inf. Lék.*, 2007, 13, 6, s. 248–252.
3. **Edvinsson, B., Lappalainen, M., Evengird, B.** Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2006, 12, 2, p. 131–136.
4. **Jones, J., Polez, A., Wilson, M.** Congenital toxoplasmosis. *Am. Fam. Physician.*, 2003, 67, 10, p. 2131–2138.
5. **Edvinsson, B., Lappalainen, M., Evengird, B.** Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2006, 12, 2, p. 131–136. (stejně jako odkaz č. 3!)
6. **Cassaing, S., Bessières, M. H., Berry, A., Berrebi, A., Fabre, R., Magnaval, J. F.** Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, 44, 11, p. 720–724.
7. **Čermáková, Z., Ryšková, O., Plíšková, L.** Polymerase Chain Reaction for Detection of *Toxoplasma gondii* in Human Biological Samples. *Folia Microbiol.*, 2005, 50, 4, p. 341–344.

Do redakce došlo 13. 5. 2008.

Adresa pro korespondenci:
Mgr. Jana Tomková
Fakultní nemocnice Olomouc
Oddělení klinické biochemie
Úsek molekulární biologie
I. P. Pavlova 6
775 20 Olomouc
e-mail:janatomkova@centrum.cz