Srovnání citlivosti kvantitativní PCR repetitivních oblastí AF146527 a B1 pro detekci *Toxoplasma gondii*

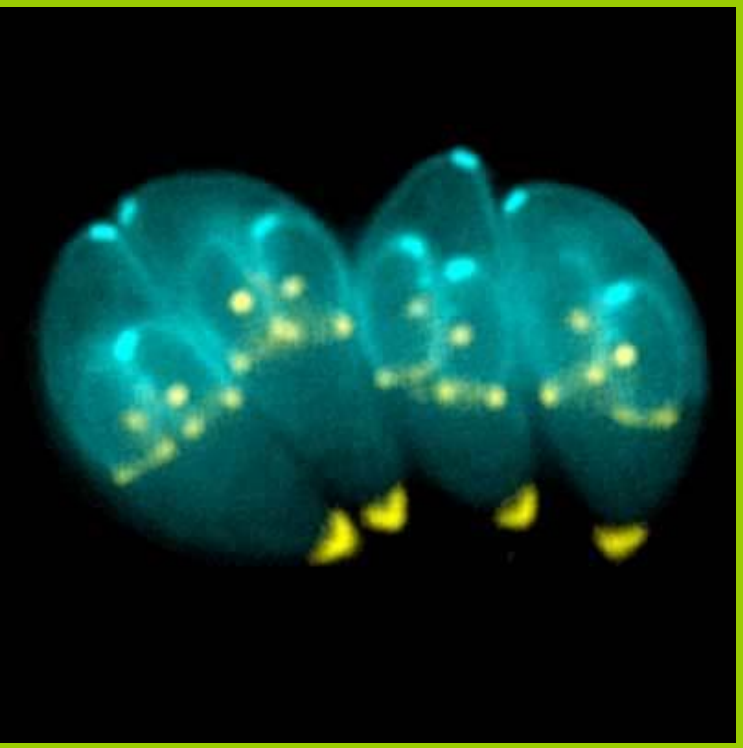
M. Bartková, E. Kriegová,
D. Novotný, M. Petřek, P. Schneiderová

Oddělení klinické biochemie a imunogenetiky FN Olomouc

Co je toxoplazmóza?

- Infekce parazitem ***Toxoplasma gondii***

T. gondii - parazitický prvok, vícehostitelská kokcidie, která parazituje v buňkách člověka i zvířat.



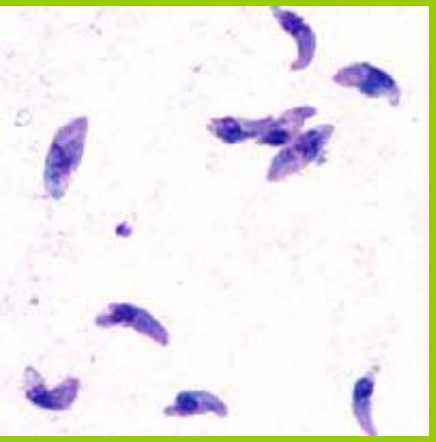
<u>Výskyt:</u>

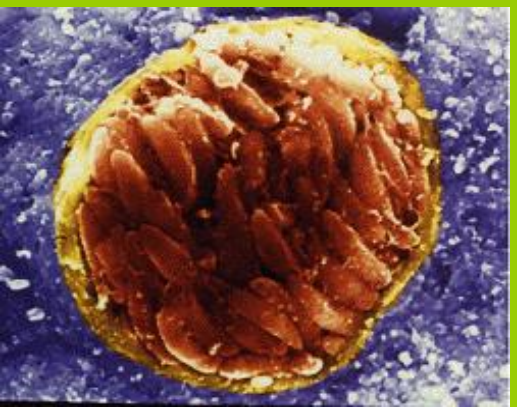
- latentní forma postihuje 1/3 světové populace
- Česká republika – ročně 400-800 případů akutní toxoplazmózy
- vrozená toxoplazmóza u 0,1% všech novorozenců

Machala, Kodym 2005

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Toxoplasma_gondii.jpg

Životní cyklus *T. gondii*





- **Definitivní hostitel -** kočka se infikuje masem (bradyzoity, oocysty)
  Sexuální rozmnožování - střevní buňky – ukončení vznikem **oocyst** – vyloučení trusem – sporulace - kontaminace zevního prostředí

- **Mezihostitel** - teplokrevný živočich – nejčastěji alimentární nákaza -
  tachyzoit (řec. *tachos* – rychlost): intracelulárně množící se forma v nervové a svalové tkáni (akutní fáze infekce)
  bradyzoit (řec. *brady* – pomalý): aktivace imunitního systému-vznik tkáňové cysty (latentní fáze infekce, s možností reaktivace)

Klinický obraz onemocnění

Získaná toxoplazmóza

- Imunokompetentní jedinci – asymptomatický průběh, mírné příznaky (uzlinová forma,chřipkové stavy), sérokonverze, latentní fáze

Vrozená toxoplazmóza

- Transplacentární infekce - tkáňové nekrózy, encefalitida, kalcifikace, hydrocefalus, chorioretinitida (Sabinova triáda)

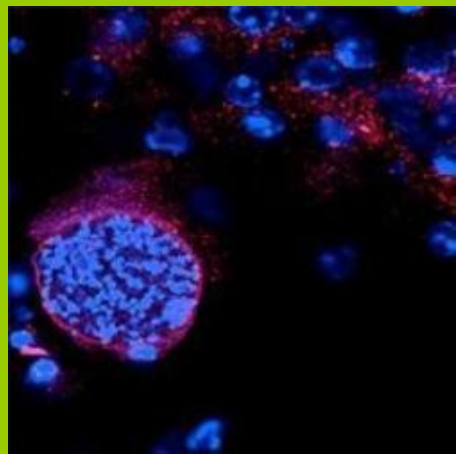
Reaktivace latentní toxoplazmózy

- imunosuprese, cytostatická terapie, HIV
- ruptura tkáňových cyst – zmnožení tachyzoitů

Toxoplazmová encefalitida

Oční forma

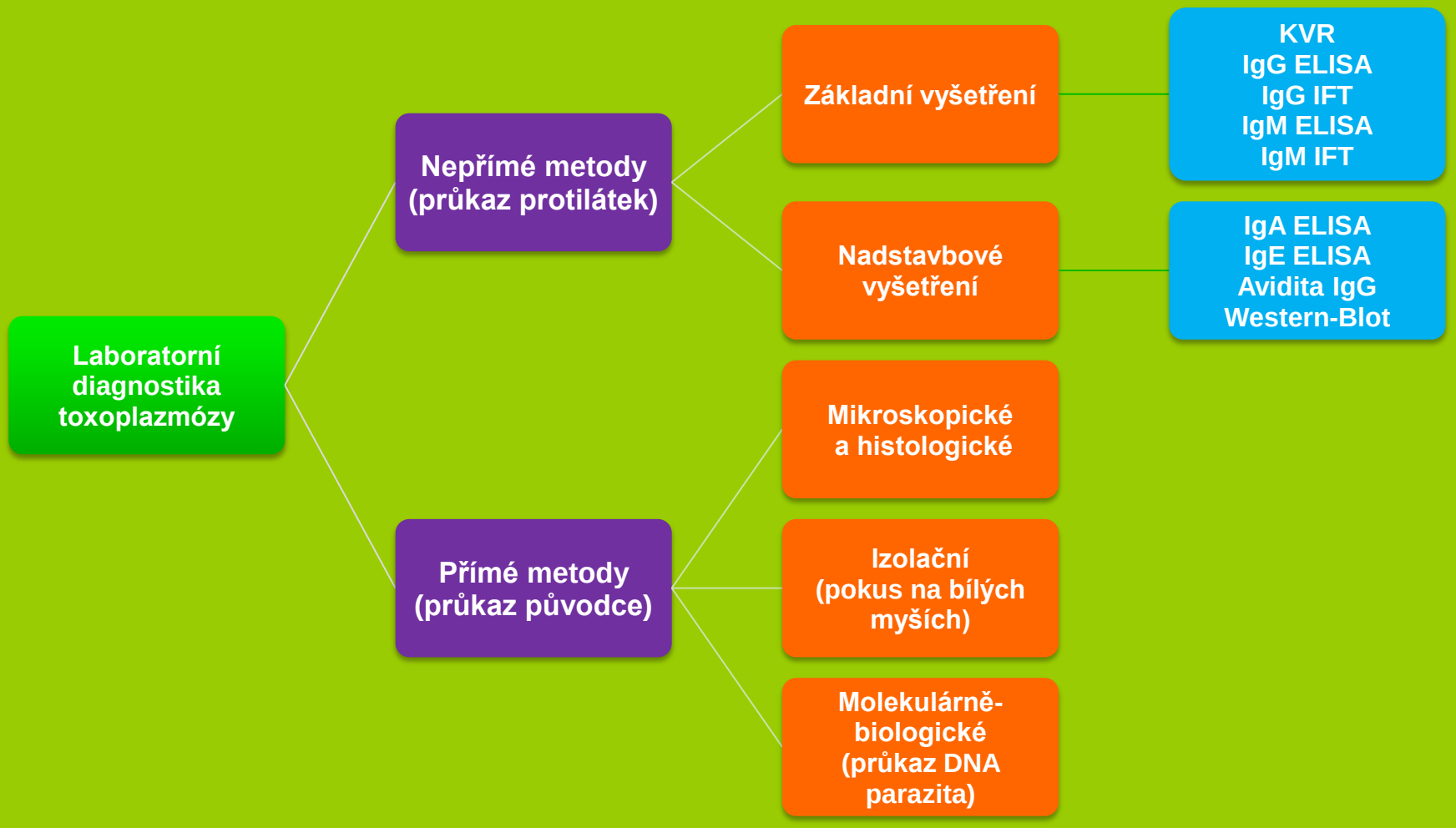
- pozdní manifestace kongenitální toxoplazmózyi získané formy



Rizikové skupiny

- **GRAVIDNÍ ŽENY A JEJICH PLOD** – primoinfekce - transplacentární přenos
- Riziko poškození plodu závislé na gestačním věku :
- 1 trimestr - riziko infekce 4-15% - nejzávažnější poškození plodu
- 2 trimestr - riziko infekce 30% - postižení těžší až lehké
- 3 trimestr – riziko infekce 60% - asymptomatický průběh, v dětském věku –oční forma, hluchota, strabizmus, psychomotorická retardace
- **NOVOROZENCI**
- **IMUNOKOMPROMINOVANÍ PACIENTI**
- **OSOBY S IMUNODEFICIENCÍ**

Laboratorní diagnostika toxoplazmózy



Nepřímý průkaz toxoplazmózy - sérologický profil

- **Toxoplazmové protilátky** KFR - vysoká citlivost, nízka specifita
- **IgG protilátky**
  přetrvávají celý život (paměťové protilátky)
  tvoří se 1-2 týdny po nakažení, peak 3-6 měsícu po nakažení
- **IgM protilátky**
  perzistují 12-18 měsíců po akutní fázi
- **IgE protilátky**
  tvoří se 1-2 týdny po nakažení, perzistují 4-6 měsíců po akutní fázi,
- **IgA protilátky**
  perzistují 6-9 měsíců po akutní fázi,
- **Avidita IgG**
  Nízka avidita přetrvává maximálně 4 měsíce po akut. infekci

Kodym a Machala, 2007

Přímý průkaz toxoplazmózy – PCR detekce DNA *T. gondii*

- Detekce aktivní infekce (tachyzoitů) v krvi
- Metody volby u imunokompromitovaných jedinců (transplantace, cytostatická léčba, HIV), transplacentární přenos (primoinfekce matky)
- Jednoduchá proveditelnost, rychlost, vysoká citlivost a specificita Negativní nález nevylučuje aktivní infekci!
- Důležitost dodržení preanalytických podmínek, zabránění falešné pozitivity (dekontaminace, prostorové oddělení jednotlivých kroků, UNG, IC, EK), důležitost izolace
- Standardizace PCR protokolu, mezilaboratorní kontroly

Sekvence nejčastěji používané k PCR detekci *T. gondii*

- **B1** - v genomu se opakuje asi 35x
- **SAGI (P30)** - kóduje povrchový antigen, v genomu se vyskytuje 1x
- **18-S rDNA** - oblast ribozomální podjednotky, opakuje se 110x
- **TGR1E** - opakuje se asi 35x
- **AF 145627(529 bp)** - vyskytuje se v 200 až 300 kopiích

Cíl

- Zavedení kvantitativní PCR pro rutinní detekci *T. gondii* v krevní plazmě s TaqMan sondami
- repetitivní oblasti **AF146527 (529bp)** a **B1** na přístroji LightCycler (Roche)

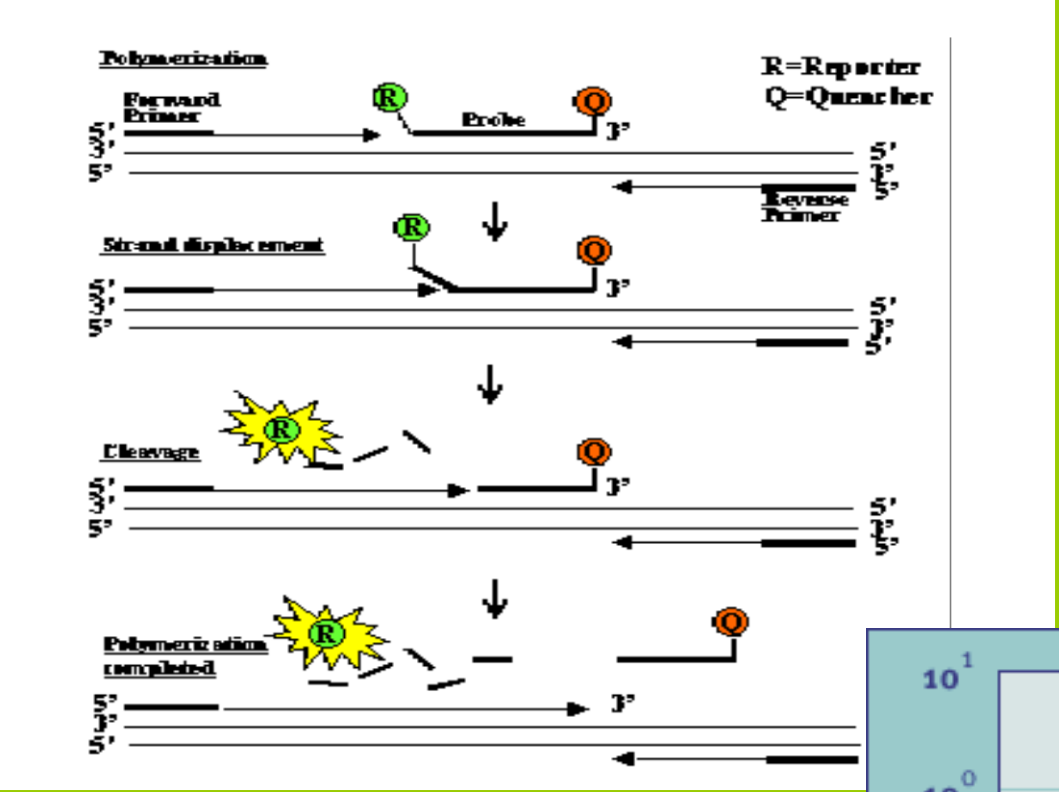
- Zavedení TaqMan detekce pro beta-globin jako interní kontroly

- Ověřit izolační techniku vhodnou pro *T. gondii* DNA

- Stanovit detekční limit na základě ředící řady izolovaných tachyzoitů

Wahab a Edvinssom 2010

Princip PCR detekce s TaqMan sondami



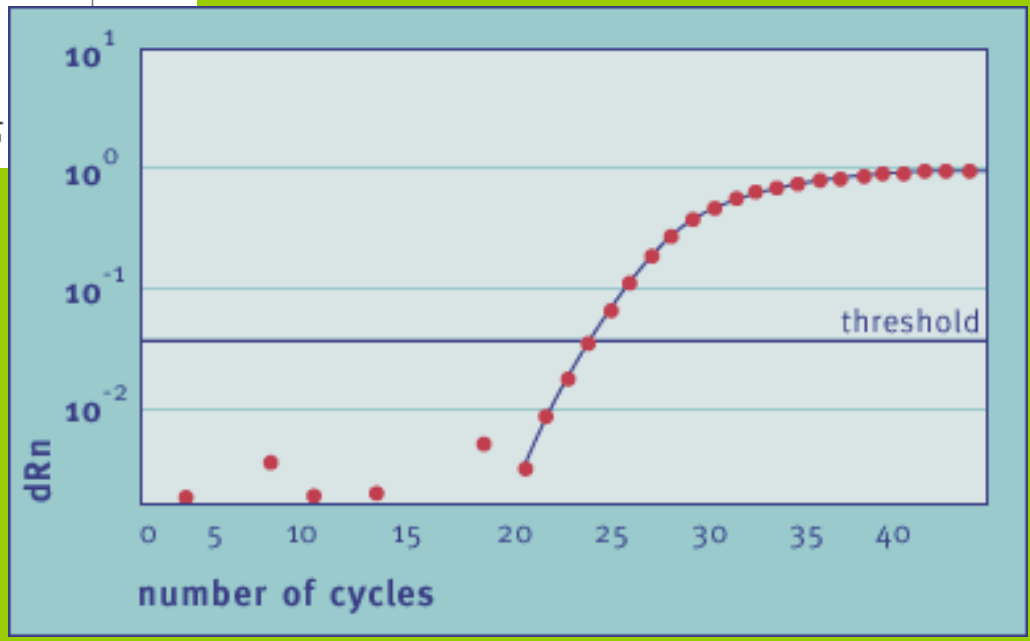
- Hydrolyzační technika

Taq DNA polymeráza

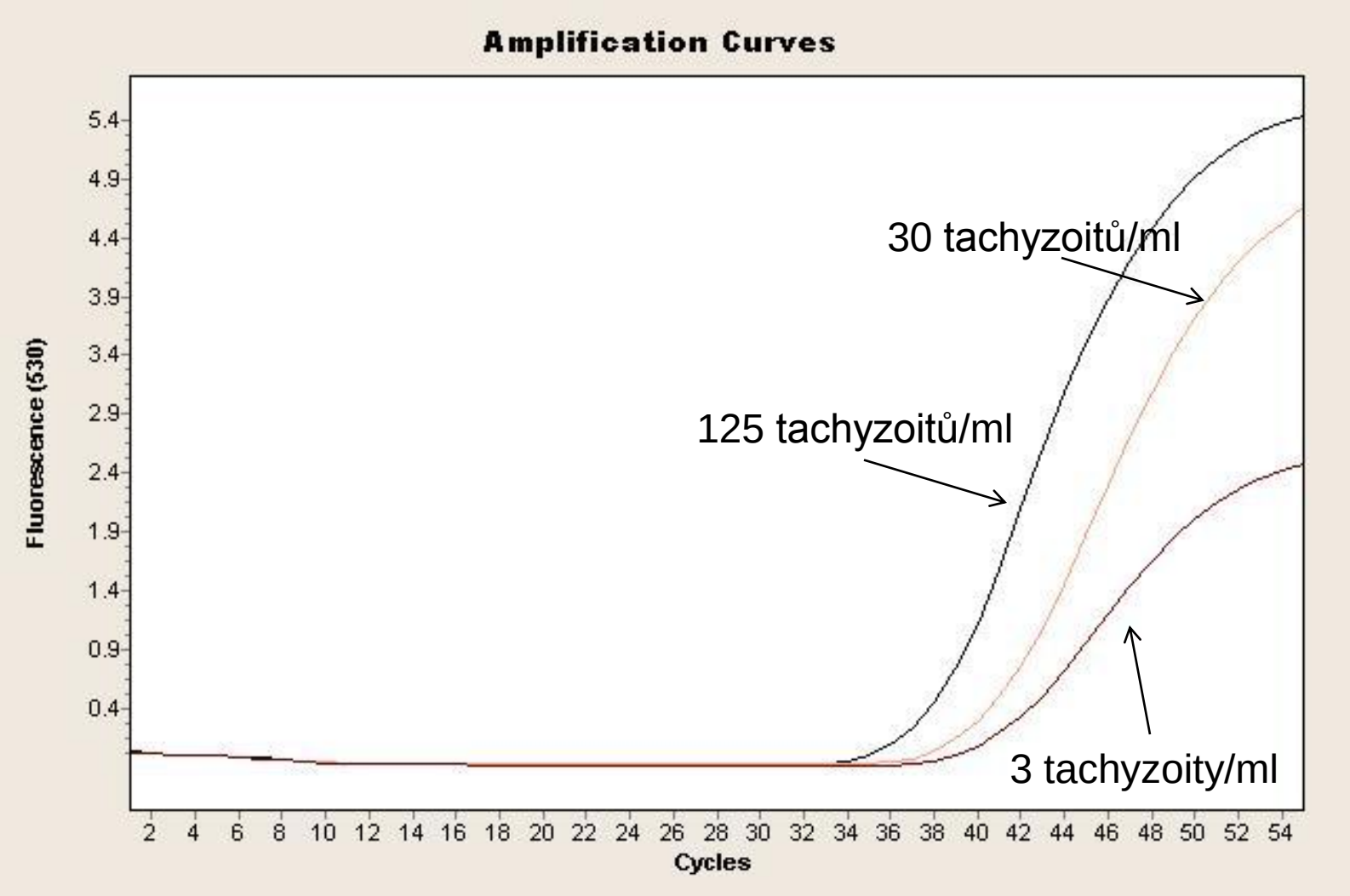
Primery, sonda označená 2 fluorofory (R excitační energií , Q pohlcující energii, tzv. „quencher)

- Značky v bezprostřední blízkosti – Q pohltí emitované světlo
- Po odštěpení R-Q - fluorescence

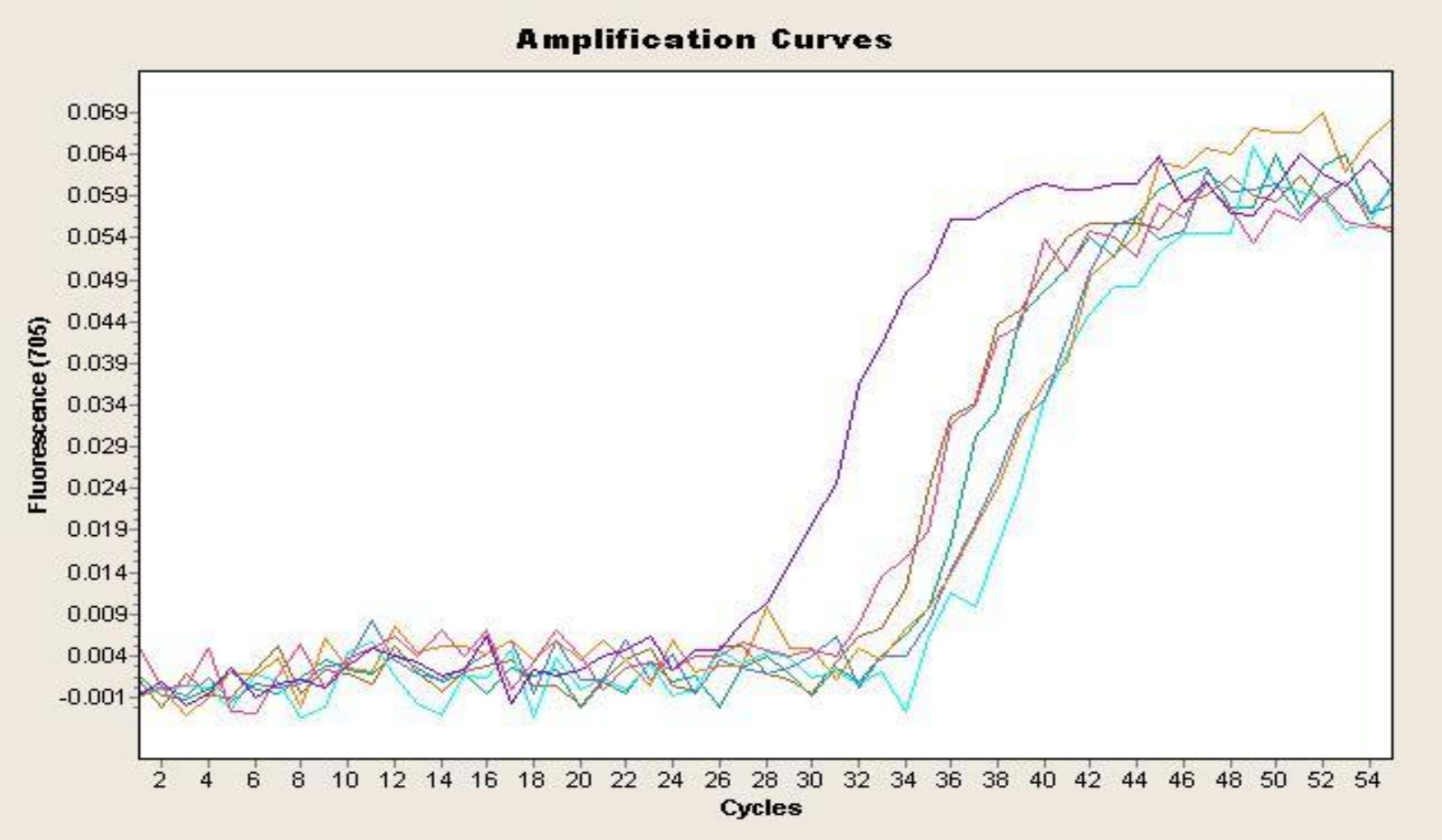
Měření množství PCR produktu vzniklého během exponenciální fáze amplifikace



PCR detekce repetitivní oblasti AF146527 (529 bp) – Lightcycler (Roche)

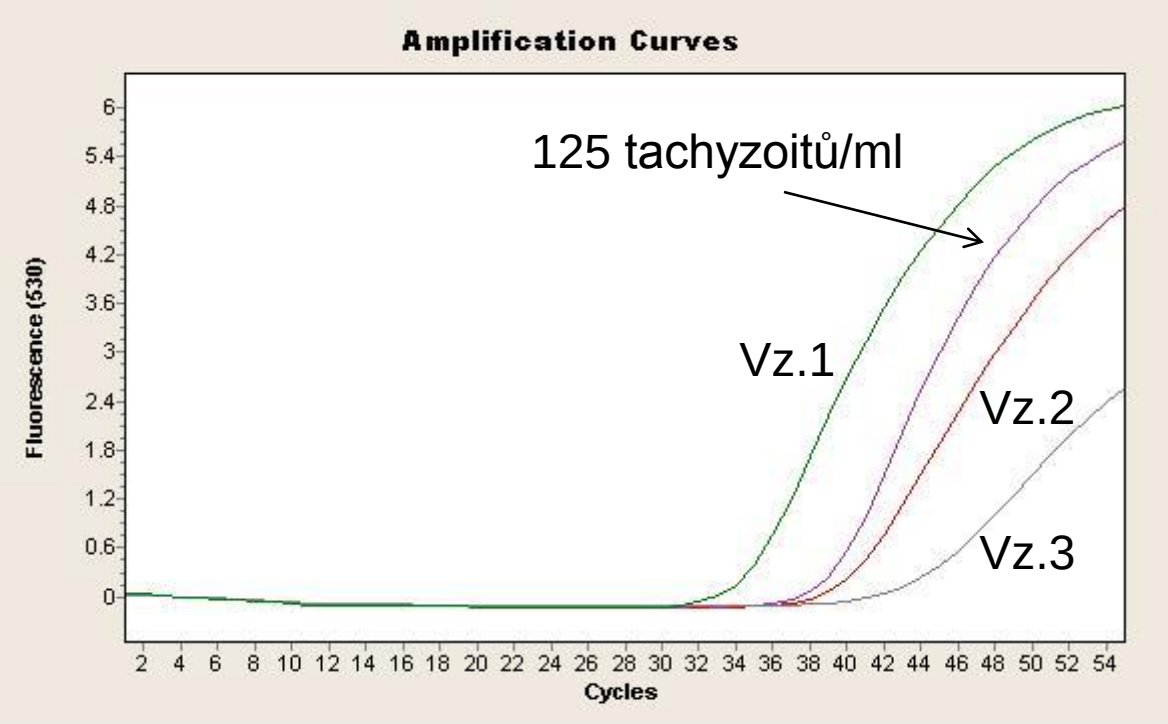


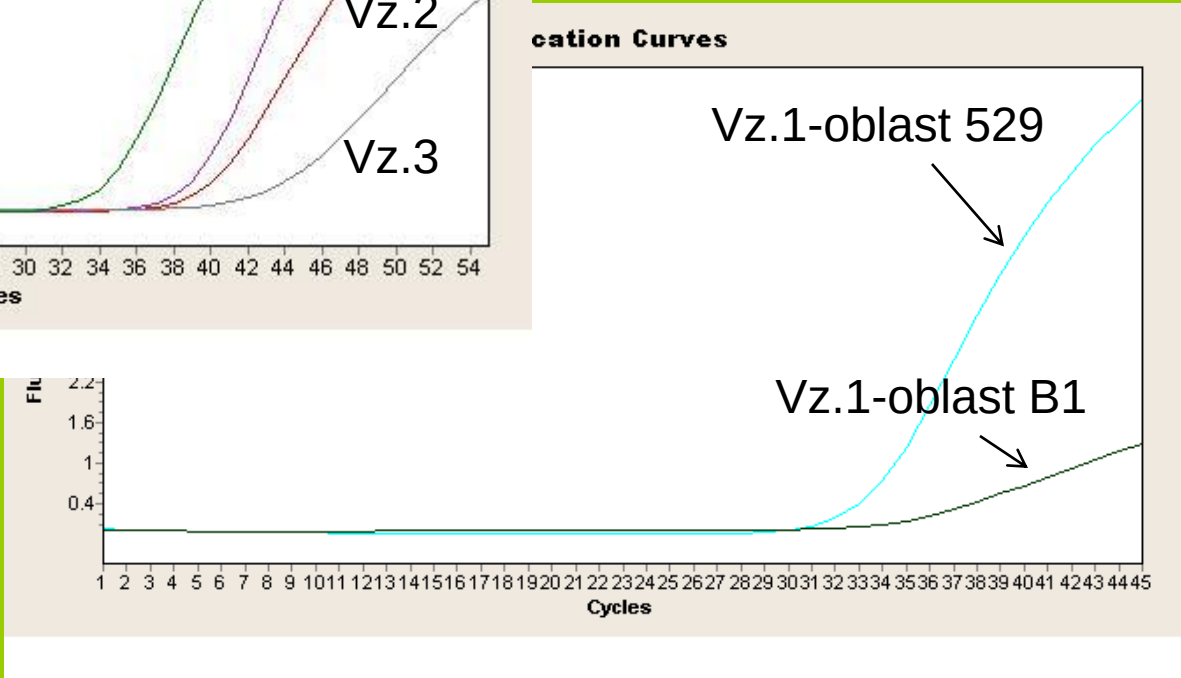
PCR detekce beta-globinového genu – Lightcycler (Roche)



Interní kontrola (IC) pro plazmu, plodovou vodu a likvor (kontrola izolace a inhibice PCR)

PCR detekce *T. gondii* u vzorků INSTAND – oblast AF146527 a B1





Výsledky a závěr

- Detekce repetitivní oblasti **AF146527** (529 bp), která se vyskytuje v genomu 200-300krát, byla citlivější ve srovnání s 35-repeticí **B1**.
- Detekční limit 3 tachyzoity/ml
- Ukazuje se důležitost volby správného izolačního postupu pro rutinní diagnostiku *T. gondii DNA* z plazmy.

Kvantitativní PCR repetitivní oblasti AF146527 je pro svou citlivost vhodná pro rutinní diagnostiku toxoplazmózy.

Děkuji za pozornost