

ZPRACOVÁNÍ KLINICKÝCH DAT ANEB STATISTIKA V PRAXI



Doc. MVDr. Eva Bártová, Ph.D.
bartovae@vfu.cz

Parazitární onemocnění

TOXOPLAZMÓZA

NEOSPORÓZA

ENCEFALITOOZONÓZA



Toxoplazmóza - zoonóza

Kolik lidí se s infekcí setkalo?

Zdroje infekce pro člověka?

Diagnostika?

Prevence?

Lidi

- 75% bez příznaků
- 25% klinické příznaky - rizikové skupiny



Toxoplazmóza - zoonóza

- uzlinová forma
- oční forma
- vrozená toxoplazmóza
- mozková, plicní, srdeční, svalová

MUDr. Markéta Geleneky,
Klinika infekčních nemocí
3.LFUK a Nemocnice Na
Bulovce, Praha

www.toxoplasmoza.cz

www.tehotenstvi-infekce.cz



Toxoplasma gondii - historie

Systematické zařazení ([Volf et al., 2007](#)):

Doména: Eukaryota

Říše: Chromalveolata

Skupina: Alveolata

Kmen: Apicomplexa (Výtrusovci)

Třída: Coccidea (Kokcidie)

Řád: Eimeriida

Čeleď: Toxoplasmatidae

Rod: *Toxoplasma*

Druh: *Toxoplasma gondii*



Gundi saharský (*Ctenodactylus gundii*)
([Nicolle a Manceaux, 1908](#))

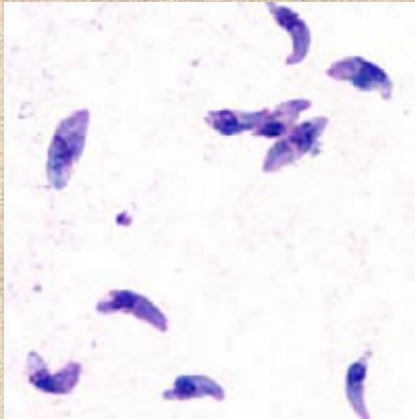


Gundi - severoafrický (Maroko, severní Alžírsko, Tunisko a Libye) hlodavec velikosti morčete, žije v koloniích.

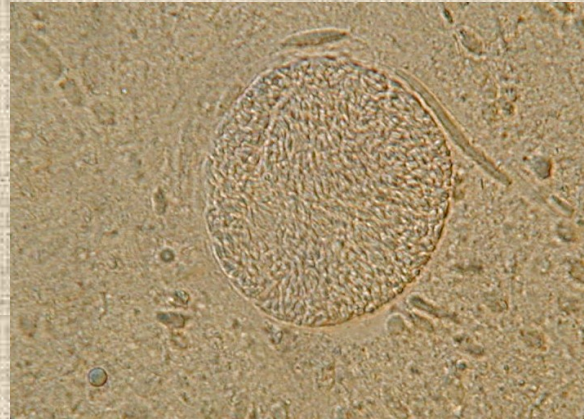
ČR - koncem roku 2008 import 10 kusů, první odchov v ČR v Zoo Praha v září 2009.

Toxoplasma gondii - infekční stádia

Definitivní hostitel?
Mezihostitelé?
Infekční stádia?



Tachyzoiti (endozoiti, trofozoiti)
2 x 6 μm , dělí se uvnitř jaderných
buněk endodygonií
akutní fáze infekce

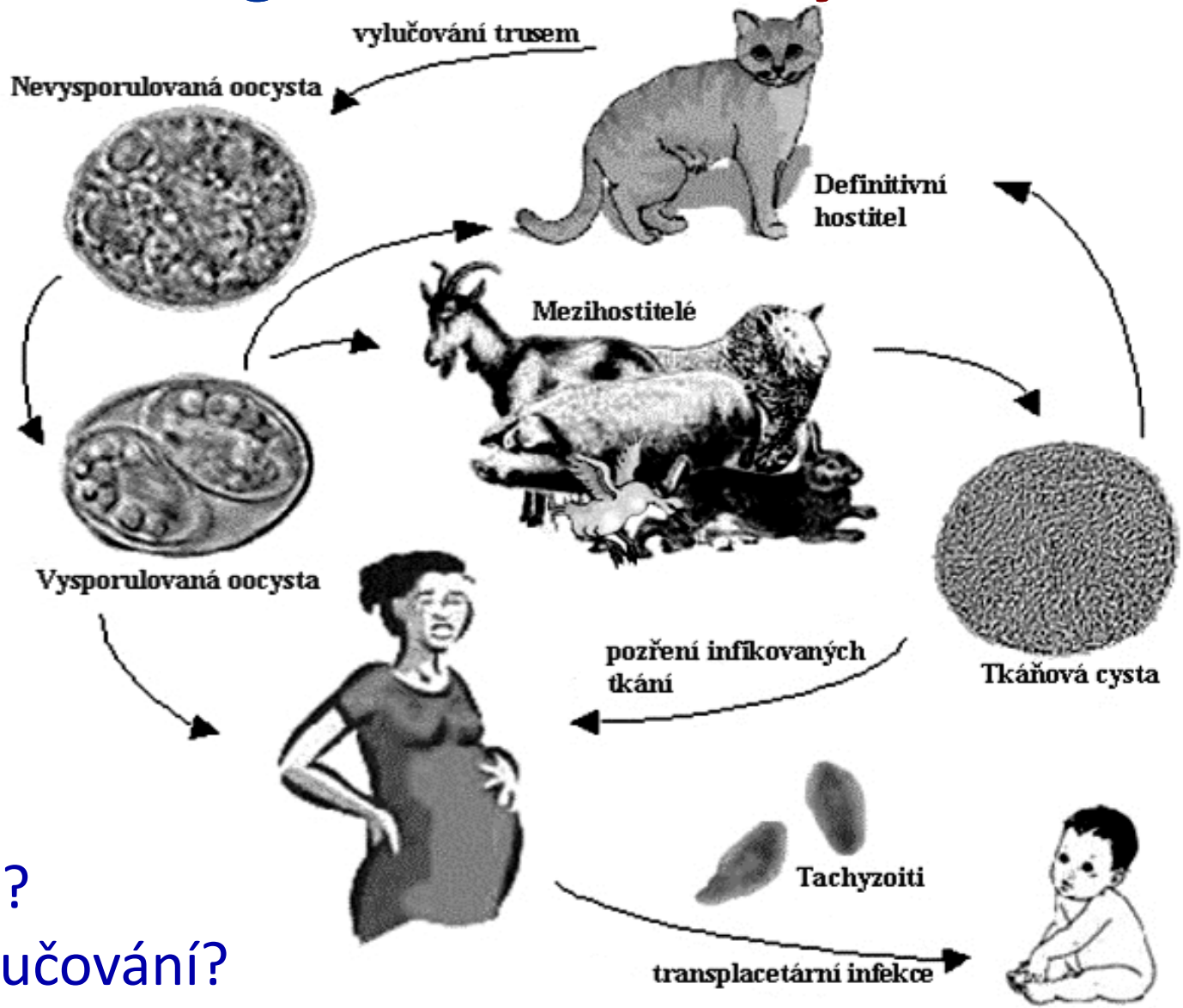


Bradyzoiti (cystozoiti) 5 - 8,5 x 1-3 μm ,
nachází se uvnitř cyst
tkáňová cista (5 - 100 μm) ve
vnitřních orgánech a tkáních (CNS,
svaly, oko, srdce..)
chronická fáze infekce



Sporozoiti 2 x 6 - 8 μm , uvnitř
oocyst (více rhoptrií a mikronem
než tachyzoiti)
oocysta 11 x 13 μm
uvnitř dvě sporocysty, každá po
čtyřech sporozoitech

Toxoplasma gondii – životní cyklus



Prepatentní perioda (doba od infekce po vylučování oocyst): 3 - 10 dnů po infekci TC, > 18 dnů po infekci oocystami.

Vylučování oocyst **1–3 týdny až 150 milionů oocyst**

(Bártová et al., 2003) – experiment, vylučování za 3-5 dnů po infekci TC, vylučování 7-18 dnů, max. 5-6 den, celkem 1-47 miliónů oocyst.

Klinika u koček?

Opakované vylučování?

Toxoplasma gondii

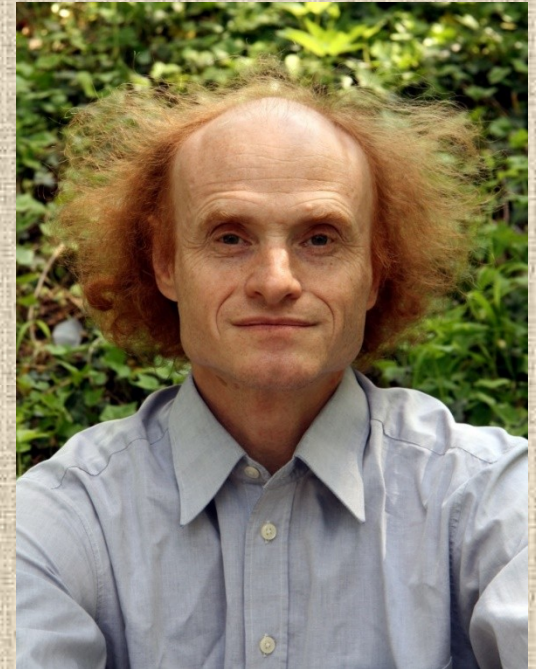


Manipulační teorie

Infikovaní:

- **2,7x** vyšší riziko dopravních nehod
- méně vadí pach kočky
- vliv na vzhled, chování, povahu, reakční časy, pohlaví plodu, rizikové chování, sexuální preference ...
- zvýšení rizika výskytu cca 70 onemocnění včetně schizofrenie, deprese, infarktu myokardu, nádorových, psychiatrických, imunitních a neurodegenerativních.

Založeno pouze na statistickém vyhodnocení



- Prof. RNDr. Jaroslav Flegr, CSc., Přírodovědecká fakulta, Karlova univerzita, dílo Zamrzlá evoluce
- Ig Nobel (za výzkum, které přinutí k zasmání a poté k zamyšlení)
- <http://pokusnikralici.cz/>

Toxoplasma gondii - cesty šíření

Tkáňové cesty, oocysty - perorální infekce



Toxoplasma gondii - cesty šíření

Tachyzoiti - transplacentární infekce, transfuze, transplantace, kozí mléko...



Toxoplasma gondii

Zvířata

- bez kliniky x klinika
- domácí, volně žijící, zoo zvířata
- **ovce, kozy** - aborty, ekon. ztráty
- **mořské vydry, antilopy, manul** - úhyny



Diagnostika - průkaz *T. gondii*

1 Nepřímé metody:

- serologie (detekce protilátek, organismus se setkal s infekcí, titry)
- **LAT, IFAT, ELISA**
- sérum, masová šťáva



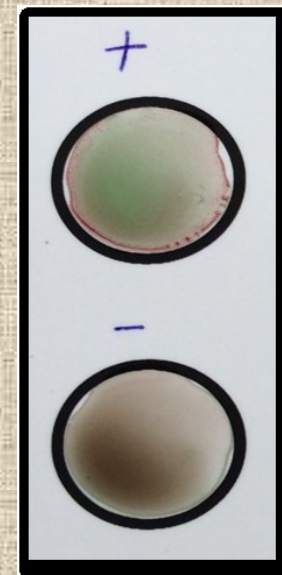
Průkaz *T. gondii* - nepřímé metody

Latex aglutinační test (LAT, MAT)

- rychlý orientační test

Sada PASTOREX TOXO

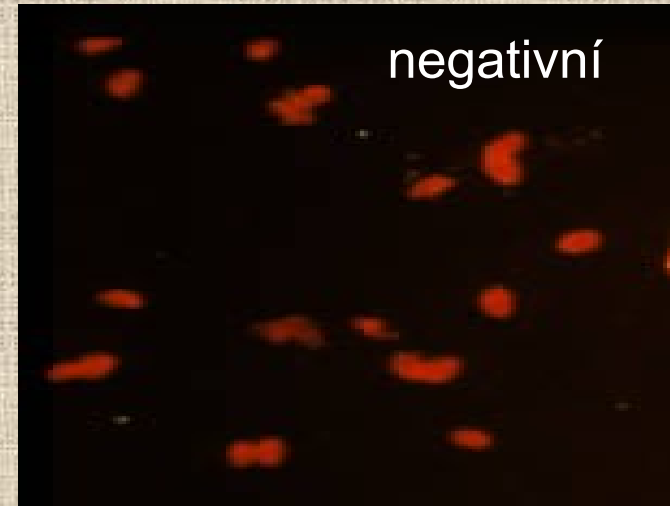
- kapka latexové suspenze (antigen *T. gondii*) + kapka ředícího roztoku + 15 μ l krevního séra, smíchat tyčinkou, otáčet aglutinační kartu, po 5 až 7 min - **aglutinace**



Průkaz *T. gondii* - nepřímé metody

Nepřímý imunofluorescenční test (NIFR, IFAT)

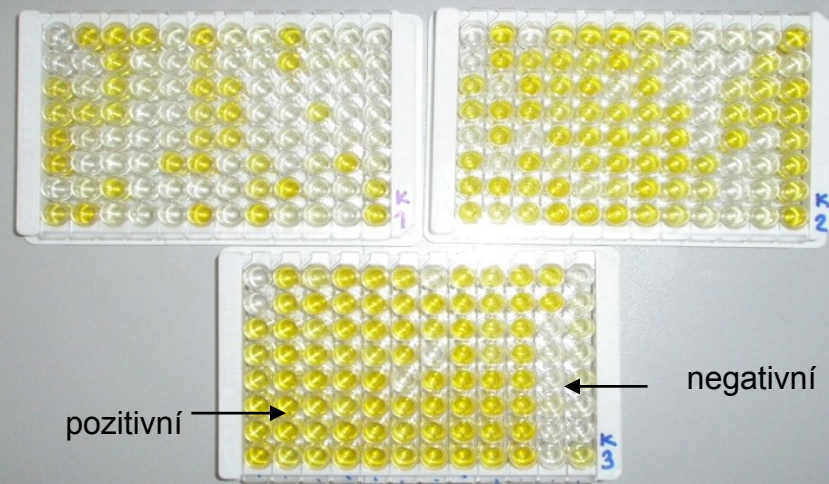
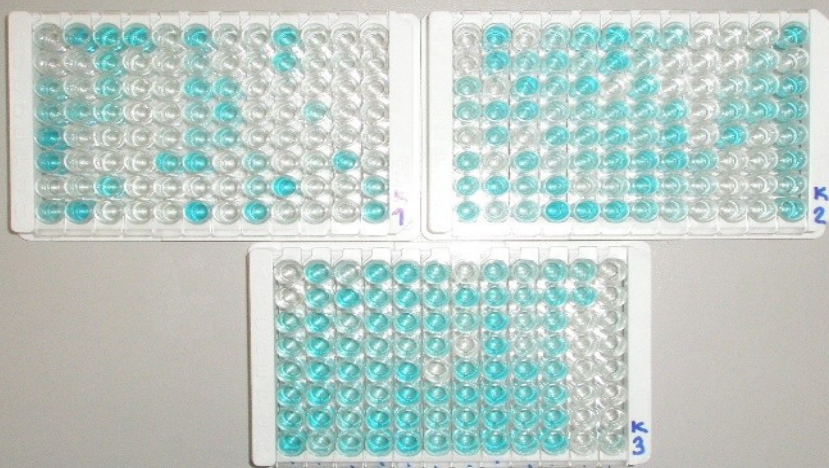
- sklíčka s antigenem *T. gondii* + ředěné sérum (1:40, 1:50..) - **vazba antigen-protilátka**
- vazba **konjugátu** (Ab s fluoresceinem) na protilátky
- **immunofluorescenční mikroskop**



Průkaz *T. gondii* - nepřímé metody

Enzymová imunoanalýza (ELISA)

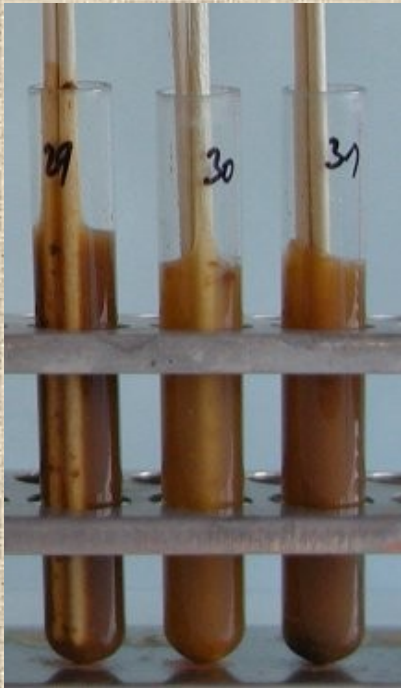
- Destičky s antigen *T* + ředěné sérum – **vazba antigen-protilátka**
- vazba **konjugátu** (protilátka IgG konjugovaná křenuvou peroxidázou)
- **spektrofotometr** - detekce peroxidázové aktivity na substrátu = barevný produkt



Průkaz *T. gondii* - přímé metody

Flotace

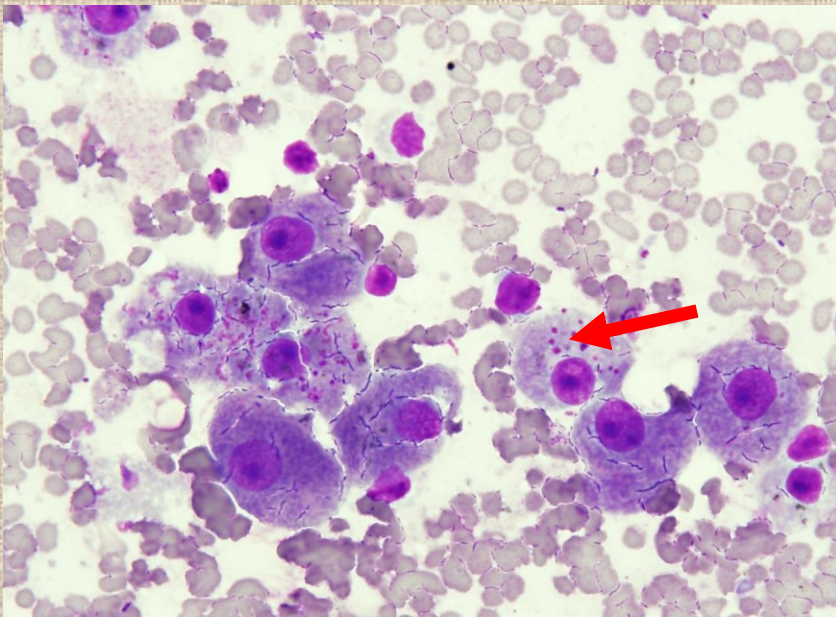
- založena na vyšší specifické váze flotačního roztoku (cukerný roztok) než parazitárních útvarů
- po centrifugaci vyplavou parazitární útvary ve zkumavce na hladinu



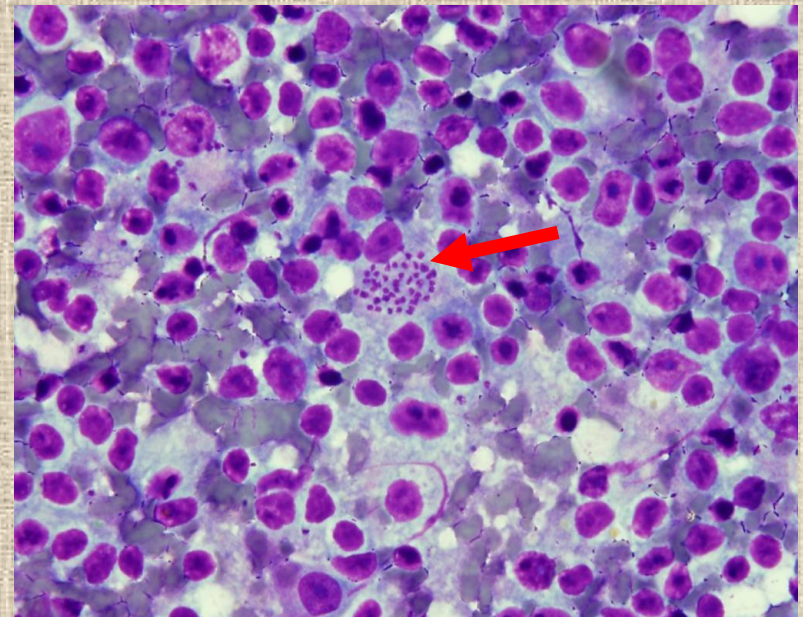
Průkaz *T. gondii* – přímé metody

Mikroskopie

- barvené otiskové preparáty
- histopatologie



Otiskový preparát – mozeček



Otiskový preparát – slezina

Průkaz *T. gondii* - přímé metody

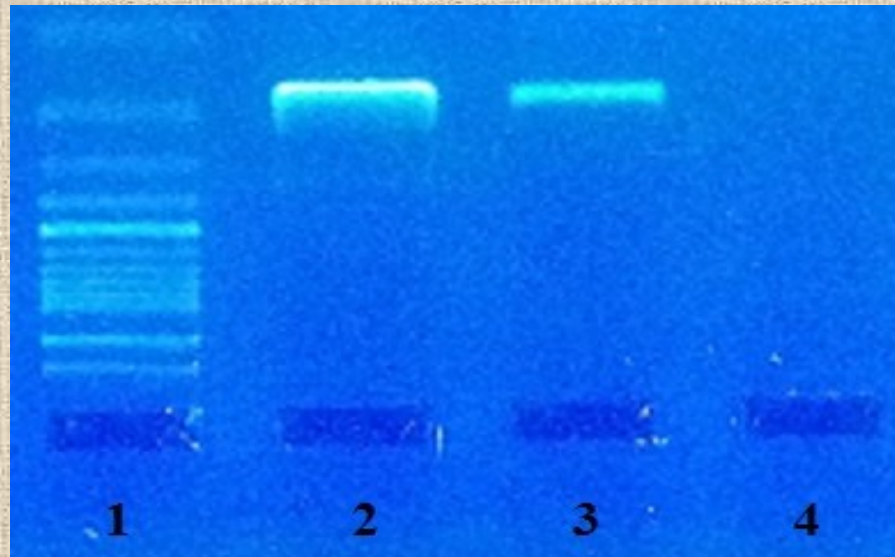
Experiment, izolace

- biologický pokus (Balb myši)
- buněčné kultury (Vero)



Molekulární metody

- PCR, PCR/RFLP, genotypizace



T. gondii oblast TGR1 E

1 - velikostní standard, 2 - pozitivní kontrola (194 pb), 3 - pozitivní vzorek, 4 - negativní kontrola

Protilátky u domácích zvířat v ČR

(2006-2015)

- **kozy** 66 % (n = 251) Bartova a Sedlak 2013
- **ovce** 59 % (n = 547) Bartova et al. 2010
- **kočky** 44 % (n = 286) Sedlak a Bartova 2006
- **prasata** 36 % (n = 551) Bartova a Sedlak 2011
- **psi** 26 % (n = 413) Sedlak a Bartova 2006
- **pštrosi** 25% (n = 298) Bartova et al. non published
- **koně** 23 % (n = 552) Bartova et al. 2010
- **drůbež** 12 % (n = 1108) Bartova et al. 2009
- **skot** 10 % (n = 546) Bartova et al. 2015
- **králíci** 5,5 % (n = 902) Neumayerova et al. 2014



Protilátky u volně žijících zvířat v ČR (2006-2016)

- lišky **100 %** (n = 80) Bartova et al., 2016
- prase divoké **40 %** (n = 656) Racka et al., 2015
- **26 %** (n = 565) Bartova et al. 2006
- přežvýkavci **32 %** (n = 720) Bartova et al., 2007
- exot přežv. **31 %** (n = 184) Bartova et al., 2017
- zajíci **20 %** (n = 333) Bartova et al. 2010
- drobní savci **3 %** (n = 240) Machacova et al. 2016

Zajíci vysoce vnímaví k infekci – úhyny po
exper. infekci !!



Léčba a prevence *T. gondii*

Prevence

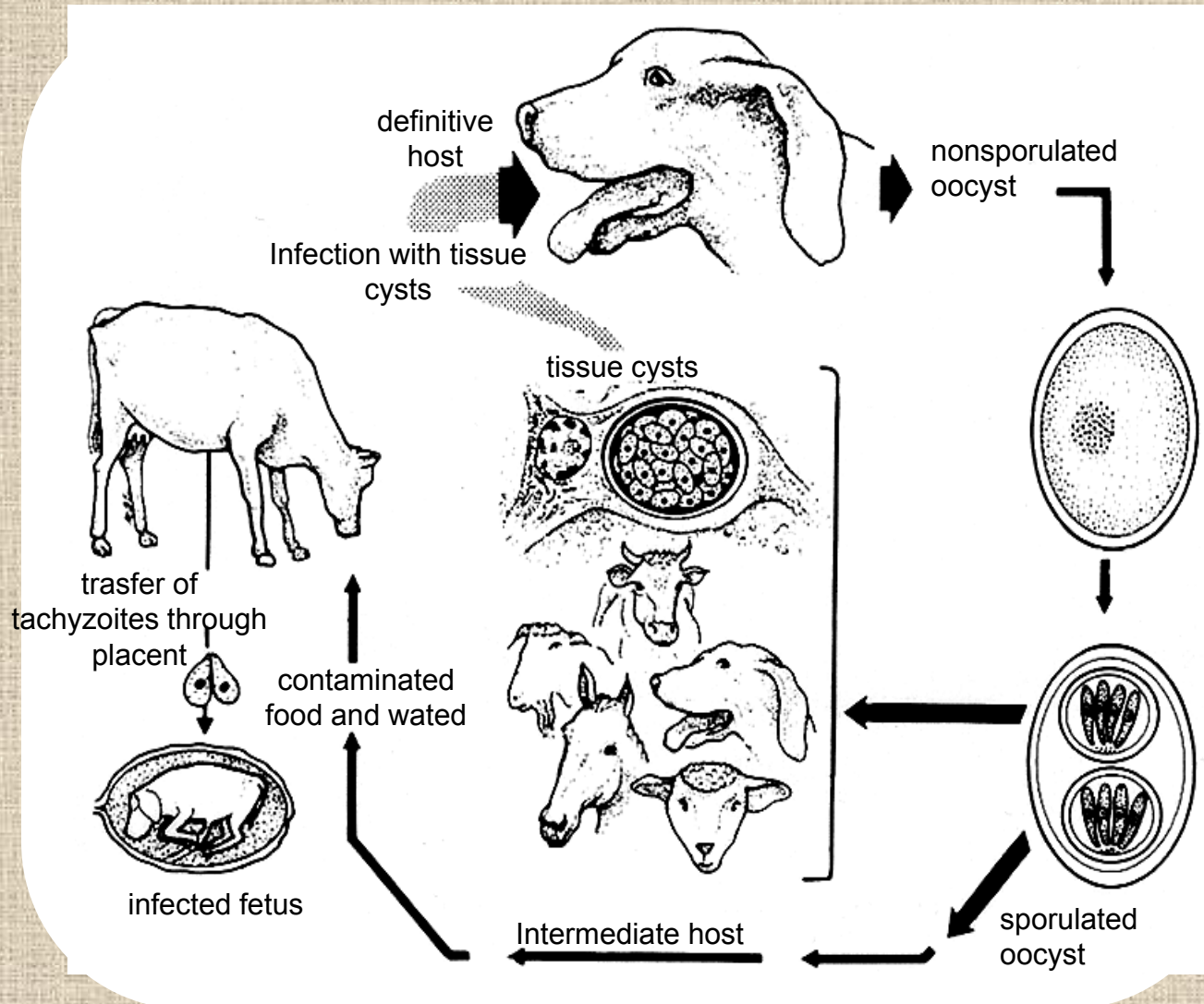
Lidi

- zabezpečit dětské hřiště
- dodržovat hygienu (kočičí záchodky, ovoce, zelenina, prkýnka v kuchyni při práci se syrovým masem...)
- konzumovat tepelně opracované masné výrobky !!
tepelné opracování masa (min 67 °C 10 min / -12 °C 48 h)
nasolení (> 2% soli 1 den)

Zvířata

- zamezit přístup koček (hlodavců, ptáků) do chovu
- podestýlka, krmivo, voda, pastva – bez oocyst
- krmit masem bez TC (labor. myši, hovězí)

Neospora caninum



Neosporóza - u zvířat

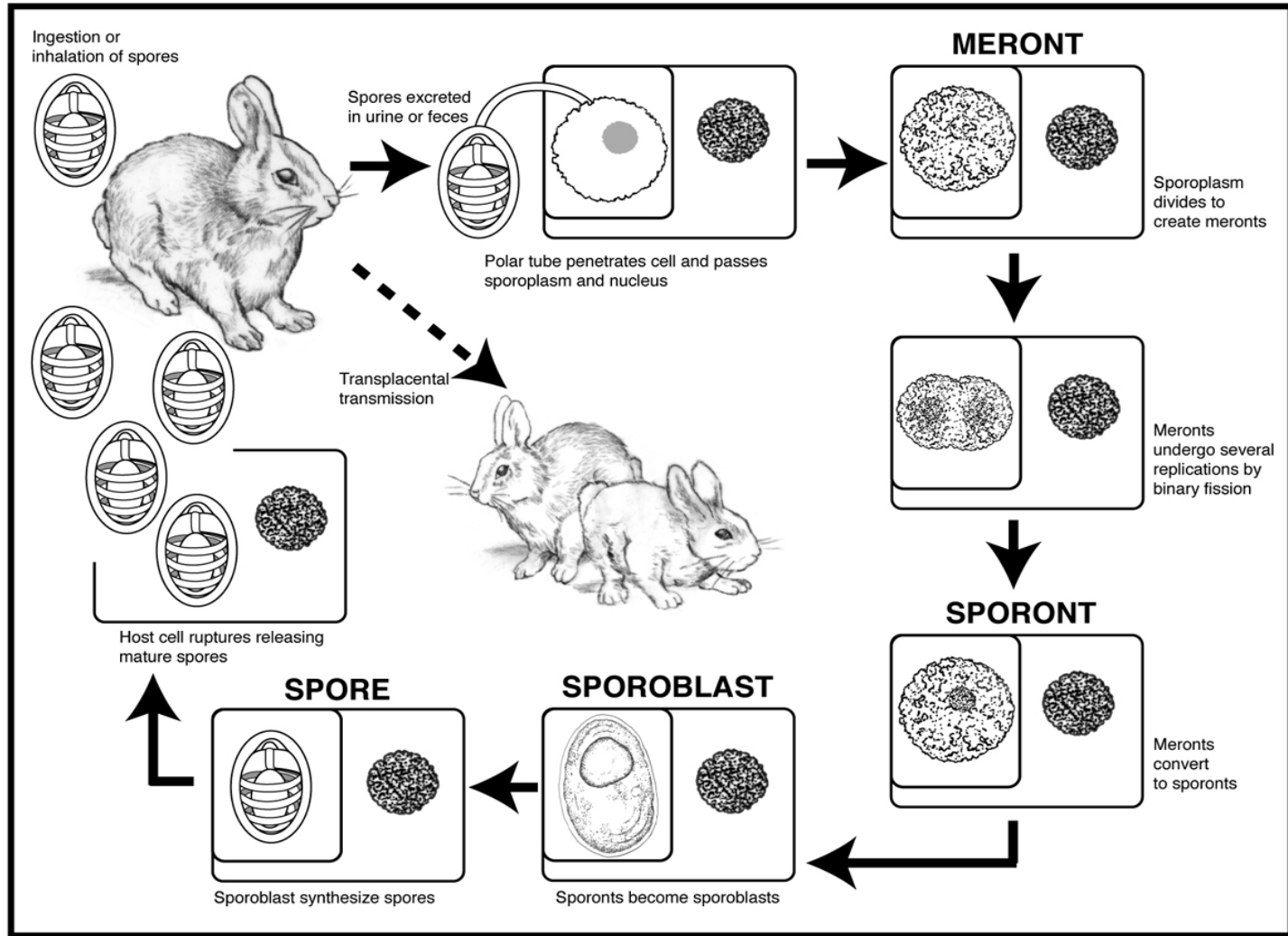
- není **zoonóza**, ale protilátky byly zjištěny i u lidí

Zvířata

- domácí, volně žijící, zoo zvířata
- **skot** – aborty
- **psi** - oční a nervová forma
- léčba, prevence



Encephalitozoon cuniculi



Encephalitozoonoza – u zvířat

Králíci - postižení nervového systému s poruchami rovnováhy a vychýlením hlavy na jednu stranu

jedná se o **zoonózu!**





Možnosti spolupráce se statistiky?

Statistika

Vzorkování (sampling)

- předem vypočítat počty odebíraných vzorků (dle celkového počtu zvířat, využití statistik ministerstva zemědělství..)
- problém spolupráce s chovateli, myslivci...
- nedostatečné údaje pro statistické zpracování

Data pro statistické zpracování

- celkový počet a počet pozitivních zvířat
- **Jaká je prevalence?**
- **Statisticky významné rozdíly v prevalenci dle různých faktorů?**
- **Závislosti, korelace, modely?**

Statistika

Ověřování hypotéz – toxo/neo/encef pozitivita (ne)záleží na:

- věk (různé věkové kategorie)
- pohlaví (samec x samice x kastrát)
- různé státy, kraje, lokality, farmy, velikost farem
- roky a roční období
- plemeno, velikost plemen (např. psů)
- využití (pet, jatečné, práce..)
- stáj x pastva
- přítomnost definit. hostitelů, domácích zvířat
- typ krmiva, co loví (masožravci/býložravci)
- klinické příznaky x bez příznaků....

Statistika - toxo, neo u skotu, ČR

Kraj	Počet vzorků	<i>N. caninum</i> (cELISA)		<i>T. gondii</i> (ELISA)			
		Pozitivní (%)	% I	Pozitivní (%)	p-value	OR	95%CI
Střední Čechy	185	2 (1.1%)	78 and 85	19 (10%)	0.774	1.091	0.604; 1.971
Plzeň	147	1 (0.7%)	47	12 (8%)	0.444	0.770	0.392; 1.509
Ústí nad Labem	125	0 (0%)	–	18 (14%)	0.046	1.841	1.003; 3.380
Liberec	43	0 (0%)	–	4 (9%)	0.916	0.944	0.324; 2.753
Hradec Králové	30	0 (0%)	–	0 (0%)	0.064	0	–
Praha	11	0 (0%)	–	0 (0%)	0.270	0	–
Karlovy Vary	5	0 (0%)	–	0 (0%)	0.460	0	–
Celkem	546	3 (0.5%)	47 – 85	53 (9.7%)			

STATISTICA Cz 10, OR – odds ratio, 95% CI (confidence interval)

Statistika - toxo, neo u koní v Itálii

Pohlaví	Počty koní	IFAT (%)	cELISA (%)	Chi-square test, df, p-value ^a
Samice	315	5 (1.6 %)	32 (10.2 %)	IFAT (1.67, df = 3, p = 0.434, cELISA (13.28, df = 2, p = 0.0013)
Samec	182	5 (2.8 %)	11 (6 %)	
Kastrát	146	5 (3.4 %)	27 (18.5 %)	
Věk (roky)				IFAT (2.64, df = 3, p = 0.4507),
< 1 – 4	105	3 (2.9 %)	10 (9.5 %)	cELISA (1.30, df = 3, p = 0.7281)
≥ 4 – 9.5	196	3 (1.5 %)	27 (13.8 %)	
≥ 9.5 – 15	178	4 (2.3 %)	20 (11.3 %)	
≥ 15 – 34	111	5 (4.5 %)	13 (11.7 %)	
neznámo	53	0	0	
Plemeno				IFAT (7.76, df = 7, p = 0.3541),
Appaloosa	34	1 (2.9 %)	5 (14.7 %)	cELISA (23.40, df = 7, p = 0.0015)
Ponny	59	3 (5.1 %)	6 (10 %)	
Quarter horse	62	2 (3.2 %)	12 (19.4 %)	
Salernitano	30	0	0	
Sella Italiana	92	2 (2.2 %)	3 (3.3 %)	
Trotters	71	0	2 (2.8 %)	
kříženci	60	0	7 (11.7 %)	
další plemena	111	5 (4.5 %)	18 (16.2 %)	
neznámo	124	2 (1.6 %)	17 (13.7 %)	

Statistika - toxo u oslů v Itálii

	Coefficient	Std Error	z	P
	-1.98	0	0.9998	
Pohlaví (samec)	-17.0	-0.002	0.9980	
Věk (roky)	-0.709	-2.011	0.0443	0.01
Plemeno				
kříženci	-1.37	-2.277	0.0228	0.01
Sicilian-Grey	1.15	1.569	0.1167	
Martina-Franca	-381	-0.667	0.5047	
Amiata	-18.0	-0.004	0.9964	
Ragusano	0.176	0.192	0.8479	
Sardinian	-18.5	-0.005	0.9963	
Využití				
Mléko	1.19	-0.004	0.9999	
Pet	1.58	-0.002	0.9998	
Chov	17.9	-0.007	0.9944	
Přítomnost psů	-0.28	1.05	0.1750	
Přítomnost přežvýkavců	-0.31	1.21	0.0980	