

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biologických a lékařských věd

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Laboratorní diagnostika toxoplazmózy

2006

MONIKA MARTINCOVÁ

Ráda bych vyjádřila své díky všem, kteří mi při zpracování diplomové práce pomáhali.

Chtěla bych poděkovat MVDr. Zuzaně Čermákové, vedoucí mé diplomové práce, která mě získala a nadchla pro práci v oboru parazitologie. Zároveň mi nabídla téma diplomové práce, zaměřené na laboratorní diagnostiku toxoplazmózy, a po celou dobu mé práce mi poskytovala všestrannou odbornou pomoc. Paní doktorka se mi svými odbornými znalostmi, pracovním nasazením a lidským přístupem stala opravdovým vzorem.

Kolektivu Laboratoře parazitologie Ústavu klinické mikrobiologie, hlavně laborantkám Miroslavě Typtové a Věře Svatoňové, - děkuji za vytvoření výborných pracovních podmínek, za vřelé přátelské přejetí a všestrannou podporu.

Doc. RNDr. Vladimíru Buchtovi děkuji za odborné rady a připomínky.

V závěru bych ráda poděkovala svým rodičům a svým nejbližším za to, že mě po celou dobu studia podporovali a při závěrečné práci mi poskytli důležitou psychickou podporu.

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. ZKRATKY..... | 4 |
| 2. ÚVOD..... | 5 |
| 3. TEORETICKÁ ČÁST..... | 6 |
| 3.1. HISTORIE..... | 9 |
| 3.2. KLASIFIKACE..... | 9 |
| 3.3. EPIDEMIOLOGIE..... | 10 |
| 3.3.1. Přenos..... | 10 |
| 3.3.2. Orgánové transplantace..... | 11 |
| 3.3.3. Kongenitální přenos..... | 11 |
| 3.3.4. Séroprevalence..... | 12 |
| 3.4. ŽIVOTNÍ CYKLUS..... | 12 |
| 3.4.1. Tachyzoiti..... | 12 |
| 3.4.2. Bradyzoiti..... | 13 |
| 3.4.3. Oocysty..... | 13 |
| 3.4.4. Vztah hostitel versus parazit..... | 14 |
| 3.5. PATOGENEZE A PATOLOGIE..... | 15 |
| 3.5.1. Patogeneze..... | 15 |
| 3.5.2. Patologie..... | 16 |
| 3.6. KLINICKÉ PROJEVY..... | 17 |
| 3.6.1. Klinické projevy u zvířat..... | 18 |
| 3.6.2. Imunokompetentní dospělí a děti..... | 18 |
| 3.6.3. Oční toxoplazmóza..... | 18 |
| 3.6.3.1. Oftalmologický nálezn..... | 20 |
| 3.6.4. Imunokompromitovaní pacienti s nebo bez AIDS..... | 22 |
| 3.6.5. Kongenitální toxoplazmóza..... | 23 |
| 3.7. LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA..... | 25 |
| 3.7.1. Serologické metody..... | 26 |
| 3.7.1.1. Komplement-fixační reakce..... | 26 |
| 3.7.1.2. Stanovení titru protilátek..... | 27 |
| 3.7.1.3. Western Blot..... | 29 |
| 3.7.2. Molekulárně biologické metody..... | 31 |
| 3.7.2.1. Polymerázová řetězová reakce..... | 31 |
| 3.7.2.2. Histologická diagnóza..... | 34 |
| 3.7.2.3. Izolace <i>Toxoplasma gondii</i> | 35 |
| 3.8. TERAPIE..... | 35 |
| 3.8.1. Infekce imunokompetentního hostitele..... | 35 |

| | | |
|----------|---|----|
| 3.8.2. | <i>Mateřská a fetální infekce</i> | 35 |
| 3.8.3. | <i>Chorioretinitis</i> | 37 |
| 3.8.4. | <i>Infekce imunokompromitovaných hostitelů</i> | 37 |
| 3.8.4.1. | <i>Toxoplazmová encefalitis, generalizovaná infekce</i> | 37 |
| 4. | MATERIÁL A METODY | 39 |
| 4.1. | LABORATORNÍ METODY | 39 |
| 4.1.1. | <i>Komplement-fixační reakce</i> | 39 |
| 4.1.2. | <i>Enzymo-Imuno-Analýza EIA</i> | 44 |
| 4.1.3. | <i>Srovnávací Western-Blot pro porovnání protilátek matky a novorozence ve třídách IgG a IgM imunoglobulinů (CIP-WB = Comparative Immunological Profiles)</i> | 49 |
| 4.1.4. | <i>Polymerázová-řetězová reakce PCR</i> | 53 |
| 4.2. | MATERIÁL | 54 |
| 4.2.1. | <i>Popis souboru</i> | 54 |
| 5. | VÝSLEDKY | 57 |
| 5.1. | PŘEHLED STANOVENÝCH TITRŮ KFR, SPECIFICKÝCH PROTILÁTEK VE TŘÍDÁCH IGG, IGM, IGA, IGE A AVIDITY IGG U VYŠETŘOVANÝCH SKUPIN PACIENTŮ S AKUTNÍ TOXOPLAZMÓZOU | 57 |
| 5.2. | DOTAZNÍKOVÉ ŠETŘENÍ..... | 61 |
| 5.2.1. | <i>Vyhodnocení dotazníků zaslaných ošetřujícím lékařům pacientů s akutní toxoplazmózou</i> | 61 |
| 5.3. | KAZUISTIKA | 66 |
| 6. | DISKUZE..... | 67 |
| 7. | ZÁVĚR | 70 |
| 8. | LITERATURA..... | 72 |

1. Zkratky

| | |
|--------|---|
| Ab | - protilátka |
| Ag | - antigen |
| AIDS | - Acquired ImmunoDeficienty Syndrom (syndrom získané imunodeficiency) |
| ALT | - alaninaminotransferasa |
| AST | - aspartátamonotransferasa |
| CD | - Cluster of Differentiation |
| CIP-WB | - Comparative Immunological Profiles – Western Blot |
| CNS | - centrální nervový systém |
| DNA | - deoxyribonukleová kyselina |
| EDTA | - ethylendiamintetraoctová kyselina |
| EIA | - enzymoimunoanalýza |
| ELISA | - enzyme-linked-immunosorbent-assay |
| Ig | - imunoglobulin |
| IP | - index positivity |
| ISAGA | - immunosorbent-agglutination-assay |
| IU | - international unit (mezinárodní jednotka) |
| KFR | - komplement-fixační reakce |
| MPA | - imuno elektroforéza v agaru |
| MW | - molecular weight (molekulová hmotnost) |
| NBT | - nitrotetrazoliová modř |
| NIFT | - nepřímá imunofluorescence |
| PCR | - polymerázová řetězová reakce |
| PD | - papilární diametr |
| TGR1E | - oblast genu <i>T. gondii</i> |
| Th-1 | - T-lymfocyt helper |
| WHO | - světová zdravotnická organizace |

2. Úvod

Laboratorní diagnostika toxoplazmózy je založena na sérologickém testování protilátek přítomných v krevním séru metodami jako jsou například komplement-fixační reakce (stanovení celkových protilátek) a EIA metody (pro diagnostikování specifických tříd imunoglobulinů), dále na přímém průkazu *T. gondii* histologickým vyšetřením lymfatických uzlin a jiných tkání a na detekci DNA prvoka metodou PCR. Pomocí výsledků sérologických testů, které poskytl Ústav klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Hradec Králové, byla vybrána cílová skupina pacientů s markery akutní infekce (KFR $\geq 1:32$, IgM, IgA, IgE >1 , nízká avidita protilátek ve třídě IgG). Ošetřujícím lékařům těchto pacientů byly zaslány dotazníky týkající se možných způsobů přenosu nákazy a klinických příznaků onemocnění.

Cílem předkládané práce bylo zpracování údajů získaných dotazníkovou metodou od pacientů a ošetřujících lékařů, jejich porovnávání s laboratorními výsledky a poté vyhodnocení pravděpodobných zdrojů infekce, četnosti různých klinických projevů a vývoje sérologických ukazatelů.

3. Teoretická část

Infekce tkáňovým prvokem *Toxoplasma gondii* je u lidí všeobecně rozšířená. Toxoplazmóza je v České republice jedním z nejčastěji se vyskytujících parazitárních onemocnění. Sérologické studie ukazují, že přibližně 1/3 naší populace tuto infekci prodělala.

Lidé jsou infikováni *T. gondii* hlavně požitím nedostatečně tepelně zpracovaného masa obsahujícího živé tkáňové cesty, požitím jídla či vody kontaminované oocystami z výkalů infikovaných koček, cestou ruka-ústa z půdy a písku kontaminovaných výkaly koček (geofagie), z matky na plod transplacentárně, popř. velmi vzácně kapénkovou infekcí dýchacím traktem a spojivkovým vakem či při pokousání kočkou vylučující oocysty (raritní výskyt) (23).

Infekce zdravých dospělých lidí je většinou asymptomatická, některé projevy onemocnění se vyskytují u imunokompromitovaných jedinců a novorozenců. Mezi základní klinické projevy toxoplazmózy patří: horečka, lymfadenitida, popř. v generalizované formě jako tzv. uzlinový syndrom, které mohou perzistovat dny nebo týdny. Někdy se onemocnění klinicky podobá mononukleóze. Kongenitální infekce se může vyskytnout následně po infekci matky během těhotenství. Závažnost onemocnění a jeho následků pro plod závisí na stupni těhotenství a na době, kdy *T. gondii* pronikne do prostředí dělohy (8). Existuje široké spektrum klinických projevů u kongenitálně infikovaných dětí. Úplná tetáda klinických znaků představuje: retinochoroiditidu (následkem čehož může dojít k zmenšení visu), hydrocefalus, intracerebrální kalcifikaci a křeče. Hydrocefalus je nejméně častým, ale nejvíce dramatickým poškozením novorozence. Tento znak je jedinečný pro kongenitálně získanou toxoplazmózu u lidí. U zvířat nebyl nikdy zaznamenán.

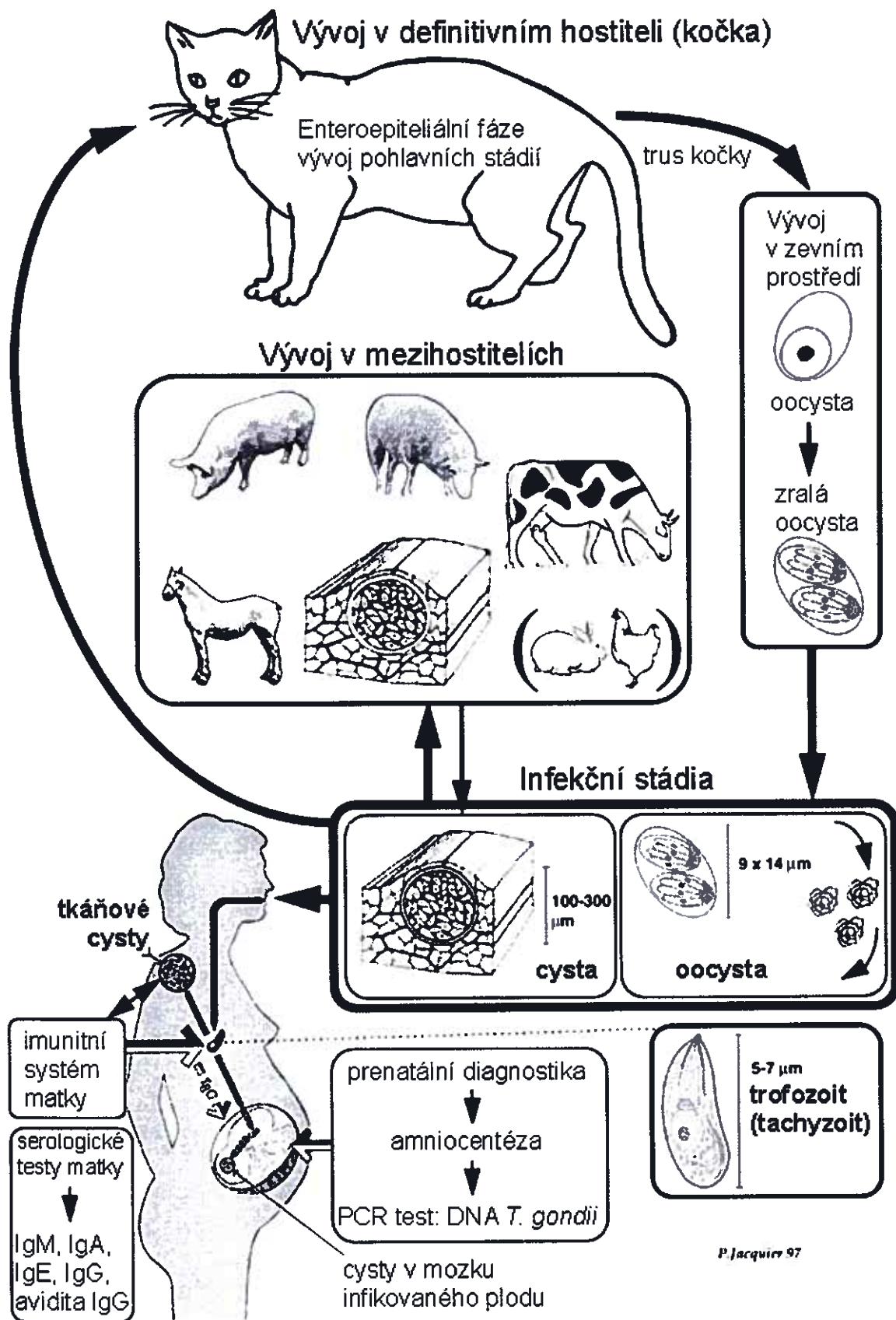
Toxoplazmová infekce se v naprosté většině případů diagnostikuje průkazem specifických protilátek v krevním séru. Základním vyšetřením se zjišťuje, zda je pacient nakažen a je-li pravděpodobné, že se nachází v akutním stádiu infekce. Jako základní metoda se používá komplementační reakce (KFR, vazba komplementu), kterou se stanovují tzv. celkové protilátky. Titr 1:32 a vyšší signalizuje možnou akutní infekci. Doplňující vyšetření (imunoenzymové testy EIA, ISAGA), která rozlišují jednotlivé třídy

specifických protilátek, IgG, IgM, IgA, IgE a aviditu ve třídě IgG, zpřesňují určení fáze infekce. Pro akutní infekci svědčí vysoké titry IgM, IgE a IgA. Významné je preventivní vyšetřování gravidních žen. Protilátky by měly být vyšetřeny co nejdříve po potvrzení těhotenství. Základním vyšetřením je kromě stanovení celkových protilátek (KFR) i IgM. Je-li na začátku těhotenství žena negativní nebo jsou-li přítomny protilátky IgM, je nutné vyšetření opakovat. Při vzestupu IgM a IgA během gravidity je nutné vyšetření a sledování na specializovaném pracovišti (gynekologicko-porodnickém, infektologickém). Po proběhlé akutní toxoplazmóze (léčené i bez léčby) celkové protilátky a protilátky IgG dlouhodobě (i doživotně) v nízkých titrech přetrvávají.

Lékem volby je kombinace pyrimethaminu (Daraprim) a sufadiazinu s leukovorinem, u oční toxoplazmózy lze použít clindamycin, který dobře proniká do oka. U těhotných je lékem volby spiramycin (Rovamycin), který se také podává při alergii na sulfonamidy.

Prognóza je dobrá, pokud nejde o vertikální přenos a septický průběh infekce u novorozence a o akutní infekci u těžce imunokompromitovaných pacientů (AIDS, trasplantace progenitorových buněk kostní dřeně a orgánů). U mozkové toxoplazmózy je prognóza při včasné diagnostice a léčbě také poměrně příznivá.

Hlavním bodem prevence je mytí rukou (zvláště po manipulaci s kořaty, práci s hlínou a syrovým masem), dostatečná tepelná úprava masitých pokrmů, důkladné mytí zeleniny a vyšetření protilátek proti *T. gondii* před plánovaným těhotenstvím nebo v jeho raném období (14).



Obr. 1. Vývojový cyklus *Toxoplasma gondii*.

Převzato a upraveno z Dr. Patrick Jacquier, Labor. ParaDiag, Bern
<http://www.roche.com/pages/facets/2/toxmoplasma.ipg>

3.1. Historie

Organismus prvoka *T. gondii* poprvé popsali Nicolle a Manceaux roku 1908, po nálezu v játrech a slezině severoafrického hlodavce (*Ctenodactylus gondii*) z čeledi severoafrických pamyší hřebenoprstých. Podezření, že tento parazit je patogenní i pro člověka, se objevilo potom, když doktor Janků roku 1923 pozoroval parazitické cysty v retině dítěte s hydrocefalem a mikroftalmií. Roku 1937 Wolf a Cowen demonstrovali význam vrozené toxoplazmózy a roku 1940 následoval objev (Pinkerton a Weidman , 1940) postnatální infekce. Hutchinson a spol. (1965) dekompletizovali biologický cyklus *T. gondii*. Mezníkem v sérodiagnostice bylo zavedení Sabinova- Feldmanova testu (6).

3.2. Klasifikace

Toxoplasma gondii je obligátní intracelulární protozoární organismus, který lze taxonomicky zařadit:

| | |
|----------|--------------------------|
| Kmen | Apicomplexa |
| Třída | Sporozoa |
| Podtřída | Coccidia |
| Řád | Eucoccidiida |
| Podřád | Eimeriina |
| Čeleď | Sarcocystidae |
| Podčeleď | Toxoplasmatinae |
| Rod | <i>Toxoplasma</i> |
| Druh | <i>Toxoplasma gondii</i> |

Taxonomické uspořádání kmene *Apicomplexa* je však více méně věci kompromisu a neustále probíhá upřesňování. Velké pozornosti taxonomů se těší podtřída *Coccidia*. Pro zástupce kmene *Apicomplexa* je typický:

- parazitizmus
- apikální komplex obsahující vysoce specializované orgány napomáhající parazitovi ve vstupu do buňky.

3.3. Epidemiologie

3.3.1. Přenos

Lidé mohou být infikováni *T. gondii* požitím (popř. kontaminací rukou) nedostatečně tepelně upraveného (např. grilované maso, játrová zavářka či sekaná) nebo syrového masa (hlavně vepřové, skopové, králičí a maso z nutrií) obsahující tkáňové cysty, vodou a jídlem (neomytá zelenina a ovoce) obsahující oocysty vylučované ve fekáliích infikovaných koček, při kontaktu s fekáliemi infikovaných koček při práci na zahradě či při cestování mimo Evropu do zemí s nižším hygienickým standardem (25). Zdá se, že rozdíly v séroprevalenci *T. gondii* korelují se stravovacími a hygienickými návyky dané populace. Tyto nalezené znaky ukazují, že orální přenos je hlavní zdroj infekce.

Oocysty *T. gondii* jsou vylučovány domestikovanými kočkami a jinými volně žijícími zástupci z rodu Felidae (kočkovité šelmy) odpovědnými za kontaminaci životního prostředí. Domestikované kočky jsou hlavním zdrojem kontaminace a produkují velké množství oocyst (až 10 milionů denně po dobu 1 až 3 týdnů). Sporulující oocysty v zemi přežívají po dobu až několika měsíců či roků. Oocysty mohou být přenášeny mechanicky mouchami, šváby, žížalami apod. Oocysty jsou známy tím, že přežívají na ovoci a na zelenině po dlouhou dobu. Lidé mohou získat toxoplazmózu i při mazlení se psy, kteří se vyváleli v infikovaných kočičích výkalech.

Zajímavé je, že pokud by vylučovalo oocysty *T. gondii* jenom několik desítek koček, díky masivní produkci oocyst a jejich rezistenci k destrukci, je zajištěno šíření prvoka v prostředí a vnímavé populaci. Kongenitálně infikovaná kořata mohou také vylučovat oocysty. Míra infekcí u koček je určována mírou infekcí u místní populace ptáků a hlodavců, kteří slouží jako zdroj potravy. Například: oocysty *T. gondii* byly nalezeny u 23.2% z 237 koček na Costa Rice, kde se nachází vysoká incidence infekcí i ptáků a hlodavců. Pro epidemiologické výzkumy jsou séroprevalenční data u koček užitečnější než výsledky zkoumání výkalů, protože kočky s pozitivním nálezem protilátek pravděpodobně vylučují nebo vylučovaly oocysty a jsou indikátorem kontaminace prostředí (8).

3.3.2. Orgánové transplantace

Přenos *T. gondii* při transplantaci orgánů ze séropozitivního dárce na séronegativního příjemce (dárce D+ /příjemce P-) je důležitá příčina onemocnění srdce, srdce-plic, ledvin, jater, jater-pankreatu u transplantovaných pacientů (příjemců). Reaktivace latentní infekce u příjemce (D+/P- nebo D+/P+) je nejčastěji se vyskytující mechanismus opětovného vzplanutí akutní toxoplazmózy u pacientů po transplantaci kostní dřeně, v hematopoetických kmenových buňkách a játrech u transplantovaných pacientů a u lidí s rozvinutým syndromem AIDS. Ačkoli vzácně, *T. gondii* může být taky přenesena krevní cestou nebo leukocyty dárců. Infekce u laboratorních pracovníků se vyskytuje po kontaktu s kontaminovanými jehlami a sklem nebo infikovanými zvířaty.

3.3.3. Kongenitální přenos

Po infekci matky *T. gondii* v raném období těhotenství, parazit prostupuje do fetální cirkulace přes placentu. Prevalence kongenitální toxoplazmózy je v rozmezí od 1 do 10 na 10 000 novorozenců. Infekce matky získaná před těhotenstvím zajišťuje malý nebo žádný risk pro plod, kromě žen, které byly infikovány několik týdnů před otěhotněním. Četnost kongenitálního přenosu se značně liší v závislosti na období těhotenství, v němž matka byla infikována.

Nejzávažnější je infekce získaná během období početí a v prvním trimestru těhotenství, kdy může dojít k těžkému poškození vyvíjejícího se plodu; ovšem vstup placentou je v tomto období nejméně četný, zatímco míra přenosu během posledního trimestru gravidity je vyšší než 60%. Časná maternální infekce (první a druhý trimestr) může způsobit závažnou kongenitální toxoplazmózu a může zapříčinit smrt plodu v děloze a spontánní potrat. V kontrastu je pozdní infekce matky (třetí trimestr) nejméně závažná, k postižení plodu nemusí dojít, ale relativně často jsou popisována oční postižení a psychomotorická retardace dítěte.

Celková frekvence subklinických infekcí u novorozenců s kongenitální toxoplazmózou je vyšší než 85% (klinicky vyjádřených je 15%). Zpočátku nepovšimnutá infekce se může ve druhé či třetí dekádě života vyvinout v chorioretinitidu nebo může nastat opoždění růstu.

Léčba matky během těhotenství usiluje o snížení frekvence a závažnosti fetální infekce. Spiramicin redukuje incidenci vertikálního přenosu cca o 60%. Vertikální přenos *T. gondii* v souvislosti s chronickou infekcí je zaznamenán pouze u imunokompromitovaných žen, které mají AIDS nebo užívají imunosupresivní léčiva včetně kortikosteroidů.

3.3.4. Séroprevalence

U člověka séroprevalence infekce *T. gondii* stoupá s věkem, více se neliší mezi pohlavími a je nižší v chladnějších oblastech nebo ve větších nadmořských výškách. Incidence infekce se mění v závislosti na skupině populace a geografické lokaci.

Séroprevalence v USA 23,6%, Polsko 49,0% a Švédsko 29,4% (16).

3.4. Životní cyklus

T. gondii je kokcidiální parazit, u něhož je definitivním hostitelem kočka a ostatní teplokrevná zvířata a člověk jsou meziphostitelé. U zvířat a patrně i u člověka je to nejvíce rozšířený parazit. Coccidia mají komplexní životní cyklus. Ačkoli mají specifické hostitele, jsou většinou přenášeny fekálně-orální cestou, *T. gondii* může být přenášena i transplacentárně a požíváním masa.

Pro všechny hostitele má *T. gondii* tři infekční stadia: tachyzoity (individuálně a ve skupinách), bradyzoity (v tkáňových cystách) a sporozoity (v oocystách).

3.4.1. Tachyzoiti

Tachyzoiti jsou většinou půlměsícového tvaru a měří 2 μm x 6 μm . Vstupují do hostitelské buňky aktivním proniknutím buněčné membrány a začínají se obklopotvat parazitární vakuolou, která je chrání před hostitelskými obrannými mechanismy. Tachyzoiti se rozmnožují asexuálně pomocí binárního dělení.

Po neznámém počtu dělení, *T. gondii* tachyzoity dávají vznik dalšímu stádiu zvanému tkáňové cysty.

3.4.2. Bradyzoiti

Tkáňové cysty rostou a zůstávají uvnitř buněk (intracelulární parazit). Velikostně se mění z 5 na 70 μm a obsahují několik až mnoho stovek bradyzoitů, kteří představují klidové stadium prvoka. Tkáňové cysty se vyvíjejí v dobře prokrvovaných orgánech jako jsou plíce, játra a ledviny. V největším zastoupení se nachází ve svalových a nervových tkáních, zahrnujících mozek, oči, kosterní svalstvo a srdeční sval. Intaktní tkáňové cysty jsou pravděpodobně neškodné a mohou perzistovat po celý život hostitele.

Membrána tkáňových cyst je elastická, tenká (méně než 0.5 μm) a může obklopotvat stovky půlměsícovitě zahnutých útlých bradyzoitů, kteří měří 7 μm x 1.5 μm . Bradyzoiti se jenom nepatrně liší od tachyzoitů, mají jádro situované blízko zadního konce, navzdory tomu tachyzoiti mají jádro uložené centrálně. Bradyzoiti jsou více útlí než tachyzoiti a méně citliví ke zničení proteolytickými enzymy.

Po požití kočkou, je stěna tkáňových cyst natrávena proteolytickými enzymy v žaludku a tenkém střevě a bradyzoiti jsou uvolněni. Někteří proniknou lamina propria tenkého střeva a množí se již jako tachyzoiti. Po několika hodinách se *T. gondii* šíří do extraintestinálních tkání. Ostatní bradyzoiti penetrují epiteliální buňky tenkého střeva a iniciují vývoj četných generací asexuálů (typy A-E schizontů). Další stadium jsou organismy (merozoity) uvolněné ze schizontních forem samčích a samičích gamet. Samčí gamety mají dva bičíky (orgány pohybu) a aktivně vstupují do samičích gamet. Po fertilizaci samičí gamety, se okolo ní formuje stěna oocysty. Po dozrání oocysty prasknou a vyprázdní svůj obsah do lumen střevních epiteliálních buněk. *T. gondii* přetrvává ve střevě a extraintestinálních tkáních koček po několik měsíců a možná i po celý život kočky.

3.4.3. Oocysty

Oocysty *T. gondii* jsou formovány pouze u koček, a to u domestikovaných i divokých koček. Kočky vylučují oocysty po požití tachyzoitů, bradyzoitů nebo sporozoitů. Ačkoliv méně než 50% koček vylučuje oocysty po požití tachyzoitů či oocyst, po požití tkáňových cyst vylučují oocysty skoro všechny kočky.

Oocysty v čerstvě vyloučených fekáliích jsou nevysporulované (neinfekční, nezralé), mají kulovitý tvar a poloměr 10 μm x 12 μm . Sporulace probíhá mimo tělo kočky během 1-5 dnů a je závislá na kyslíku v ovzduší a teplotě prostředí. Sporulované oocysty obsahují dvě elipsoidní sporocysty. Každá sporocysta se skládá ze čtyř sporozoitů. Sporozoiti jsou velcí 2 μm x 6-8 μm .

Hostitelé včetně koček mohou získat *T. gondii* požitím tkání infikovaných zvířat nebo jídla či vody kontaminovaných zralými oocystami, popř. transplacentárním přenosem. Po požití bradyzoitů uvolněných z tkáňových cyst nebo sporozoitů z oocyst, prostupují střevní stěnou, transformují se do stadia tachyzoitů, lokálně se množí a šíří se krevní cestou nebo lymfou do různých tkání a orgánů. Po několika cyklech dělení, se tachyzoiti přeměňují na bradyzoity v různých tkáních. Infekce *T. gondii* během těhotenství může vyústit v kongenitální toxoplazmózu plodu.

Životní cyklus oocyst přenášejících infekci byl studován na myších. Po požití sporulujících oocyst, sporozoiti excystují, penetrují enterocyty a pohárkové buňky v intestinálním epitelu a jsou přeneseni do lamina propria neznámým mechanismem. Některé sporozoity mohou být nalezeny v lamina propria, kde se množí v různých buňkách včetně vaskulárního endotelu, fibroblastů, mononukleárních buněk a segmentovaných leukocytů, ale nenachází se v erytrocytech. Edémy, nekrózy lamina propria a odlupování střevní sliznice může způsobit enteritidu. Infekce je případně rozvlečena do dalších orgánů (8).

3.4.4. Vztah hostitel versus parazit

T. gondii se může množit v buňkách většiny savců. Jak poškozuje buňky imunitního systému není zatím zcela známo. Všechny extracelulární formy parazita jsou přímo ovlivňovány protilátkami, ale intracelulární formy nikoliv. Buněčné faktory včetně lymfocytů a lymfokinů jsou důležitější než humorální faktory při imunitou zprostředkované destrukci *T. gondii*.

Imunita nedokáže eliminovat již vzniklou infekci. Tkáňové cysty *T. gondii* perzistují po akutní infekci minimálně po dobu několika let. Konečný osud tkáňových cyst není plně znám. Některé mohou prasknout během života v hostiteli a uvolněné bradyzoity jsou zničeny imunitní odpovědí hostitele. U

imunosuprimovaných jedinců může být infekce reaktivována diseminováním bradyzoitů a opětnou přeměnou v tachyzoity.

Patogenita *T. gondii* je ovlivňována mnoha faktory včetně vnímavosti hostitelského druhu, virulencí parazita a infekčního stádia. Oocysty zprostředkované infekce jsou klinicky nejzávažnější u mezipostitele a nejsou většinou závislé na množství oocyst v infekční dávce.

T. gondii se také adaptovala do oocysto-orálního cyklu u býložravců (mezipostitelé) a do tkáňové cysty-orálního cyklu u masožravců (bradyzoiti-tachyzoiti- a opět bradyzoiti), speciálně koček. Oocysty *T. gondii* jsou méně infekční a méně patogenní pro kočky než pro krysy a myši. Například: jedna živá oocysta je orálně infekční pro myši a prasata, navzdory tomu 100 a více oocyst může být minimálně nutné ke vzniku infekce u koček. Opačně je to u bradyzoitů, kteří jsou méně infekční pro myši než pro kočky. Kočky mohou vylučovat milióny oocyst po požití několika málo bradyzoitů, navzdory tomu 100 bradyzoitů nemusí být orální cestou infekční pro myši. *T. gondii* může být orálně přenášena požitím tkáňových cyst, epidemiologické studie potvrzují, že kočky jsou nezbytné pro stálý životní cyklus *T. gondii*, která je vzácná nebo chybí v oblastech, kde se kočky nenacházejí.

3.5. Patogeneze a patologie

3.5.1. Patogeneze

Velikost inokula, virulence organismu, genetická výbava, pohlaví a imunologický stav ovlivňují průběh infekce u modelů lidské a zvířecí toxoplazmózy. Jestliže je parazit pozřen, aktivně osidluje epiteliální buňky střeva nebo je jimi fagocytován. Intracelulárně, *T. gondii* indukuje tvorbu parazitární vakuoly, která obsahuje sekretované parazitární proteiny a vylučované proteiny hostitele, které normálně podporují fagozomální dozrávání.

Molekulární charakteristiky a několik proteinů z různých parazitárních organel zahrnujících rovněž denzní granula a imunodominantní povrchový antigen parazita SAG1, patří mezi nejnadějnější kandidáty na případnou výrobu vakcíny.

Infekce *T. gondii* způsobuje u silných a perzistujících T-pomocných buněk 1 (T-helper cells, T-h1) odpověď ve formě produkce protiinfekčních cytokinů zahrnujících interleukin 12, interferon gama a tumor-nekrotizující faktor alfa. Kombinovaná akce těchto cytokinů a ostatních imunologických mechanismů chrání hostitele proti replikaci tachyzoitů a před pozdějšími patologickými změnami. Po invazi enterocytů, *T. gondii* infikuje antigen-prezentující buňky v intestinální lamina propria a indukuje přechodnou lokální Th-1 odpověď.

Dendritické buňky s jejich schopností produkovat interleukin-12, jsou hlavním aktivátorem Th-1 imunitní odpovědi po infekci myši *T. gondii*. Granulocyty mohou také přispět k brzké produkci interleukinu-12. Aktivované makrofágy inhibují nebo zabíjejí intracelulární *T. gondii*. Parazit může částečně působit proti tomuto obrannému mechanismu v časných stádiích infekce. *T. gondii* může využít antigen-prezentující buňky jako takzvané Trojské koně ke snížení regulace povrchových molekul buněk a k interferenci s apoptotickými ději. Senzibilizované CD4+ a CD8+ T-lymfocyty jsou cytotoxické pro buňku infikovanou *T. gondii*. Infekční (interferon gama, tumor-nekrotizující faktor alfa) a deregulující (interleukin 10, transformující růstový faktor beta) cytokiny indukují odpověď na přítomnost parazita. Poměr gama a delta T-buněk se zvětšuje během akutní infekce. Protilátky IgG, IgM, IgA, IgE proti *T. gondii* proteinům mohou být detekovány již během dvou týdnů po infekci. Produkce IgA protilátek na mukózním povrchu chrání hostitele proti reinfekci. Reinfekce může nastávat zřídka u imunokompromitovaných jedinců, kmenů s vyšší virulencí atd. (15).

3.5.2. Patologie

Histopatologické změny u toxoplazmové lymfadenitidy u imunokompetentních jedinců jsou zřetelné, někdy diagnosticky směrodatné. Nacházíme folikulární hyperplasii, nepravidelné shluky epiteloidních histiocytů, které zasahují a rozmazávají okraje germinálních center a fokální rozpínání sinusů s monocytoidními buňkami. Langhansovy obrovské buňky, granulomy, mikroabscesy, ohniska nekrózy s parazity (nebo jejich DNA) nelze zřetelně vidět či detekovat. Oční infekce u imunokompetentních pacientů vytváří akutní chorioretinitidu charakterizovanou vážným zánětem a nekrózou. Granulomatózní zánět choroidy je sekundární infekcí z nekrotizující retiny.

Tachyzoiti a cysty mohou být vzácně nalezeny v retině. Patogeneze opakujících se choroidoretinitid je diskutabilní. Prasknutí cyst může uvolnit živé organismy, které indukují nekrózu a zánět; střídavě, chorioretinitis může být následkem hypersenzitivní reakce spouštěné neznámou příčinou.

Biopticky prokázaná toxoplazmová myokarditida a polymyositida byla prokázaná u jiných imunokompetentních jedinců a pacientů léčených kortikosteroidy.

Poškození CNS *T. gondii* je charakterizováno jako mnoho ohnisek zvětšující se nekrózy a mikrogliových uzlů (mozková toxoplazmóza). U dětí jsou zřetelné vaskulitida a nekróza. Nekrotické části mohou kalcifikovat a vést k nápadným ultrazvukovým nálezům naznačujícím nemoc. Hydrocefalus je výsledkem uzavření Sylviova mokovodu nebo Monroova otvoru. Tachyzoity a cysty v nich přiléhají blízko k nekrotickým ohniskům nebo jsou v gliových nodulách, perivaskulárních oblastech a cerebrální tkáni neobsahující zánětlivé změny. Přítomnost mnoha mozkových abscesů je nejcharakterističtější znak toxoplazmové encefalidity u některých imunodeficientních pacientů a zvláště charakteristické jsou u lidí s AIDS. Identifikace tachyzoitů je signifikantní u aktivní infekce. U pitvy pacientů s AIDS a toxoplazmovou encefalidou, je většinou univerzální poškození mozkových hemisfér. U případů kongenitální toxoplazmózy, mozkové nekrózy jsou nejvíce intenzivní v kůře, bazálních gangliích a v oblasti komor. Plicní toxoplazmóza u imunodeficientních pacientů může vyústit v intersticiální pneumonitidu, nekrotickou pneumonii, zánět pleury.

Metodou PCR může být DNA *T. gondii* nalezena v amniotické tekutině, v likvoru, bronchoalveolární laváži, oční, pleurální nebo výpotkové tekutině a v periferní krvi nebo vyjimečně moči (16).

3.6. Klinické projevy

Klinicky může být infekce *T. gondii* inaparetní nebo se manifestuje typickými či méně typickými symptomy, které závisí na imunitním stavu pacienta. Zaměříme se na klinické příznaky: u imunokompetentních jedinců, u pacientů s očním onemocněním, u imunokompromitovaných pacientů nebo u dětí s kongenitální toxoplazmózou.

3.6.1. Klinické projevy u zvířat

U mnoha druhů zvířat způsobuje *T. gondii* závažné onemocnění. Patří sem například závažné poškození embrya, jeho odúmrtí a resorpce, smrt plodu, zastavení růstu, potrat, neonatální smrt u koz, ovcí, dalších hospodářských zvířat apod. Vypuknutí toxoplazmózy u prasat způsobuje vyšší mortalitu mladých prasat než u dospělých jedinců. Sporadicky a volně se vyskytuje vzplanutí toxoplazmózy u králíků, norků, ptáků a jiných domestikovaných a divokých zvířat. Toxoplazmóza způsobuje závažné, často fatální onemocnění u australských vačnatců, opic, výstavních šlechtěných koček a kanárů. Fatální toxoplazmózou mohou onemocnět psi, kteří jsou imunosuprimováni po předchozím virovém onemocnění (např. parvovirózou).

3.6.2. Imunokompetentní dospělí a děti

Primární infekce *T. gondii* u dětí a dospělých (včetně těhotných žen) jsou asymptomatické u většiny pacientů. V 10% případů lze pozorovat limitované a nespecifické onemocnění, které zřídka potřebuje léčbu. Nejtypičtějším klinickým příznakem je izolovaná krční a okcipitální lymfadenopatie. Lymfatické uzliny jsou drobné i více zvětšené, netvoří hnis, obvykle jsou jednotlivé a zůstávají zvětšené po 4-6 týdnů. Forma nemoci charakterizovaná chronickou lymfadenopatií je typická zvětšenými lymfatickými uzlíky, které mohou po měsíce kolísat (16). V mízních uzlinách nastává změna proliferace eozinofilních epitelových buněk retikula a hyperplazie folikulů (10).

Někdy se objevuje horečka, únava, nevolnost, bolesti hlavy a svalů, bolesti v krku, splenomegalie a hepatomegalie, což připomíná symptomy infekční mononukleózy. Méně často vzniká u ostatních zdravých jedinců: myokarditida, polymyozitida, pneumonitida, hepatitida nebo encefalitida. Akutní infekce toxoplazmózou během těhotenství je asymptomatická u většiny žen (16).

3.6.3. Oční toxoplazmóza

Toxoplasma gondii proniká do oka hematogenním přenosem jako volné tachyzoity nebo jako tachyzoity přetrvávající v cirkulujících leukocytech dočasně zastavených v kapilárním řečišti sítnice. Tachyzoity se uvolňují, když infikované buňky lyzují a mohou potom invadovat přiléhající retinu. Histopatologické vyšetření oka od pacienta, který měl vyvinutou

toxoplazmovou retinohoroiditidu během, které byl léčen vysokými dávkami kortikosteroidů, prokázalo nekrózu i parazity lokalizované v přiléhajícím krevním řečišti. Oční postižení je častější u novorozenců s kongenitální toxoplazmózou než u imunokompetentních pacientů, kteří získali infekci později.

Studie 12 plodů potracených během 18 až 32 týdne těhotenství pro vážnou kongenitální toxoplazmózu s hydrocefalem, odhaluje extenzivní oční poškození u 9 z těchto plodů. To naznačuje, že infekce *T. gondii* je přenášena do oka z mozku podél optického nervu. U menšiny pacientů s oční toxoplazmózou byla nalezena oční neuritida, a paraziti byli identifikováni vedle optického nervu u pacientů s AIDS a pacientů s fulminantní kongenitální infekcí.

Optická neuritida může být získána plodem, vyskytuje se u časných případů kongenitální infekce. Ve studii 9 očí od plodů z druhého trimestru, byly identifikovány tři případy s optickou neuritidou a v jednom případě bylo nalezeno peripapilární poškození (22).

Formování tkáňových cyst v oku probíhá tak jako v jiných částech těla a za určitých okolností je možná reaktivace, což je důležitý aspekt patogeneze toxoplazmové retinohoroiditidy (22). Oční forma toxoplazmózy se nejčastěji projevuje fokální nekrotizující retinitidou (23). Toxoplazmová chorioretinitida se vyskytuje jako kongenitálně nebo postnatálně získaná nemoc, která je výsledkem akutní infekce nebo reaktivace (16). Chorioretinitis u jedinců s akutní získanou toxoplazmózou vzniká sporadicky nebo v kontextu se vzplanutím akutní nemoci.

Děti s vrozenou kongenitální toxoplazmózou trpí extenzivním onemocněním retiny. Při systematickém serologickém screeningu v Massachusetts, USA, 20% asymptomatických kongenitálně infikovaných dětí mělo při narození oční poškození. U dětí neléčených po porodu, se během dospělosti míra očního zasažení zvyšuje na 82%.

Reaktivace chronické infekce *T. gondii* a následující onemocnění je společné pro kongenitálně infikované jedince, ačkoli příčina nebyla určena. Kromě toho, reaktivace nemoci a poškození retiny se vyskytuje u lidí s non-kongenitálně získanou infekcí a u některých případů asociovaných s redukcí imunity. Akutní oční toxoplazmóza sestává z definovaných ložisek

koagulované nekrózy retiny. Vedle toho se zde nachází difúzní zánět retiny a choroidy. U pacientů s AIDS, je zde jednotlivé nebo multifokální poškození nebo také difúzní nekróza retiny se zánětem a velkým počtem parazitů.

Poškození se hojí jizvami. Hranice jizev jsou velmi často hyperpigmentované, jako výsledek roztržení epitelu sítnicového pigmentu. Tkáňové cysty jsou prezentovány na okrajích jizev. Příležitostně jsou cysty identifikovány vzdáleně od jizev, ležící u nepoškozené retiny bez asociace se zánětem. Tkáňové cysty jsou nejčastěji nacházeny ve vnitřních vrstvách retiny. Charakteristické klinické a patologické nálezy retiny se vyskytují u kongenitální infekce, u pacientů s AIDS a u akutně získané infekce (22).

Vzhledem k velké afinitě toxoplazmy k nervové tkáni začínají léze v povrchových vrstvách sítnice a až později postupují na choroideu. Sítnice je v postiženém místě po čas akutního stádia onemocnění prosáknutá, žlutobělavá, ložisko je buď oddělené nebo jsou při starém atrofickém ložisku přítomná menší satelitní ložiska. Může být doprovázená výraznou exudativní reakcí ve sklivci začínající nad zánětlivým ložiskem sítnice a onemocnění může progredovat až k vzniku trakčních pruhů, které mohou vést k odloupení sítnice. Zároveň, v menším počtu případů, se může vyskytovat i přední uveitida. Všeobecná oční symptomatologie při kongenitální toxoplazmóze tvoří:

- mikroftalmus
- katarakta
- chorioretinitida
- panuveitida
- atrofie zřakového nervu

3.6.3.1. Oftalmologický nález

Na různých očních strukturách může být následovný:

Přední oční komora - bez příznaků

- negranulomatózní nebo granulomatózní iridocyklitida

Sklivec - exudativní reakce způsobující pokles zrakové ostrosti až překážku vizualizace očního pozadí

Oční pozadí - fokální nekrotizující retinitida: solitární nebo multifokální léze od 1/10 PD do 5 PD (papilární diametr), bíložluté zbarvení léze, okolní reakce sklivce a pigmentového listu

- hluboká retinitida – žlutší a ohraničenější bez reakce sklivce
- retinitis punctata – multifokální šedobělavé léze s malou anebo žádnou reakcí sklivce
- masivní granulom – větší jak 6 PD, ostře ohraničený, amorfní centrum, výrazná reakce sklivce

Papilitida – vyskytuje se zřídka a má následující obrazy:

- retinitida lokalizovaná juxtapapilárně
- bílá hmota nasedající na terč zrakového nervu s reakcí sklivce
- postihuje i makulopapilární svazek
- relativně dobrý visus

Komplikace po dobu průběhu onemocnění mohou být způsobené:

- virulencí parazita
- imunitním systémem
- užíváním antimikrobiálních preparátů

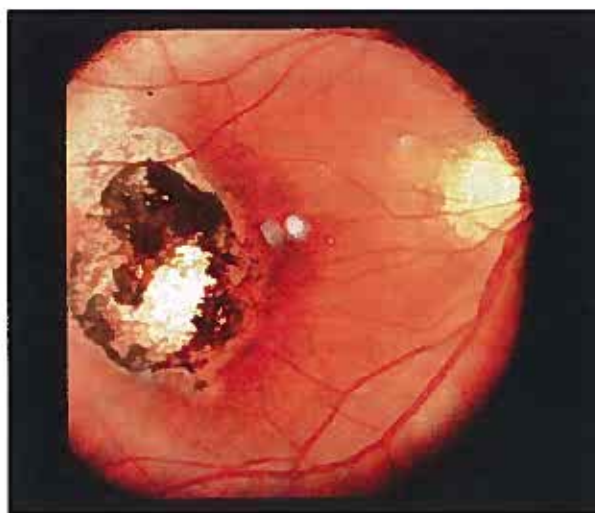
Proces hojení u zdravých jedinců nastává po 1-4 měsících ostře ohraničenou atrofickou jizvou s hyperpigmentací okolí, postupně se projasňuje anebo kondenzuje sklivec, odezní přední uveitida. U imunosuprimovaných pacientů nebo při léčbě pouze steroidy je průběh onemocnění fulminantní.

Při recidivující formě onemocnění dochází mezi 10. až 35. rokem života k uvolnění velkého množství parazitů z cyst a k opakovanému zánětlivému procesu a destrukci sítnice.

Příčiny poklesu zrakové ostrosti u pacientů mohou být:

- a) přímé
 - destrukce sítnice
 - destrukce makulopapilárního svazku
 - atrofie zrakového nervu
- b) nepřímé
 - cystoidní makulární edém
 - subretinální neovaskularizace
 - retinální neovaskularizace spojující sekundární hemoragii sklivce
 - trakční amócie (odchlípnutí) sítnice
 - rhematogenní amócie sítnice (23)

Klasický výskyt „čelního světla ve mlze“ je přičítán přítomnosti aktivního poškození retiny se závažnou zánětlivou reakcí (16).



Obr. 2. Jizvení chorioretiny.

3.6.4. Imunokompromitovaní pacienti s nebo bez AIDS

V kontrastu s příznivým průběhem toxoplazmózy u skoro většiny imunokompetentních jedinců, může být onemocnění život ohrožující u imunokompromitovaných pacientů. U těchto osob, se toxoplazmóza skoro vždy objeví jako výsledek reaktivace chronického stavu.

Infekcí typicky zasáhnutou tkání je CNS. Klinické projevy toxoplazmové encefalitidy se různí od subakutního stupňujícího se procesu, který se vyvíjí týdny až po akutní stadium s nebo bez fokálních neurologických deficitů, které se vyvíjí rychleji. Pro jedince s imunitní dysfunkcí je příznačná fokální encefalitida nebo mozkový absces obvykle lokalizovaný na hranici bílé hmoty a kůry, a v bazálních gangliích, hypofýze nebo mozkovém kmeni (10). Klinické manifestace se skládají ze změn mentálního stavu, úbytku motorických funkcí, porušení kranálních nervů, sensorických abnormalit, mozečkových znaků, porušení chůze a z neuropsychiatrických postižení. Meningeální příznaky jsou nalezeny zřídka. Mohou se objevit přirozené symptomy jako horečka a malátnost. Nejtypičtější z ložiskových neurologických nálezů jsou hemiparézy a abnormality mluvení. Diferenciální diagnostika poškození u toxoplazmové encefalitidy zahrnuje CNS lymfom, progresivní multifokální leukoencefalopatii, cytomegalovirovou ventrikulitidu a encefalitidu, fokální poškození způsobené jinými mikroorganismy jako *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus spp*, *Mycobacterium tuberculosis* a *Nocardia spp* nebo bakteriální mozkové abscesy. Toxoplazmóza se u imunokompromitovaných pacientů může

prezentovat jako chorioretinitis, pneumonitis a jako multiorgánové zasažení s příznaky akutního respiračního selhání a hemodynamické abnormality podobné septickému šoku. Toxoplazmová pneumonie je častější u příjemců kostní dřeně při transplantaci a u pacientů s AIDS (16).

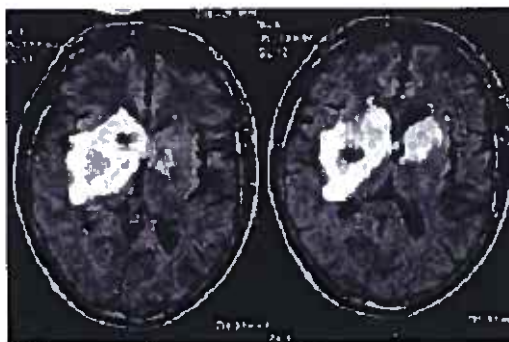
3.6.5. Kongenitální toxoplazmóza

Humánní infekce prvokem *T. gondii* jsou velmi časté (infikováno je asi 50% světové populace), ale obvykle neškodné s výjimkou lidského plodu, který může být silně poškozen následkem primoinfekce matky v graviditě. Onemocnění navíc probíhá asymptomaticky u 9 z 10 infikovaných, takže klinické symptomy jsou slabým indikátorem probíhající infekce. Proto je nezbytné organizovat pravidelné vyšetření u asymptomatických gravidních žen v rámci všeobecné prevence v těhotenství. Akutní toxoplazmóza v těhotenství se vyskytuje od 0,2 do 1%. Počet dětí narozených každoročně s kongenitální toxoplazmovou infekcí převyšuje obecně kombinovaný počet dětí s vrozenou rubeolou, syfilisem a infekcí *Herpes simplex*. Incidence kongenitální toxoplazmové infekce v Evropě je uváděna od 0,1 do 7 na 1000 živých porodů. Toto číslo jenom podtrhuje význam této nákazy a odpovědnost lékařů majících na starosti ženy v reprodukčním věku. Interhumánní přenos (vrozená nákaza) z gravidní ženy na její nenarozený plod se uskutečňuje během akutního stádia infekce matky. Vzácně může dojít ke kongenitálnímu přenosu i při reaktivaci latentního (chronického) onemocnění, pokud byla matka výrazně imunosuprimována nebo léčena během získané nákazy *T. gondii*. Rozhodující pro stanovení incidence kongenitální toxoplazmózy je zjištění prevalence antitoxoplazmických protilátek u normální, děti rodičí populace. Ty ženy, které jsou seropozitivní před otěhotněním, jsou v podstatě imunologicky chráněny před primární infekcí a možným přenosem infekce na jejich nenarozené děti. Naopak ženy seronegativní jsou v riziku infekce během těhotenství. Objem tohoto rizika se mění s expozicí žen rizikovým faktorům a jejich geografickému usídlení.

Frekvence, se kterou prochází kongenitální infekce placentární bariérou, závisí na řadě dalších faktorů, jako je virulence kmenů parazita, velikost infekčního inokula, imunitní odezva infikované ženy a doba, kdy byla matka v průběhu gravidity infikována. Fetální infekce se nevyskytuje jen tehdy, když

začátek infekce matky předchází v dostatečně dlouhém intervalu koncepci. U infikovaných žen, které nebyly v průběhu gravidity léčeny, končilo 6% gravidit potratem a 55% skončilo porodem infikovaného dítěte. Čím je infekce matky v těhotenství časnější, tím se snižuje pravděpodobnost infekce dítěte. U žen infikovaných v prvním trimestru, které nebyly léčeny, je riziko fetální infekce 25%, ve druhém trimestru 54% a ve třetím trimestru 65%. Infikované děti narozené matkám, které získaly infekci v 1. trimestru, jsou nejčastěji těžce poškozeny a mnohé umírají v prvním týdnu, nebo měsíci života.

Děti, které se narodily matkám po nákaze získané ve 3. trimestru jsou často u porodu normální, ale po několika měsících nebo letech se u 75-95% z nich vyvine jeden nebo více pozdních následků kongenitální infekce, jako je chorioretinitida, strabismus, mentální nebo psychomotorické retardace a další. U většiny imunokompetentních těhotných žen, které přišly do styku s *T. gondii*, probíhají infekce inaparentně a nejčastěji rozpoznáným klinickým nálezem je lymfadenopatie, která se manifestuje průměrně u 10-20% infikovaných těhotných pacientek. Proto u všech gravidních s lymfadenitidou by mělo být okamžitě provedeno příslušné sérologické vyšetření na vyloučení akutní formy toxoplazmové nákazy. Obecně se uvádí, že aktuálně bývá infikován pouze jeden na deset abortovaných plodů (18).



Obr. 3. Intrakraniální kalcifikace.

Orgánové změny při kongenitální toxoplazmóze jsou nejzřetelněji patrné v mozku a míše. Tkáňová reakce je charakterizována perivaskulárními infiltráty a dilatací cév. V centru postižené zóny se nachází nekróza s četnými parazity v okolí. Nekrózy jsou vesměs mikroskopické, ale mohou dosahovat průměru 2-3 mm a někdy splývají. V mozkové tkáni vznikají encefalomalatická ložiska, v nichž se vytvářejí miliární granulomy s amorfni nekrozou v centru. Starší ložiska podléhají zvápenatění (10).

Plody s kongenitální toxoplazmózou obvykle mají normální prenatální vyšetření ultrazvukem. Jestliže jsou přítomny ultrasonografické znaky naznačující kongenitální onemocnění nalézáme: intrakraniální kalcifikaci, ventrikulární dilataci, zvětšení jater, ascites a zvětšující se placentární tloušťku. Klinické manifestace kongenitální toxoplazmózy u novorozenců mají hodně variant: hydrocefalus, mikroftalmus, intrakraniální kalcifikace, chorioretinitis, strabismus, slepota, epilepsie, psychomotorické a mentální retardace, petechie způsobené trombocytopenií a anémie. Klasická Sabinova triáda chorioretinitis, hydrocefalus a cerebrální kalcifikace, (spolu s křečemi tetráda). Žádný z popisovaných znaků u novorozenců s kongenitálním onemocněním není patognomický pro toxoplazmózu a může být napodoben kongenitální infekcí způsobenou jiným patogenem jako je cytomegalovirus, herpes simplex virus, rubeola, syfilis (16).



Obr. 4. Hydrocefalus a mikroftalmie u kongenitální toxoplazmózy.

3.7. Laboratorní diagnostika

Diagnostika toxoplazmózy je založena na serologickém vyšetření, histologickém vyšetření lymfatických uzlin, placenty a přímém průkazu trofozoitů ve tkáních nebo izolaci *T. gondii*. Nejčastěji se používají nepřímé diagnostické metody na průkaz antitoxoplazmových protilátek v séru. Mezi základní serologické reakce patří komplement-fixační reakce (KFR), nepřímá imunofluorescence (NIFT). Pro přesnější určení fáze onemocnění se užívá doplňující vyšetření imunoenzymatickými metodami (EIA). V minulosti se používala také imuno elektroforéza v agaru (MPA), nepřímá hemaglutinace a neutralizační test in vitro (Sabin-Feldmanova reakce – práce se živými kmeny

T. gondii). V posledním desetiletí je intenzivně vyvíjena a zaváděna do rutinní diagnostiky metoda PCR k průkazu DNA *T. gondii*, která má v optimálním případě citlivost méně než 1-10 tachyzoitů v 1 ml krve nebo jiné tělesné tekutině či tkáni. Další metodou je pokus na vnímavém zvířeti, který se pro svou časovou náročnost využívá již pouze pro experimentální účely.

3.7.1. Sérologické metody

3.7.1.1. Komplement-fixační reakce

Tímto základním vyšetřením se zjišťuje, zda je pacient infikován *Toxoplasma gondii* a je-li pravděpodobné, že se nachází v akutním stádiu infekce. V České republice je pro stanovení celkových protilátek nejpoužívanější metodou komplement-fixační reakce (KFR), případně nepřímá imunofluorescence (NIFR). Antigen pro KFR, dodávaný firmou SEVAFARMA (dříve SEVAC), je připravován tweenetherovou extrakcí tachyzoitů *T. gondii*. Výsledky KFR a NIFR jsou dobře reprodukovatelné a nejsou zatíženy výkyvy. Negativní KFR nám pomůže vyloučit nespecifické positivity, které se občas objevují při imunoenzymatickém stanovení IgM či IgA. Při opakovaném vyšetřování pacientů KFR je dobře zřetelná dynamika protilátek. Změny titrů KFR během onemocnění jsou charakteristické a jsou ve shodě s dynamikou IgM a IgG při toxoplazmóze. Výsledek jediného vyšetření nám tak poskytuje poměrně dobrou představu, je-li pacient toxoplazmou vůbec infikován a v jakém stádiu nákazy se pravděpodobně nachází. KFR i NIFR jsou v České republice prověřeny dlouholetým užíváním. Tyto metody také umožňují porovnání starších výsledků s novými.

Princip metody: specifická protilátka v séru vytváří s antigenem komplex (antigen-protilátka), na nějž se naváže komplement. Komplement je indikátorem vzniku komplexu a je to systém plazmatických bílkovin, které se aktivují komplexem antigen-protilátka. Aktivace probíhá kaskádovitě, tzn. že první složka se po kontaktu s komplexem antigen-protilátka mění v enzymaticky aktivní bílkovinu, ta mění složku druhou opět v aktivní enzym atd., až poslední složky kaskády získají schopnost (kromě jiného) lyzovat vhodné buňky, např. bakterie nebo erytrocyty. Pro zviditelnění reakce se přidává hemolytický systém, což jsou ovčí erytrocyty potažené protilátkou,

kteřou proti nim vytvořil králík (starší dosud užívaný název této protilátky je amboceptor).

V případě, že je celý komplement vyvážen na hledanou protilátku (v komplexu s antigenem), nedojde k hemolýze hemolytického systému (zábrana hemolýzy). Nežůstal volný komplement, který by lyzoval hemolytický systém, ten zůstal neovlivněn: test je pozitivní.

V případě, že ve vyšetřovaném séru specifické protilátky nejsou, komplement se naváže na hemolytický systém a dojde k viditelné hemolýze. Hemolýza se projeví projasněním erytrocytů: test je negativní.

Metoda je citlivá, ale náročná na práci – před vlastním vyšetřením se titruje komplement i hemolytický systém, testovací sérum musí být zbaveno vlastního komplementu (inaktivace séra = zahřátí na 56 °C po dobu 30 minut).

Reakce vazby komplementu byla v první polovině minulého století nejcitlivější serologickou metodou díky tomu, že komplement a hemolytický systém představují citlivý indikátor vzniku komplexu antigen-protilátka (5).

3.7.1.2. Stanovení titru protilátek

Tato doplňující, velmi významná vyšetření pro určení specifických protilátek, se provádí zpravidla imunoenzymatickými metodami, které jsou nezbytné pro přesnější určení fáze infekce.

Protilátky IgM jsou markerem akutní infekce, neboť zpravidla vymizí do 9 až 12 měsíců po nákaze; u některých pacientů však mohou v nízkých hladinách přetrvávat mnohem déle.

Přítomnost protilátek IgA je důležitým potvrzením akutní infekce, neboť IgA zpravidla vymizí dříve než IgM (za 6-9 měsíců). Sérum, které obsahuje IgA, nikoli však IgM, by mělo být spíše výjimkou, pokud ovšem nejsou používané testy na IgA méně citlivé. Stanovení IgA je naprosto nezbytné ve sporných případech, kdy IgM neposkytuje jednoznačnou informaci, u gravidních žen se zvýšenými hladinami protilátek a u novorozenců.

Pozitivita specifických protilátek IgE nepřetrvává déle než 6 měsíců.

Antitoxoplazmové protilátky tříd IgM, IgA a IgE stanovujeme nejčastěji metodami double-sandwich (capture) EIA, automatizovanými postupy (různé modifikace EIA metod) založenými na obdobném principu, nebo metodou ISAGA.

Protilátky izotypu IgG, jsou-li přítomny ve vysokých hladinách, svědčí spíše pro odeznívající než akutní infekci. I nízké hladiny IgG znamenají, že vyšetřovaná osoba má patrně vytvořenou nesterilní imunitu a že je ve většině případů chráněna proti další infekci *T. gondii*. Protilátky třídy IgG můžeme stanovit přímou metodou EIA nebo obdobnými automatizovanými modifikacemi, metodou ISAGA (immunosorbent agglutination assay) nebo nepřímou fluorescencí IgG.

V posledních letech se stále častěji využívá ke stanovení fáze toxoplazmózy i stanovení avidity protilátek IgG. Protilátky, které se vytvoří v prvních týdnech infekce, se k antigenu vážou méně pevně. V průběhu onemocnění avidita narůstá. Aviditu stanovujeme modifikovanou technikou EIA, při které zjišťujeme, do jaké míry naruší vazbu antigenu a protilátky činidlo denaturující proteiny (11).

Principem imunoenzymatických metod je značení antigenů nebo častěji protilátek enzymem. Pokud vznikne komplex antigen-protilátka, stává se jeho součástí i enzym. Zatímco identifikace nepatrných kvant komplexů antigen-protilátka je obtížná, identifikace enzymu je snadná. Využívají se totiž dostupné a odolné enzymy (křenová peroxidáza), které katalyzují vhodnou barevnou reakci, zpravidla mění bezbarvý substrát na výrazně barevný produkt. Přitom jedna molekula enzymu může změnit nesčetné množství molekul substrátu, takže detekce komplexu je velmi citlivá. Lze stanovit látky v nano- i pikogramových množstvích.

ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) je vícestupňová imunoenzymová metoda. Při těchto reakcích je jedna ze složek reakce fixována na nosič, tj. dno zkumavky nebo jamky mikrotitrační destičky. Adsorpcí protilátky nebo antigenu na reakční nádobu vzniká tzv. imunosorbent, což je systém umožňující zachytit velmi specificky antigen pomocí protilátky a naopak a tím jej izolovat od ostatních složek vzorku (5).

Princip testu: na vnitřní povrch jamek mikrotitrační destičky jsou navázány zvířecí protilátky proti lidskému imunoglobulinu (IgA, IgM, IgE). Po aplikaci vzorků a kontrol dochází k vazbě Ig protilátek, včetně specifických anti-toxoplazmových (pokud jsou přítomny). Navázané zbytky vzorků se vymyjí. Při druhé inkubaci s tracerem (antigen *T. gondii* + monoklonální protilátka proti povrchovému proteinu p30 *T. gondii*, značená křenovou peroxidázou) se na

specifické Ig protilátky (ze vzorku) naváže antigen spolu s anti-toxoplazmovou protilátkou značenou křenovou peroxidázou (konjugát). Po odstranění nenavázaného traceru odsátím a promytím se detekuje peroxidázová aktivita aplikací substrátu. Pozitivita se projevuje modrým zbarvením, které se zastavovacím roztokem změni na žluté, jehož intenzita se měří na fotometru při vlnové délce 450 nm.

Při testování IgG se na vnitřní povrch jamek mikrotitrační destičky naváže antigen *T. gondii*. Po aplikaci vzorků a kontrol dochází k vazbě specifických IgG protilátek na antigen. Nenavázané zbytky vzorků se vymyjí. Při druhé inkubaci se na specifické IgG protilátky (ze vzorku) naváže značená zvířecí protilátka proti lidskému IgG konjugovaná křenovou peroxidázou (konjugát). Po odstranění nenavázaného konjugátu odsátím promytím se detekuje peroxidázová aktivita aplikací substrátu. Dále je postup stejný jako u předcházejících Ig.

Obsah anti-toxoplazmových protilátek, přítomných ve vzorku, lze stanovit v mezinárodních jednotkách IU/ml odečtením hodnot z kalibrační křivky.

3.7.1.3. Western Blot

TOXOPLASMA WB IgG/IgM je kvalitativní Immunoblot Assay (WB) pro včasnou diagnostiku kongenitální toxoplazmózy pomocí srovnávacích imunologických profilů (CIP – Comparative Immunological Profile):

- při narození, mezi umbilikální pupečnickovou krví a sérem matky
- postnatálně, mezi sérem novorozence a krví matky.

Tento test není určený pro screening nebo průkazní testování na izolovaném séru.

Toxoplazmóza je jedna z nejčastějších kongenitálních infekcí. Její incidence (1 až 4 ‰ ve Francii, 0.1 až 1 ‰ v USA) se různí dle regionů a zemí. Toxoplazmová nákaza není klinicky rozpoznatelná infekce při narození, většina infikovaných novorozenců je nedetekovatelných rutinními klinickými vyšetřeními a zůstávají neléčeni. V dětství a časně dospělosti se tak mohou vyvinout vážné klinické manifestace jako je chorioretinitida.

Ve Francii, existuje během těhotenství systematický serologický dozor, prenatální diagnostika, systematický serologický plán pro zasažené

novorozence během prvního roku života a chemoprophylaxe redukující četnost a závažnost klinických forem kongenitální toxoplazmózy.

Vedle tohoto programu používají ve Francii, kde je incidence infekce *T.gondii* zvláště vysoká, i jiné přístupy jako je neonatální screening. Infikované děti nevykazující žádné klinické symptomy musí být identifikovány a léčeny co nejdříve je možno.

Při narození, diagnóza kongenitální toxoplazmózy závisí většinou pouze na biologických informacích, interpretace je nesnadná.

- negativní výsledek prenatálního testování nevylučuje možnost infekce
- detekce anti-toxoplazmových IgG v pupečnickové krvi není znakem neonatální infekce, ale dokazuje pasivní přenos mateřských protilátek
- detekce anti-toxoplazmových IgM/IgA může vést k falešně negativním výsledkům v 30 až 40% případech.
- přítomnost anti-toxoplazmových IgM/IgA v pupečnickové krvi není specifické a vyžaduje prokázání protilátek v dětské periferní krvi o 10 dní později, může to být způsobeno přenosem mateřských protilátek.

Vysoce specifický a sensitivní TOXOPLASMA CIP-WB IgG/IgM viditelně zlepšuje interpretaci neonatální sérologické diagnostiky kongenitální toxoplazmózy.

Princip testu: na stripech jsou antigeny *Toxoplasmy gondii* elektroforeticky rozpuštěné do proužků a přeneseny elektro blotem na nitrocelulósovou membránu. Membrána nesoucí antigen je rozřezána na proužky (tzv. stripy). Každý strip je na vrchu u modré čáry očíslovaný a označený. Při srovnávání použijeme sousední strip. Pruhy antigenu na stejné úrovni poskytují snadnou interpretaci testu.

Oba postupy - testování IgG a IgM probíhají paralelně, CIP-WB IgG/IgM se musí provádět v páru séra S1 a S2 (pupečnicková krev versus mateřské sérum, sérum dítěte versus pupečnicková krev při sérologickém sledování, po narození dítěte porovnáváme sérum dítěte a sérum matky).

IgG WB – obě séra jsou odděleně inkubovány s 2 sousedícími stripy membrány. Jsou-li přítomné v séru specifické anti-toxoplazmové protilátky, navážou se na antigeny stripu. První promytí oddělí nevázané sérové komponenty.

Stripy jsou poté inkubovány s alkalickou fosfatázou (anti-human IgG konjugát).

Následuje druhé promytí, celý komplex je poté detekován přidáním substrátu (NBT-nitrotetrazoliová modř), který precipituje jako tmavě modrofialová barva. Vývoj barvy je zastaven promytím stripů destilovanou vodou.

Jestliže jsou přítomné ve vzorcích séra S1 a/nebo S2 specifické IgG anti-toxoplazmové protilátky, objeví se na stripu jako fialově zbarvené pruhy. Při skladování mimo přímé světlo zůstává na usušených stripech barva proužků permanentní po dobu několika let.

IgM WB – princip testu je stejný, ale je použit jiný konjugát. Stripy jsou inkubovány s alkalickou fosfatázou (anti-human IgM konjugát). Jestliže jsou přítomné ve vzorcích séra specifické IgM anti-toxoplazmové protilátky, objeví se na diagnostických stripech fialově zbarvené pruhy.

Odečítání: po usušení, S1 a S2 IgG stripy jsou přeneseny na arch filtračního papíru a přesně srovnány s pomocí modré čáry na jednom konci stripu (stejně se postupuje s S1 a S2 IgM stripy). Srovnáním blotu matky a dítěte v obou třídách protilátek S1/S2 IgG a S1/S2 IgM, a kontrolou s WB předlohou, můžeme rozeznat protilátky získané novorozencem pasivně z krve matky a nově aktivně syntetizované vlastní protilátky novorozence.

3.7.2.Molekulárně biologické metody

3.7.2.1. Polymerázová řetězová reakce

PCR je vysoce účinná technika, kterou se *in vitro* aplikují vybrané sekvence nukleových kyselin a pomocí DNA-polymerázy se kopíruje DNA, tak že se produkt (DNA) hromadí geometrickou řadou. Podmínkou pro aplikaci této metody je znalost nukleotidové sekvence hledané nukleové kyseliny, na jejímž základě se připraví komplementární oligodeoxyribonukleotidy, které se vážou před a za hledanou oblast a slouží jako primery polymerační reakce. Primery se připravují automatickou chemickou syntézou a lze je získat na zakázku od řady výrobců.

DNA-polymeráza je schopná syntetizovat komplementární vlákno podle templátu jednovláknové DNA tak, že přidává k existujícímu úseku vlákna nové

nukleotidy ve směru 5'>3'. Dále je zapotřebí, kromě templátového vlákna a nukleotidtrifosfátů, krátký existující úsek druhého vlákna, tzv. primer, který se může syntetizovat uměle jako oligonukleotid. Pokud známe sekvenci templátového vlákna, můžeme si připravit primer, který bude za vhodných teplotních podmínek tvořit vodíkové můstky a komplementární sekvenci v templátovém vlákně, tedy hybridizovat. V případě primeru ale nehovoříme o hybridizaci, ale o tzv. nasedání primeru. Takto jsme schopni určit DNA-polymeráze, od kterého místa a kterým směrem (od 3'-konce primeru) má začít syntetizovat komplementární vlákno. Jedná se o tzv. extenzi primeru (prodlužování primeru přidáváním dalších nukleotidů na 3'-konci). Podle jednoho templátového vlákna ale tímto způsobem vznikne jen jedna kopie, takže nedojde k žádnému řetězovému hromadění produktu. To je v PCR zajištěno přidáním dvou primerů, které nasedají na komplementární sekvence ve dvou templátových vláknech. Templátová vlákna vznikají denaturací původně dvouvláknové DNA. Primery na tato vlákna nasedají v protisměrné orientaci, takže po opakovaných cyklech denaturace, nasedání primeru a extenze primeru DNA-polymerázou vznikají produkty, které slouží jako templáty pro nový reakční cyklus. Máme-li teoreticky na začátku k dispozici dvě templátová vlákna (jednu dvojevláknovou molekulu), pak vzniknou v prvním cyklu dvě kopie. Pro další cyklus máme k dispozici už čtyři vlákna, podle kterých vzniknou 4 kopie. Celkem 8 templátových vláken slouží v dalším cyklu k syntéze dalších 8 vláken, takže se produkt hromadí geometrickou řadou. Ze 2 vláken získáme po 30 cyklech teoreticky celkem 107 370 000 kopií.

Protože na začátku každého cyklu musíme denaturovat templátovou DNA vysokou teplotou, která ničí normální DNA-polymerázy, musíme při PCR používat tzv. termostabilní polymerázy. Tyto enzymy pocházejí z bakterií, žijících v extrémních podmínkách, např. v hloubce moří poblíž ústí podmořských sopek. Jejich proteinová struktura je evolucí uzpůsobena tak, že odolává po určitou dobu extrémním teplotám kolem 95 °C. Nejčastěji se používá tzv. Taq-polymeráza, nazvaná podle bakterie *Thermus aquaticus*.

Pro každou PCR, která má za cíl amplifikovat konkrétní úsek templátové DNA, je potřeba navrhnout vhodný pár primerů. Při návrhu musíme zajistit, aby oba primery nasedly při stejné teplotě na přesně komplementární sekvenci v templátové DNA – podobně jako sonda musí nasedat pouze na přesně

komplementární sekvenci ve vyšetřované DNA. Kdyby nasedaly nejen na přesně komplementární sekvence, tedy i jinde v templátové DNA, nedošlo by k efektivní amplifikaci zvoleného úseku. Proto musejí mít oba primery shodnou, nebo téměř shodnou teplotu tání. Ta závisí na délce molekuly (delší molekula = více vodíkových můstků = větší energie nutná k denaturaci) a na její sekvenci, přesněji řečeno na poměru G-C párů a A-T párů v sekvenci (mezi G-C jsou tři vodíkové můstky, mezi A-T jen dva, proto čím více G-T párů, tím vyšší teplota tání). Teplotu tání konkrétní sekvence určité sondy lze určit buď výpočtem nebo exponenciálně. Vlastní teplota nasedání primerů musí pak být o něco nižší, než teplota tání. Pokud bychom použili přímo teplotu tání, bylo by nasednutí příliš nestabilní.

Provedení: cyklické změny teplot reakční směsi lze řídit automatizovaně pomocí tzv. termocykleru. Reakční směs je sestavena v tenkostěnné mikrozkušavce.

Výsledek PCR amplifikace lze tzv. detekovat na gelu, tzn. že se vzorek reakční směsi na start agarózového nebo polyakrylamidového gelu a podrobí se elektroforéze. Pokud primery nasedly jen na vybraná protisměrně umístěná místa, vznikly jako produkt reakce, molekuly stejné sekvence a délky, dané vzdáleností míst, na které nasedaly primery. Při dělení v gelu budou všechny tyto molekuly putovat stejnou rychlostí a po obarvení a zobrazení uvidíme jen jeden pruh, jehož molekulová hmotnost odpovídá při srovnání se standardem předpokládané délce molekuly. Pokud není zobrazen žádný pruh, PCR neproběhla, pokud je zobrazeno více pruhů, tak sice PCR proběhla, ale primery nasedly na více místech, které byly shodou okolností také orientovány protisměrně, takže došlo k amplifikaci více produktů. V takovém případě je nutné optimalizovat podmínky reakce.

Množství produktu, vytvořeného amplifikací, závisí na množství templátové DNA, která je přidána do reakce. Reakce probíhá tzv. kvantitativně. Hrubé určení množství produktu je možné posouzením intenzity pruhu, který se objeví po rozdělení výsledku PCR na gelu. Přesné určení tohoto množství je možné pomocí sondy označené fluorescenčním barvivem. Tato sonda musí být navržena tak, aby hybridizovala s templátovou DNA za stejných podmínek jako primery, a to tak, že nasedne na templátovou DNA v místě mezi místy nasednutí obou protisměrně orientovaných primerů. DNA-polymeráza, která

provádí extenzi jednoho ze dvou primerů, narazí při syntéze komplementárního vlákna na nasedlou sondu. Protože DNA-polymeráza má kromě své schopnosti syntetizovat komplementární vlákno také tzv. exonukleázovou aktivitu, odbourá nasedlou sondu. Při odbourání uvolní jednotlivé nukleotidy sondy, z nichž některé jsou označeny fluorescenčním barvivem. Pro tento typ sond se přitom používá fluorescenční barvivo, které není schopné fluorescence, dokud je vázáno ve struktuře sondy. Jakmile se ale uvolní do roztoku, tak schopnost fluorescence získá.

V průběhu PCR tak dochází k uvolňování dalších a dalších molekul fluorescenčního barviva, takže roste fluorescence reakční směsi. Tento nárůst je přímo úměrný množství produktu, který v reakci vzniká. Speciální termocyklery, určené pro kvantitativní PCR v reálném čase, jsou schopny v průběhu PCR ozařovat vzorek excitačním zářením, které vybudí fluorescenci uvolněného barviva. Tuto fluorescenci přístroj při každém cyklu změří a výsledek předá řídicímu softwaru, který zobrazuje průběžně – v reálném čase – množství uvolněné fluorescence, které odpovídá množství vzniklého produktu. Výsledek reakce tak známe často dříve, než proběhnou všechny cykly. Kromě tohoto urychlení a vypuštění zdlouhavé detekce produktu na gelu, je tato technika hlavně vhodná tam, kde potřebujeme znát přesné množství vstupní templátové DNA – zejména u sledování exprese genů pomocí tzv. reverzní transkripce- polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) (2).

3.7.2.2. Histologická diagnóza

Přítomnost tachyzoitů v tkáňových řezech nebo vzorcích tělních tekutin (cerebrospinální tekutina, plodová voda, bronchoalveolární laváž) potvrzuje diagnózu akutní infekce. Je velice obtížné prokázat tachyzoity v obarvených tkáňových řezech. Imunoperoxidázová technika, která užívá antiséra *T. gondii*, se ukázala být senzitivní a specifická: byla úspěšně užita k prokázání přítomnosti parazita v CNS u pacientů s AIDS. Imunoperoxidázová metoda je použitelná pro nefixované nebo formalínem fixované tkáňové řezy zapuštěné do parafínu. Rychlá a technicky jednoduchá je metoda používající vzduchem sušený, Wright-Giemsou obarvený preparát centrifugovaného sedimentu (cytocentrifugy) mozkomíšního moku nebo značené bioptické tkáně. Tkáňové

cysty v blízkosti zánětlivých nekrotických poškození pravděpodobně potvrzují diagnózu akutní infekce.

3.7.2.3. Izolace *Toxoplasma gondii*

Izolace prvoků *T. gondii* z krve nebo tělních tekutin, potvrzuje akutní infekci. Pokusy o izolaci parazita mohou být prováděny inokulací myši či inokulací buněčných kultur lidské nebo zvířecí tkáně (17).

3.8. **Terapie**

3.8.1. **Infekce imunokompetentního hostitele**

Imunokompetentní dospělí a děti s toxoplazmovou lymfadenitidu nejsou ve většině případů léčeni pokud nejsou symptomy závažné nebo trvalé. Léky jsou podávány po dobu 2-4 týdnů po předchozím zvážení stavu pacienta. Kombinace pyrimethaminu, sulfadiazinu a kyseliny listové po 4-6 týdnů je nejtypičtější lékovou kombinací. Infekce získaná při podání krevních produktů a transplantaci orgánů je velice závažná a tito pacienti by měli být vždy léčeni.

3.8.2. **Mateřská a fetální infekce**

V případě potvrzené nebo suspektní toxoplazmózy v těhotenství se například ve Francii začíná s léčbou spiramicinem (Rovamycin), 9 mil. IU denně. Pokud se potvrdí, že plod je skutečně infikován, musí terapie pokračovat bez přerušení až do porodu. Cílem této léčby je minimalizovat možnost přenosu infekce na plod, ne však plod vyléčit. Vysoká koncentrace léku v placentě (až 5 x vyšší než v mateřském séru) podporuje hypotézu, že spiramicin by mohl snížit možnost infikování plodu tím, že omezuje prostupování *T. gondii* placentou.

Hlavní výhodou spiramicinu je naprostá neškodnost pro těhotnou matku a její plod, spiramicin není teratogenní a je obecně velmi dobře tolerován. Při prenatalně diagnostikované fetální toxoplazmóze léčba spočívá v synergickém antiparazitárním působení pyrimethaminu a sulfadiazinu.

Pyrimethamin může způsobit pomalý reverzibilní útlum kostní dřeně, proto je nutné každý týden monitorovat krevní obraz a musí být podávána kyselina listová (perorálně 50 mg každý týden). Pokusy na zvířatech prokázaly teratogenní účinek pyrimethaminu v dávkách 20-30 x vyšších, než je

terapeutická dávka. Avšak celosvětové užívání pyrimethaminu proti malárii téměř po dobu 50 let opravňuje prohlásit, že lidský zárodek není ohrožen teratogenním účinkem při užívání terapeutické dávky.

Sulfadiazin může vyvolat projevy hypersenzitivity (kožní nebo hematologické). V případě, že dojde k této ojedinělé reakci, musí být podávání sulfadiazinu okamžitě a definitivně ukončeno.

Vzhledem k těmto nepříznivým účinkům je kombinace pyrimethaminu a sulfadiazinu podávána pouze v případě fetální infekce potvrzené prenatální diagnostikou.

Léčba spiramicinem by měla být zahájena okamžitě jakmile je diagnostikována akutní toxoplazmóza matky. Odborníci doporučují podání spiramicinu (pro první a začátek druhého trimestru) nebo pyrimethaminu/sulfadiazinu (pro konec druhého trimestru a třetí trimestr) pro ženy s podezřením nebo potvrzením akutní *T. gondii* infekce získané během těhotenství (založeno na ultrazvukovém vyšetření plodu, serologii nebo prenatální diagnostice plodové vody metodou PCR). V případě negativního výsledku PCR, těhotná žena užívá profylakticky spiramicin po dobu 17 týdnů těhotenství a měsíčně se podrobí ultrazvukovému vyšetření plodu až do konce těhotenství.

V USA a ve Francii léčení spiramicinem pokračuje po celé těhotenství. V Rakousku a Německu je spiramicin podáván profylakticky spolu s pyrimethaminem plus sulfadiazinem po dobu 4 týdnů během 17 týdnů gestace; to umožňuje snížení míry klinických následků u plodu. V případě pozitivního PCR výsledku nebo vysoké pravděpodobnosti infekce plodu (získání mateřské infekce na konci druhého nebo ve třetím trimestru), se léčba skládá z pyrimethaminu/sulfadiazinu – v některých zemích je tento režim alternován spiramicinem. Prenatální léčba pyrimethaminem/sulfadiazinem u žen podezřelých nebo s potvrzenou fetální infekcí redukuje následky onemocnění u novorozenců. Antitoxoplazmová terapie pokračuje celé těhotenství.

Pokud se neobjeví abnormality je ultrazvuk prováděn měsíčně až do porodu; přítomnost hydrocefalu je užita jako indikace k potratu.

Ve většině zemí, léčbou plodu následuje léčba novorozence po dobu jednoho roku života. Avšak doba trvání léčby se v evropských zemích velice různí.

3.8.3. Chorioretinitis

Rozhodnutí léčit aktivní toxoplazmovou chorioretinitidu je založeno na výsledcích od oftalmologa. Nízké titry IgG protilátek jsou obvyklé u pacientů s aktivní chorioretinitidou způsobené reaktivací kongenitální *T. gondii* infekce; IgM protilátky nejsou detekovány. Pacienti s chorioretinitidou způsobenou postnatálně získanou infekcí mají obvykle serologické znaky shodné s infekcí získanou v nedávné minulosti. Mnoho oftalmologů zahajuje léčbu po nálezů zánětlivé reakce, retinální poškození v blízkosti jamky makuly sítnice či optického disku, nebo obojí.

U typických případů opakované toxoplazmové chorioretinitidy je kombinace pyrimethaminu, sulfadiazinu a prednisonu nejčastěji využívaný režim léčby. Clindamicin nebo trimetoprim/sulfometoxazol jsou také užívány po minimálně 3 týdny dle klinických výsledků. Následky opakované toxoplazmové chorioretinitidy mohou být redukovány dlouhotrvajícím podáváním trimetoprimu/sulfametoxazolu. V některých případech je detekce abnormálních titrů *T. gondii* specifických protilátek odezvou napadení očních tekutin (Goldman-Witmerův koeficient) a důkaz parazita pomocí PCR metody se používá k úspěšnému stanovení diagnózy.

3.8.4. Infekce imunokompromitovaných hostitelů

3.8.4.1. Toxoplazmová encefalitis, generalizovaná infekce

Transplantační příjemce získává *T. gondii* infekci cestou transplantátu (srdce, plíce, srdce-plíce, ledviny) a je třeba ho testovat stejně jako dárce na toxoplazmové IgG protilátky. Séropozitivní dárce (D+) a séronegativní příjemce (P-) vykazuje nejvyšší riziko onemocnění u těchto pacientů; trimetoprim/sulfometoxazol profylaxe u tohoto uspořádání je vysoce efektivní. U příjemce z D-/P-, D-/P+ nebo D+/P+ páru se zřídka kdy vyvine toxoplazmóza. Serologické výsledky indikující zjevnou reaktivaci (vzrůst IgG a IgM titrů) při absenci klinicky zjevné infekce, a výsledky chronické infekce u

prokázané toxoplazmózy mohou být přítomny nebo se jedná o omyl. Pro imunokompromitované pacienty, u kterých se výskyt toxoplazmózy očekává, jsou doporučovány další diagnostické metody včetně PCR amplifikace *T. gondii* DNA nebo izolace parazita z krve nebo tělních tekutin a histologické zkoumání tkání, které mohou parazity obsahovat.

Antiparazitární léčba zahrnuje všechny symptomatické séropozitivní imunokompromitované pacienty, u kterých se toxoplazmóza očekává. Při poškození mozku, prodloužené míchy nebo obou, je využíváno neurologického vyšetření v podobě CT. Empirické anti-*T. gondii* terapie se využívá u pacientů s četným zvětšujícím se poškozením mozku, s IgG titry protilátek proti *T. gondii* a u pacientů s pokročilou imunodeficiencí.

V léčbě toxoplazmózy u imunokompromitovaných pacientů nemá monoterapie žádnou roli. Nejvyužívanější a nejúspěšnější je léčba kombinací pyrimethaminu/sulfadiazinu a kyseliny listové. Klindamycin je užíván u pacientů nesnášejících sulfonamidy. Terapie po zhodnocení všech znaků a symptomů je doporučována po dobu 4-6 týdnů (někdy po několik měsíců či déle). U pacientů s AIDS je trimetoprim/sulfometoxazol ekvivalentní k pyrimethaminu/sulfadiazinu.

Atovaquone v kombinaci s pyrimethaminem nebo sulfodiazinem má dostatečnou aktivitu, aby byl brán v úvahu pro léčbu akutní toxoplazmové encefalidity.

Léčba toxoplazmózy u imunokompromitovaných pacientů ostatními léčivy jako jsou klaritromycin, azitromycin a dapson nebyla úspěšně zavedena, ale mohou být podány v kombinaci s pyrimethaminem.

U imunokompromitovaných pacientů po léčbě akutní fáze následuje další terapie (sekundární profylaxe) stejným režimem, ale s polovičním dávkováním. Tato léčba může pokračovat po celý život pacienta nebo do skončení imunosuprese. U pacientů s AIDS, primární nebo sekundární profylaxe je obvykle ukončena v době, kdy se počet CD4 vrátí na hodnotu vyšší než 200 buněk na uL. Virová nálož v periferní krvi je kontrolována PCR HIV nejméně po 6 měsících.

4. Materiál a metody

4.1. Laboratorní metody

4.1.1. Komplement-fixační reakce

Biologický materiál: nativní srážlivá krev-krevní sérum, plodová voda.

Laboratorní vybavení: plastové destičky s U jamkami o objemu 0,3 ml, mikropipety o objemu 0,025 ml, osmikanálová automatická mikropipeta o objemu 0,025 – 0,05 ml, vlhká komůrka na inkubaci destiček, laboratorní třepačka, spektrofotometr, stolní centrifuga, skleněné zkumavky.

Reagencie (potřebné k provedení testu): veronalový pufr, beraní krvinky konzervované v Alseverově roztoku, Sevatest Toxoplasma negativní kontrolní sérum, Sevatest Toxoplasma pozitivní kontrolní sérum, Sevatest Toxoplasma antigen KFR, Sevatest Toxoplasma komplement, amboceptor hemolytický (hemolyzin).

Složení:

Toxoplazminový antigen pro komplement fixační reakci – purifikovaný lyofilizovaný extrakt z prvoků *Toxoplasma gondii*, který neobsahuje živé parazity.

Toxoplazminové pozitivní kontrolní sérum – jedná se o lyofilizované lidské sérum, které obsahuje protilátky proti prvoku *Toxoplasma gondii*. Jako protimikrobní konzervační látku obsahuje azid sodný v maximální koncentraci 0,15 %.

Toxoplazminové negativní kontrolní sérum – jedná se o lidské lyofilizované sérum, které neobsahuje protilátky proti prvoku *Toxoplasma gondii*. Též obsahuje jako protimikrobní konzervační látku azid sodný v max. koncentraci 0,15 %.

Toxoplasma komplement – jedná se o lyofilizované morčecí aktivní sérum bez protilátek proti *Toxoplasma gondii*. Protimikrobní konzervační látkou je azid sodný v max. koncentraci 0,15 %.

Příprava reagentů:

Příprava hemolyzinu: do kádinky se pipetuje skleněnou pipetou 99 ml veronalového pufru, rozpustí se AMBOCEPTOR (ampule v 1 ml aqua pro injectione) a po rozpuštění se odsaje a přenesení do kádinky s veronalovým

pufrem. Připravíme 2 malé stojany s čistými, popsanými a zazátkovanými zkumavkami, do kterých skleněnou pipetou hemolyzin po 2 ml nadávkuje. Skladujeme při -20°C .

Příprava morčecího séra: ampuli lyofilizovaného morčecího séra (ALEXIN) rozpustíme v 1 ml aqua pro injectione, do sterilní tlustostěnné zkumavky pipetujeme skleněnou pipetou 14 ml fyziologického roztoku, do něj přeneseme obsah rozpuštěné ampule. Tato zkumavka se inaktivuje 30 minut při 56°C . Nechá se vychladnout při laboratorní teplotě a uloží při chladničkové teplotě.

Titrace komplementu: naředíme pozitivní sérum (+ 200 μl aqua pro injectione) a inaktivujeme 30 minut při 56°C . Do stojánku dáme 9 zkumavek s popsanými titry: 1:8, 1:16, 1:32,.....1:2048. Do zkumavky č.1 pipetujeme 1,4 ml veronalového pufru a do zkumavek 2-9 vždy 1 ml veronalového pufru. Do první zkumavky přidáme 0,2 ml pozitivního séra a přeneseme vždy po 1 ml do dalších zkumavek (titrace). V poslední vše necháme.

Připravíme si stojánek na ředění komplementu. Nejdříve pipetujeme dané množství veronalového pufru. Potom přidáme automatickou pipetou pouze do první zkumavky 0,1 ml naředěného komplementu (ml aqua pro injectione), promícháme a do dalších zkumavek přeneseme po 1 ml (vodorovně). V dalších dvou řadách postupujeme stejně. Zkumavky obložíme ledem.

Tab. 1. Schéma stojánku s ledem na ředění komplementu.

| | | | | | | | | |
|-----|----|------|----|----|----|----|----|-----|
| Ko | VP | Ko | VP | Ko | VP | Ko | VP | |
| 0,1 | + | 2,9 | 1 | + | 1 | 1 | + | 1 |
| 1 | : | 32 | 1 | : | 60 | 1 | : | 240 |
| Ko | VP | Ko | VP | Ko | VP | Ko | VP | |
| 0,1 | + | 3,65 | 1 | + | 1 | 1 | + | 1 |
| 1 | : | 37,5 | 1 | : | 75 | 1 | : | 300 |
| Ko | VP | Ko | VP | Ko | VP | Ko | VP | |
| 0,1 | + | 4,65 | 1 | + | 1 | 1 | + | 1 |
| 1 | : | 47,5 | 1 | : | 96 | 1 | : | 380 |

Destička č. 1:

- do 1. a 2. řady dávkujeme do každé jamky 25 μ l veronalového pufru
- do 3. řady dávkujeme do každé jamky 50 μ l veronalového pufru
- do celé 1. řady dávkujeme po 1 kapce (25 μ l) morčecího séra
- o celé 2. řady dávkujeme po 1 kapce (25 μ l) antigenu
- do 3. řady nic

Tab. 2. Mikrotitrační destička č. 1

| | 30 | 37 | 47 | 60 | 75 | 95 | 120 | 150 | 190 | 240 | 300 | 380 |
|---|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----------|-----|-----|
| 1 | | V | + | MS | + | Ko | + | Ko | | | | |
| 2 | | V | + | A | + | Ko | + | Ko | + | 2. den HS | | |
| 3 | | V | + | V | + | Ko | + | Ko | | | | |

Destička č. 2:

- antigen dávkujeme po 25 μ l do celé části A a do řady KA z části B
- pufr pipetujeme do části B: A – 25 μ l
KA – 25 μ l
KO – 50 μ l
- komplement pipetujeme po 50 μ l odzadu (od nejmenší koncentrace po největší – bez proplachu)
- od ředění 380-190 pipetujeme pouze do destičky č. 1
- od ředění 150 pipetujeme svisle do destičky č. 1, ale i vodorovně do destičky č. 2, až úplně do konce (včetně kontrol) – část A i B

Dávkování nařazené pozitivní kontroly: dávkujeme od nejmenší koncentrace (1:2048) až po největší (1:8), u koncentrace 1:8 dávkujeme i do části B sloupce A

Obě destičky protřepeme a druhý den přidáme do všech jamek hemolytický systém HS (25 μ l) a dále je postup stejný.

Tab. 3. Mikrotitrační destička č. 2

| | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:256 | 1:518 | 1024 | 2048 | A | KA | Ko |
|-----|-----|------|------|------|-----------|-------|-------|------|------|-------|----|----|
| 30 | | | | | A | | | | | V | V | V |
| 37 | | | | | + | | | | | + | + | + |
| 47 | | | | | Ko | | | | | Ko | A | V |
| 60 | | | | | + | | | | | + | + | + |
| 75 | | | | | Ko | | | | | Ko | Ko | Ko |
| 95 | | | | | + | | | | | + | + | + |
| 120 | | | | | poz.sérum | | | | | sérum | Ko | Ko |
| 150 | A | | | | | | | | | B | | |

Hodnocení:

- destička č. 1: odečítá se první jamka, kde je úplná hemolýza, většinou to bývá řada č. 1, ale může být i 2, 3, v úvahu se bere nejdelší řada.
- destička č. 2: v části A, KA, KO musí být úplná hemolýza, pokud není, reakce není validní a test nelze hodnotit

DEN PRVNÍ

Příprava roztoků:

- A. pozitivní kontrola – 200 µl aqua pro injectione pipetujeme opatrně po stěně lahvičky s lyofilizovaným sérem
- B. negativní kontrola - 200 µl aqua pro injectione opatrně po stěně lahvičky s lyofilizovaným sérem
 - obě kontroly se přenesou do zkumavek a dají se séry do vodní lázně při teplotě 56 °C

Veronalový pufr - Veronal (200 ml) + destilovaná voda (800 ml)

připravit kádinky He, Ko, Ag, Kr

He – hemolyzin – Veronalový pufr pipetujeme dle návodu do čisté malé erlenmeyerovy baňky (24 ml), smícháme 1 ml hemolyzinu z mrazničky + 24 ml veronalového pufru – dáme do chladničkové teploty do druhého dne

Ko – komplement – pipetujeme 59,5 ml veronalového pufru, ředění dle boxové titrace

Ag – antigen – množství pufru se odvodí od množství použitých krabiček antigen

Kr – krvinky – nejdříve propláchneme veronalovým pufr

29 ml veronalového pufru + 1 ml propraných beraních krvinek

měření na Specolu – 1 ml neředěných krvinek + 9 ml destilované vody

Dle naměřené hodnoty se v tabulkách najde příslušné měření krvinky + Veronalový pufr

Krvinky se naředí a uloží do lednice na druhý den (budou se míchat s hemolyzinem 1:1 = 25+25 ml)

Pracovní postup:

Tab. 4. Mikrotitrační destička

| | A | A | Ko | Ko | Hs | Hs | | | | | | |
|---|---|---|----|----|----|----|--|--|--|--|--|--|
| + | | | | | | | | | | | | |
| + | | | | | | | | | | | | |
| - | | | | | | | | | | | | |
| 1 | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | |

Kapání do destiček:

1. inaktivace sér a kontroly +, - v lázni 56 °C po dobu 30 minut
2. během inaktivování sér se pipetuje do všech jamek 25 µl veronalového pufru osmikanálovou pipetou (do kontrol Ag 25 µl, Ko 25 µl, Hs 50 µl)
3. do prvních jamek pipetujeme 25 µl sér
4. naředíme promývacím hřebenem (řádek Ko ředíme 2x)
5. Ko – komplement naředíme 1 ml aqua pro injectione
6. Ag – antigen naředíme 1 ml veronalu (použijí se 2 lahvičky pokud je více jak 10 destiček)
7. připravíme led na komplement, vyndáme morčecí sérum z lednice
8. naředíme antigen 1 ml + 15 ml nebo 2 ml + 30 ml
9. naředíme komplement 59 ml+ 0,5 ml
10. antigen kapeme do všech jamek od 3. řady po 25 µl, kontroly dle tabulky
11. komplement dávkujeme do všech jamek od 2. řady po 50 µl, kontroly dle tabulky

12. protřepeme 0,5 minuty na třepačce a dáme do lednice na nejméně 18 hodin (přes noc)

DEN DRUHÝ

1. ráno smícháme krvinky (25 μ l)+ hemolyzin (25 μ l) 1:1 = hemolytický systém - inaktivujeme na vodní lázni po 30 minut při 37 °C
2. hemolytický systém (Hs) pipetujeme do všech jamek po 25 μ l i do kontrol
3. protřepeme na třepačce 0,5 minuty
4. dáme na 30 minut do termostatu
5. protřepeme na třepačce 0,5 minuty
6. dáme na 30 minut do termostatu
7. dáme na 2 hodiny do lednice
8. Interpretace výsledků:

Jestliže je celý komplement vyváznán na hledanou protilátku (v komplexu s antigenem), nedojde k hemolýze hemolytického systému (zábrana hemolýzy). Nezůstal volný komplement, který by lyzoval hemolytický systém, ten zůstal neovlivněn – test je pozitivní.

V případě, že ve vyšetřovaném séru specifické protilátky nejsou, komplement se naváže na hemolytický systém a dojde k viditelné hemolýze. Hemolýza se projeví projasněním erytrocytů – test je negativní.

4.1.2. Enzymo-Imuno-Analýza EIA

Biologický materiál: nativní srážlivá krev-krevní sérum, plodová voda

Laboratorní vybavení: jedno a vícekanálové pipety na 10, 100 a 1000 μ l a špičky pro jednorázové použití, promývací zařízení ROTATITER, stopky, termostat na 37 °C s vlhkou komůrkou, fotometr pro mikrotitrační destičky.

Složení imunoenzymatické soupravy:

1. Potažená destička s navázaným antigenem, 12 x 8 jamek
2. Negativní kontrola – lidské sérum bez protilátek proti *T. gondii*
3. CUT-OFF 6 UI/ml – lidské sérum obsahující protilátky proti *T. gondii* v hraniční koncentraci
4. Pozitivní kontrola 60 UI/ml – lidské sérum obsahující protilátky proti *T. gondii*
5. Pozitivní kontrola 240 UI/ml – lidské sérum obsahující protilátky proti *T. gondii*
6. Konjugát – zvířecí protilátka proti lidskému IgG, značená peroxidázou

7. Ředící roztok vzorků – pufr se stabilizátory bílkovin
8. Promývací roztok (20x konc.) – koncentrovaný pufr
9. TMB – Complete – jednosložkový chromogenní substrátový roztok obsahující TMB a peroxid vodí
10. zastavovací roztok – obsahuje kyselinu sírovou 1 mol/l. Pozor žíravina
11. avidinový roztok (souprava pro stanovení IgG)
12. tracer – lyofilizát obsahující antigen *T.gondii* a konjugát (IgM, IgA, IgE)
13. ředící roztok traceru – (IgM, IgA, IgE)

Příprava pracovních roztoků:

1. Promývací roztok – koncentrovaný promývací roztok ředíme 1+19. Např. 75 ml promývacího roztoku + 1425 ml destilované vody. V lahvičce s promývacím roztokem se mohou tvořit krystaly solí. Tyto krystaly je třeba před použitím rozpustit zahřátím na vodní lázni při 40 °C. Roztok po naředění je stabilní 1 týden při +2 až +8 °C.
2. Konjugát je již v pracovní koncentraci, dále se neředí.
3. TMB – Complete – je jednosložkový chromogenní substrátový roztok v pracovní koncentraci, dále se neředí.
4. Tracer – rekonstituci lyofilizátu provádíme po ukončení pipetování vzorků, tj. přibližně hodinu před použitím. Do lahvičky lyofilizovaného traceru přidáme 4 ml ředícího roztoku traceru. Po rozpuštění lyofilizátu dobře promícháme krouživým pohybem lahvičky. Použijeme-li pro jednu sérii vyšetření více než jednu lahvičku traceru, smícháme před pipetováním obsah všech lahviček. Nespotřebovaný rekonstituovaný tracer skladujeme při -20 °C. Nezmrazujeme opakovaně více než dvakrát.

Ředění vzorků: ředící roztok je v soupravách *Toxoplasma* EIA IgG, IgM, IgA, IgE identický a umožňuje stanovení IgG, IgM, IgA, IgE protilátek z jednoho ředění vzorku. Důkladně promíchané vzorky ředíme 1+100 ředícím roztokem vzorků: 10 µl vzorku + 1 ml ředícího roztoku vzorků. Fetální a novorozenecká séra ředíme 1+20 ředícím roztokem vzorků: 50 µl + 1 ml ředícího roztoku vzorků.

Pracovní postup:

1. do panelu kapeme 10 µl séra + 1 ml ředícího roztoku, u novorozenců 50 µl séra + 1 ml ředícího roztoku.

2. do destičky nakapeme kontroly všech 3 tříd protilátek (B - blank, N – negativní kontrola, C – cut off, P – pozitivní kontrola)
3. naředěná séra kapeme do destičky dle vyznačeného schématu po 100 µl
4. destičku dáme na 60 minut do vlhké komůrky do termostatu při 37 °C
5. naředíme si tracer
6. destičku promyjeme promývacím roztokem
7. kromě jamky A1 (BLANK) dávkujeme do všech jamek IgM a IgA tracer a do jamek IgG konjugát po 100 µl
8. destičku přikryjeme víčkem a dáme inkubovat 60 minut do vlhké komůrky do termostatu při 37 °C.
9. promyjeme promývacím roztokem
10. do všech jamek dávkujeme roztok substrátu (TMB – Complete), pro všechny 3 skupiny stejný
11. IgG – inkubujeme 15 minut v termostatu při 37 °C; IgM, IgA, IgE inkubace 20 minut v termostatu při 37 °C
12. reakci zastavíme zastavovacím roztokem
13. bezprostředně po zastavení reakce změříme intenzitu zbarvení roztoků v jednotlivých jamkách na fotometru při vlnové délce 450 nm proti blanku (jamka A1)

Interpretace výsledků:

1. pro výpočet indexu positivity dělíme absorbanci testovaného vzorku absorbancí CUT-OFF naměřenou v téže sérii vyšetření.

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

Tab. 5. Interpretace výsledků indexu positivity

| INDEX POZITIVITY (IP) | HODNOCENÍ |
|-----------------------|-----------|
| nižší než 0,8 | negativní |
| 0,8 až 1,0 | hraniční |
| vyšší než 1,0 | pozitivní |

2. kvantitativní interpretace v mezinárodních jednotkách

Tab. 6. Kvantitativní interpretace výsledků v IU/ml

| HLADINA PROTILÁTEK IU/ml | HODNOCENÍ |
|--------------------------|-----------|
| Nižší než 4,8 | negativní |
| 4,8 až 6,0 | hraniční |
| Vyšší než 6,0 | pozitivní |

Kalibrační graf:

1. Na osu X vyneseme hodnoty koncentrace protilátek v negativní kontrole, CUT-OFF 6 IU/ml a pozitivních kontrolách 60 a 240 IU/ml a na osu Y odpovídající absorbance. Hladinu protilátek ve vzorcích stanovíme odečtením těchto hodnot z kalibrační křivky.
2. Jestliže je hladina protilátek ve vzorku vyšší než 240 IU/ml, ředíme vzorek ve dvou krocích a test opakujte.
 - Krok 1. ředíme vzorek 1+100 ředícím roztokem vzorků: 10 μ l + 1 ml ředícího roztoku vzorků.
 - Krok 2. 100 μ l vzorku naředěného v kroku 1 zředíme 900 μ l ředícího roztoku vzorků.
3. Koncentrace protilátek odečtené z kalibračního grafu je pak třeba násobit 10x.
4. Hraniční výsledky je nutno vyšetřit znovu z nového odběru s časovým odstupem 2-3 týdnů.

Stanovení avidity ve třídě protilátek IgG

Princip: avidita protilátek je veličina vyjadřující pevnost vazby mezi antigenem a protilátkou. V počáteční fázi infekčních onemocnění se protilátky k antigenům infekčního agens neváží příliš pevně, jejich avidita je nízká. V průběhu infekce však imunitní odpověď vyzává a avidita protilátek narůstá. Stanovení avidity protilátek se proto osvědčilo při určování fáze různých onemocnění, zejména toxoplazmózy.

Metody stanovení avidity protilátek jsou zpravidla založeny na narušení vazby antigenu s protilátkou elučním činidlem (aviditním roztokem) a následným stanovením volných protilátek. Účinkem aviditního roztoku se část protilátek navázaných na antigen uvolní. Je-li avidita protilátek nízká, zůstane

po inkubaci v aviditním roztoku navázaná jen jejich menší část, zatímco vysokoaviditní protilátky zůstanou i po inkubaci z větší části navázané.

Příprava aviditních roztoků: - obsah lahvičky důkladně promíchejte. Funkčnost aviditního roztoku je indikována žlutým zabarvením. Roztok je termolabilní a v případě změny jeho barvy ze žluté na červenou došlo k jeho znehodnocení. Červeně zbarvený aviditní roztok již nelze použít!

- promývací roztok, konjugát a TMB – Complete se připravují jako při obvyklém stanovení protilátek IgG proti *Toxoplasma gondii*.

Pracovní postup:

1. jamky A1 a A2 ponecháme prázdné (blank)
2. pipetujeme 100 µl negativní kontroly do 1 jamky stripu N (bez močoviny)
3. pipetujeme 100 µl CUT-OFF 6 IU/ml do 1 jamky stripu N
4. pipetujeme 100 µl pozitivní kontroly 240 IU/ml do 1 jamky stripu N
5. pipetujeme 100 µl ředěných testovaných sér do dvou sousedních jamek stripu N a Av (s močovinou).

Hodnocení výsledků: výpočet indexu avidity:

$Av \text{ IgG} = \frac{\text{absorbance vzorku na stripu Av}}{\text{absorbance vzorku na stripu N}} \times 100$

Interpretace výsledků:

Tab. 7. Interpretace výsledků indexu avidity

| HODNOTA Indexu Av | HODNOCENÍ AVIDITY | INTERPRETACE VÝSLEDKU |
|----------------------|----------------------|---|
| ≤ 30 | nízká | Akutní toxoplazmóza ≤ 4 měsíce po infekci |
| 31 - 35 | hraniční | Opakovat vyšetření po 3-4 týdnech |
| 36 -100 | vysoká | > 4 měsíce po infekci |

Poznámky k interpretaci výsledků:

1. u méně než 5% pacientů, kteří prodělali toxoplazmózu, se ani po 4 měsících po infekci avidita nezvyšuje a index avidity zůstává menší nebo roven 30; ačkoliv se zjevně nejedná o akutní toxoplazmózu. To je charakteristické zejména pro séra s nízkým obsahem antitoxoplazmových IgG, obzvláště byla-li ještě naředěna.
2. vyjde-li index avidity hraniční, je třeba zopakovat odběr po 3-4 týdnech.
3. u některých pacientů, v době, kdy index avidity již stoupl do vysokých hodnot, mohou stále přetrvávat nižší nebo i vyšší hladiny specifických IgM a IgA.
4. výsledky stanovení avidity IgG je třeba interpretovat v kontextu výsledků ostatních vyšetření, zejména titrů KFR či NIFR a hladin IgG, IgM, IgA a IgE protilátek.

4.1.3. Srovnávací Western-Blot pro porovnání protilátek matky a novorozence ve třídách IgG a IgM imunoglobulinů (CIP-WB = Comparative Immunological Profiles)

Biologický materiál: nativní srážlivá krev-krevní sérum, pupečnicková krev

Laboratorní vybavení: latexové rukavice, pinzety, skalpel, erlenmayerova baňka, pravítko, filtrační papír, alobal, destilovaná a deionizovaná voda, automatické pipety, mikropipety, jednorázové špičky, lepící páska

Reagencie:

R1: obsahuje testovací stripky nesoucí elektroforeticky separovaný *Toxoplasma gondii* antigen.

R2: lahvička obsahuje 30 ml (16 nebo 120 ml) vzorkového pufru – pufr, detergent, azid sodný (méně než 0,1%), červené barvivo. Růžový roztok – pracovní ředění.

R3: obsahuje 60 (30 nebo 240) ml 10x koncentrovaného promývacího roztoku, detergent, azid sodný (méně než 0,1%). Bezbarvý roztok – ředí se 1 + 9 dílů (1:10)

R4: lahvička obsahuje 16 (8 nebo 60) ml anti – IgG konjugátu. Pufr, polyklonální kozí anti–humánní IgG protilátky, alkalická fosfatáza, konjugát, stabilizátor, azid sodný, modré barvivo. Modrý roztok – pracovní ředění.

R5: lahvička obsahuje 16 (8 nebo 60) ml anti-IgM konjugátu. Pufr, polyklonální kozí anti-humánní IgM protilátky, alkalická fosfatáza, konjugát, stabilizátor, azid sodný, žluté barvivo. Žlutý roztok – pracovní ředění.

R6: Lahvička obsahuje 30 (16 nebo 120) ml substrátu, pufr, NBT (nitrotetrazoliová modř), stabilizátor. Hnědý roztok – pracovní ředění.

Pracovní postup:

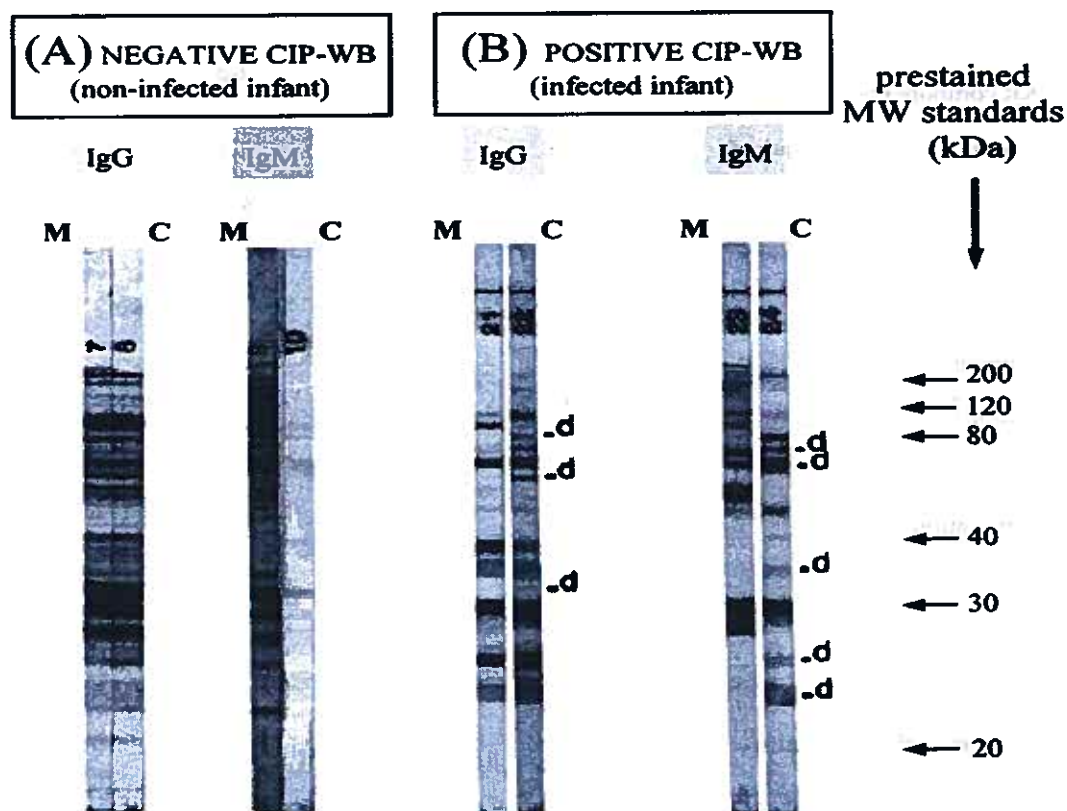
1. pro jedno vyšetření matka-novorozenec potřebujeme 4 stripy, 2 pro IgM a 2 pro IgG třídu protilátek.
2. připravíme si potřebný počet vaniček pro jednotlivé stripy.
3. popíšeme vaničky čísly vzorků sloužícími k identifikaci pacientů.
4. dávkujeme 1,2 ml vzorkového pufru – lahvička **R2** do každé označené vaničky.
5. použijeme gumové rukavice a nedotýkáme se stripů prsty, používáme pinzetu.
6. přitlačíme očištěné a suché pravítko na okraj stripu, tak aby byla vidět modrá linie a číslo.
7. použijeme skalpel nebo čisté nůžky a rozřežeme od kraje potřebný počet stripů **R1**. Zkontrolujeme zda má strip číslo a modrou linku.
8. pomocí pinzety vložíme každý strip číslem nahoru do vaničky označené IgM nebo IgG a číslem vzorku.
9. nepoužité stripy vrátíme do obalu a uložíme.
10. jemně kýváme vaničkou (lze použít třepačku na nízké otáčky), 5-10 minut, tak aby byl každý strip řádně namočen pufrem **R2**.
11. ke každému vzorku dávkujeme 10 μ l do IgG vaničky a 25 μ l do IgM vaničky.
12. jemně kýváme vaničkou a inkubujeme na třepačce při 10 cyklech/min po dobu 90 minut +/- 5 minut, při laboratorní teplotě 18-25 °C.
13. promývání (koncentrát 10x ředěný **R3**): odsajeme roztok z každé vaničky pomocí pipety, dávkujeme do každé vaničky 2 ml promývacího pufru v pracovním ředění, odsajeme, opět dávkujeme 2 ml promývacího pufru v pracovním ředění, inkubujeme 3-5 minut na třepačce, odsajeme roztok

- z vaničky. Dávujeme opět 2 ml promývacího pufru při témže ředění do vaničky, inkubujeme 3-5 minut na třepačce, odsajeme roztok.
14. dávujeme 1,2 ml IgG konjugátu **R4** do každé vaničky označené IgG. Dávujeme 1,2 ml IgM konjugátu **R5** do každé IgM vaničky.
 15. inkubujeme 60 minut na třepačce při teplotě 18-25 °C.
 16. opakujeme krok číslo 13. promývání.
 17. dávujeme 1,2 ml NBT substrátu **R6** do vaniček.
 18. jemně třepete a inkubujete na třepačce zakryté alobalem – ochrana před světlem.
 19. vybarvení proužků na stripech: nechte dostatečně vybarvit, proužky na stripech novorozence mohou být výrazně světlejší než mateřské, po zaschnutí všechny proužky zesvětlají. Orientujeme se především podle zabarvení stripů dítěte.
 20. je nezbytné zastavit reakci mateřského novorozeneckého stripu současně. vyzrálou reakci zastavíme odsátím roztoku substrátu a dávkováním 2 ml destilované vody do vaničky.
 22. znovu odsajeme destilovanou vodu a dávujeme 2 ml čisté destilované vody.
 23. usušíme a odečítáme výsledky porovnáváním mateřských a novorozeneckých protilátek na stripech IgG a IgM.

Interpretace výsledků:

1.-při narození (pupečnicková krev versus mateřské sérum) - proužek o velikosti <120 kDa, který se nachází vyskytující se pupečnickové krvi, ale který chybí v mateřském séru, je signifikantní pro specifické anti-T.gondii neo-protilátky syntetizované plodem.

2.-během sérologického sledování novorozence (novorozenecké sérum versus krev matky) – proužek o velikosti <120 kDa přítomný v novorozeneckém séru, ale který chybí v mateřské krvi, je signifikantní pro specifické anti-T.gondii protilátky syntetizované dítětem.



Obr. 5. Interpretace výsledků CIP-WB (M-mateřské sérum, C-pupečníková krev)

Limity testu:

1. výsledky CIP-WB (Comparative-Imunological-Profiles) IgG/IgM by měly být posuzovány s ohledem na všechna dostupná klinická, epidemiologická a laboratorní data, ještě před diagnostikováním kongenitální toxoplazmózy.
2. proužky na stripech mohou mít variabilní vzhled – jsou slabé, silné, méně či více zabarvené.
3. u novorozence je nutno obezřetně posuzovat zesílení vybarvení nebo šířku pruhů u pupečníkové krve. Nelze považovat za pozitivní výsledek. Je nezbytné pokračovat v sérologickém dohledu nad novorozencem.
4. antigeny o vysoké molekulové hmotnosti (MW) antigenní frakce jsou méně rozpuštěné na vrcholu stripu. Následovně mohou být antigenní epitopy více či méně maskovány. Výskyt těchto antigenů je podmíněn výrobou stripů nebo přítomností bílkovin v séru. Proužky o MW >120 kDa nemohou být bezpečně použity pro interpretaci CIP-WB.

5. negativní výsledek CIP-WB nevylučuje možnost infekce. Sérologický dohled nad dětmi by měl pokračovat až do potvrzení nebo vyloučení kongenitální infekce.
6. přirozené protilátky – immuno-blotting je velice senzitivní metoda. Literatura uvádí společnou přítomnost IgG a IgM anti-*T.gondii* v séru jedinců dříve neinfikovaných parazitem. Původ antigenních stimulů, které přispívají k produkci přirozených protilátek, je neznámý. Tyto přirozené protilátky jsou přítomny u většiny dospělých osob. Nacházejí se také u dětí starších než 3 měsíce. Proto je CIP-WB IgG/IgM užíván pro sledování dětí do 3 měsíců po narození.
7. Heat Shock Protein – nespecifické, úzké, obvykle velmi bledé proužky o MW 37 kDa na obou vyšetřovaných pruzích IgM (matka+dítě). Tento artefakt je způsoben procesem výroby antigenu. Tyto proužky nehodnotíme.

4.1.4. Polymerázová-řetězová reakce PCR

Biologický materiál: materiál vhodný pro průkaz DNA *T. gondii* metodou PCR odebíráme dle předpokládaného stádia onemocnění a kategorie pacienta (gravidní žena, oční toxoplazmóza, jaterní léze atd.).

- krev (nesrážlivá) – s přidavkem ethylendiaminetetraacetic acid EDTA popř. citrátu sodného, alespoň 5 ml krve
- fetální krev – EDTA, citrát, v množství, které lze odebrat
- plodová voda – v množství alespoň 10 ml, bez konzervačních přísad
- likvor – 1-2 ml i více
- pupečnicková krev – EDTA, citrát, v množství, které lze získat
- kostní dřeň, kmenové buňky k transplantaci, biopsie (játra, lymfatické uzliny)
- oční tekutina
- další druhy tělesných tkání a biologických vzorků

Materiál odebíráme v doporučeném množství (krev, plodová voda) nebo alespoň v takovém množství, které lze bez komplikací odebrat (likvor, oční tekutina, biopsie a další materiály). Pro potvrzení diagnózy lze vyšetřit i materiál z plodů po abortu, popř. sekční materiály.

Vzorky pro vyšetření metodou PCR nezmrazujeme ani nekonzervujeme, uchováváme v ledničce, a pokud možno neprodleně (do 24 hodin) doručíme do laboratoře.

Pracovní postup:

1. Izolace DNA *T. gondii* z tekutých materiálů komerčním kitem firmy QIAGEN (QIAampDNA Mini Kit).
 - izolace DNA z tkáně: fenol-chloroformová extrakce.
2. amplifikace izolované DNA je prováděna paralelně ze dvou oblastí geonomu *T. gondii*.
3. oblast genu B1: opakuje se v genomu *T. gondii* 35x, metoda amplifikace je postavena jako nested PCR a dosahuje analytické citlivosti, tzv. meze detekce 5 -10 organismů v 1 ml tekutého biologického materiálu. Produkt o velikosti 362 bp je detekován vizualizací v 2% agarózovém gelu barveném ethidium bromidem.
4. oblast genu TGR1E: opakuje se v genomu *T. gondii* 30-35x, metoda je standardní PCR s mezí detekce 1-10 organismů v 1 ml. Produkt o velikosti 191 bp je detekován v 3% agarózovém gelu při barvení ethidium bromidem.
5. Negativní kontrola = prevence falešně pozitivních výsledků, zkumavky s destilovanou vodou, které se zpracovávají paralelně se vzorky izolované DNA.
6. Pozitivní kontrola = DNA připravená izolací z asi 100 tachyzoitů (vegetativní forma *T. gondii*).
7. Kontrola meze detekce (citlivosti) metody = DNA připravená izolací z 1-10 tachyzoitů.
8. Inhibiční zkouška (kontrola nepřítomnosti inhibitorů PCR reakce) = koamplifikace části humánního genu pro beta globin (7).

4.2. Materiál

4.2.1. Popis souboru

Retrospektivní studie pacientů s akutní toxoplazmózou proběhla na oddělení parazitologie Ústavu klinické mikrobiologie ve Fakultní Nemocnici v Hradci Králové. Výběrová skupina pacientů s akutní toxoplazmózou činí 73

pacientů z toho 32 žen, 11 mužů, 17 gravidních žen a 13 dětí (8 chlapců a 5 děvčat).

V tabulce číslo 8. je uveden průměrný věk (F-ženy, GŽ-gravidní ženy, M-muži, D-děti); počet pacientů v odpovídajících věkových kategoriích, ve kterých byla prokázána akutní toxoplazmóza a věk nejmladšího a nejstaršího jedince ve skupině žen, gravidních žen, mužů a dětí.

Tab. 8. Věkové rozložení pacientů.

| Věk | F | GŽ | M | D |
|--------------------------|------|------|----|-----|
| 0 - 15 | - | - | - | 13 |
| 16 - 20 | 7 | 1 | 4 | - |
| 21 - 30 | 14 | 12 | 5 | - |
| 31 - 40 | 7 | 4 | - | - |
| 41 - 50 | 3 | - | 2 | - |
| 51 - více | 1 | - | - | - |
| Věk nejmladšího pacienta | 16 | 16 | 16 | 4 |
| Věk nejstaršího pacienta | 51 | 36 | 48 | 15 |
| Průměrný věk | 28,1 | 26,3 | 27 | 9,8 |

Údaje od pacientů byly shromážděny od května 2002 do května 2005.

U těchto pacientů byly sledovány laboratorní hodnoty celkových protilátek provedených metodou KFR a titry specifických protilátek ve třídách IgG, IgM, IgA, IgE imunoglobulinů a hodnoty avidity IgG provedených metodou EIA. Metoda Western Blotu byla použita pro screening novorozenců jejichž matky získaly infekci *T. gondii* během gravidity a u nichž hrozí možnost kongenitální toxoplazmózy u novorozence.

Druhou částí studie bylo zaslání dotazníků ošetřujícím lékařům souboru pacientů s akutní toxoplazmózou, které se zabývají možnostmi získání nákazy při:

kontaktu s toxoplazmózou při kontaktu s kočkami, při práci na zahradě, při práci s hlínou, pískem a jinými přírodními materiály.

konzumaci syrového masa, ochutnávání syrového masa při vaření (sekaná, játrová zavářka...), konzumace masa z králíka a nutrie.

konzumaci zeleniny ze zahrady, mrkve se slupkou, ředkviček a okurek.

V dotazníku se dále zaměřujeme na klinické příznaky onemocnění jako jsou uzlinové projevy (uzlinový syndrom nebo jednotlivé uzliny), které jsou nejčastější nebo na vedlejší příznaky jako je zvýšená teplota, bolest hlavy, únava atd.

Vše je doplněno o hodnoty celkové hladiny leukocytů, diferenciálního rozpočtu leukocytů a hladiny jaterních testů (AST, ALT).

5. Výsledky

Výběrová skupina pacientů s akutní toxoplazmózou, která činí 73 osob, byla rozdělena do 4 skupin a to na ženy (32 osob), gravidní ženy (17), muže (11) a děti (13).

5.1. Přehled stanovených titrů KFR, specifických protilátek ve třídách IgG, IgM, IgA, IgE a avidity IgG u vyšetřovaných skupin pacientů s akutní toxoplazmózou.

Stanovovali jsme celkové protilátky metodou KFR, která byla jedním z důležitých kritérií při vybírání pacientů s akutní toxoplazmózou. Hraniční je titr 1:32, vyšší titry jsou brány jako pozitivní titry akutní infekce. U stanovení titrů specifických tříd protilátek IgG, IgM, IgA a IgE metodou EIA byl brána jako pozitivní výsledek hodnota indexu positivity vyšší nebo rovna 1. Pozitivní hodnota indexu avidity u protilátek třídy IgG je ≤ 35 (nízká avidita). U pacientů s více provedenými testy během období studie, jsou do tabulky zařazeny nejvyšší naměřené hodnoty titru protilátek a u avidity IgG hodnoty nejnižší (pozitivní), které jsou brány jako markery akutní infekce.

Tab. 9. Přehled stanovených titrů protilátek u mužů.

| ČÍSLO | KFR | IgG | AVIDITA | IgM | IgA | IgE |
|-------|---------|-------|---------|--------|--------|-------|
| 1M | >1:1024 | 5,059 | 9,1 | 3,602 | - | 2,313 |
| 2M | >1:1024 | 4,841 | 35,9 | 6,279 | 11,454 | - |
| 3M | >1:1024 | 5,026 | 14,3 | 1,909 | - | 1,301 |
| 4M | >1:1024 | 6,341 | - | 4,054 | - | 2,475 |
| 5M | >1:1024 | - | - | 2,423 | 1,817 | - |
| 6M | 1:512 | 6,685 | 81,7 | 1,519 | 9,235 | 1,273 |
| 7M | 1:512 | 1,508 | - | 4,496 | 2,426 | 1,439 |
| 8M | 1:512 | 6,51 | - | 5,067 | 2,325 | 1,571 |
| 9M | >1:1024 | 3,535 | 35 | 10,591 | 3,5 | 2,499 |
| 10M | >1:1024 | - | - | 5,163 | 3,129 | 2,826 |
| 11M | 1:256 | - | - | 0,558 | 1,194 | - |
| | průměr | 4,938 | 35,2 | 4,151 | 4,385 | 1,962 |

Tab.10. Přehled stanovených titrů protilátek u žen.

| ČÍSLO | KFR | IgG | AVIDITA | IgM | IgA | IgE |
|-------|---------------|-------|---------|-------|-------|-------|
| 1F | 1:1024 | 4,4 | 11,7 | 0,945 | 0,978 | 0,518 |
| 2F | 1:256 | - | - | 3,554 | 1,113 | 0,544 |
| 3F | 1:64 | 5,705 | - | 1,264 | 0,485 | 0,522 |
| 4F | 1:128 | 5,601 | - | 1,386 | - | - |
| 5F | >1:1024 | 6,273 | - | 2,123 | 4,396 | 1,395 |
| 6F | >1:1024 | - | - | 4,567 | 3,039 | 2,215 |
| 7F | >1:1024 | 7,772 | 12,4 | 3,242 | 2,428 | 1,305 |
| 8F | 1:1024 | 3,202 | - | 4,415 | 2,983 | - |
| 9F | >1:1024 | 3,917 | 22,4 | 2,446 | 1,408 | 1,482 |
| 10F | >1:1024 | 6,147 | 14,7 | 6,788 | 3,828 | 2,241 |
| 11F | >1:1024 | 2,886 | 27,9 | 3,528 | 2,416 | 1,017 |
| 12F | >1:1024 | 4,222 | 16,9 | 7,307 | 6,979 | 2,709 |
| 13F | 1:512 | 6,95 | - | 3,086 | 1,031 | 0,606 |
| 14F | 1:512 | 2,543 | 21,3 | 2,245 | 1,217 | 0,926 |
| 15F | 1:256 | - | - | 3,074 | 2,441 | - |
| 16F | 1:256 | 2,987 | 42,7 | 5,73 | 2,871 | 0,994 |
| 17F | 1:512 | 3,892 | - | 4,454 | 1,199 | 1,28 |
| 18F | >1:1024 | 4,644 | - | 6,984 | 1,322 | 1,231 |
| 19F | 1:256 | 3,257 | - | 2,744 | 1,119 | 1,002 |
| 20F | 1:256 | 2,842 | - | 6,764 | 1,339 | - |
| 21F | 1:512 | - | - | 4,006 | 1,665 | - |
| 22F | >1:1024 | 5,141 | 33,5 | 2,404 | 3,564 | 1,34 |
| 23F | 1:256 | - | - | 2,097 | 0,729 | 0,781 |
| 24F | 1:1024 | - | - | 5,744 | 1,484 | - |
| 25F | 1:512 | - | - | 3,427 | - | 1,23 |
| 26F | 1:256 | 4,109 | - | 1,047 | 1,871 | - |
| 27F | 1:256 | 3,582 | - | 1,294 | 1,33 | 0,538 |
| 28F | 1:256 | - | - | 1,077 | 0,98 | - |
| 29F | 1:256 | 2,042 | - | 4,025 | 2,298 | - |
| 30F | 1:512 | - | - | 1,228 | 0,866 | - |
| 31F | 1:256 | - | - | 1,026 | 1,177 | - |
| 32F | 1:128 | - | - | 1,331 | 0,611 | - |
| | průměr | 4,386 | 22,6 | 3,292 | 1,972 | 1,194 |

Tab. 11. Přehled stanovených titrů protilátek u gravidních žen.

| ČÍSLO | KFR | IgG | AVIDITA | IgM | IgA | IgE |
|-------|---------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| 1G | 1:64 | 2,868 | 17,8 | 0,526 | 0,418 | 0,231 |
| 2G | 1:256 | - | - | 0,734 | 1,039 | 0,505 |
| 3G | 1:128 | 6,402 | 53,8 | 2,314 | 1,227 | 0,367 |
| 4G | 1:1024 | 8,131 | 20,1 | 4,68 | 1,759 | 1,069 |
| 5G | >1:1024 | 8,243 | 75,8 | 7,474 | 2,638 | 2,099 |
| 6G | 1:256 | 5,463 | 48,2 | 2,07 | 1,142 | 0,762 |
| 7G | 1:128 | 5,192 | 65,4 | 1,743 | 0,751 | 0,339 |
| 8G | 1:512 | 3,384 | 12,7 | 1,985 | 3,228 | 0,951 |
| 9G | 1:512 | 3,481 | 15,3 | 3,182 | 1,114 | 0,937 |
| 10G | 1:128 | 5,954 | 62,4 | 0,558 | 1,464 | 0,402 |
| 11G | 1:512 | 2,766 | 62,8 | 2,387 | 1,107 | 0,842 |
| 12G | 1:16 | - | - | 1,152 | - | - |
| 13G | 1:256 | 5,991 | 30,8 | 1,868 | 0,554 | 0,466 |
| 14G | 1:1024 | 6,676 | 24,7 | 1,972 | 0,816 | 0,651 |
| 15G | 1:32 | 2,432 | 51,6 | 1,425 | 0,265 | 0,223 |
| 16G | 1:256 | 2,772 | 49,2 | 4,083 | 1,816 | 1,08 |
| 17G | 1:32 | 3,702 | 46,7 | 0,833 | 1,354 | 0,511 |
| | průměr | 4,897 | 42,5 | 2,293 | 1,735 | 0,715 |

Tab. 12. Přehled stanovených titrů protilátek u dětí.

| ČÍSLO | KFR | IgG | AVIDITA | IgM | IgA | IgE |
|-------|---------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| 1D | >1:1024 | 6,849 | 14,2 | 4,627 | 3,786 | 2,98 |
| 2D | 1:1024 | 6,653 | 90,1 | 0,709 | 1,869 | 1,174 |
| 3D | >1:1024 | 7,036 | 22,6 | 3,434 | 2,818 | 2,044 |
| 4D | 1:128 | 2,492 | 8 | 2,125 | 0,476 | 0,442 |
| 5D | >1:1024 | 5,604 | 25,2 | 5,16 | 4,142 | 2,1 |
| 6D | 1:256 | - | - | 1,117 | - | - |
| 7D | 1:1024 | 2,966 | - | 3,362 | 3,017 | 1,313 |
| 8D | 1:1024 | 5,093 | 40,8 | 3,801 | 4,29 | 1,164 |
| 9D | >1:1024 | 6,393 | 59,2 | 1,384 | 1,457 | 2,242 |
| 10D | 1:512 | 4,363 | 67,2 | 1,173 | 2,505 | 0,939 |
| 11D | 1:128 | - | - | 1,193 | 0,602 | 0,556 |
| 12D | 1:256 | - | - | 1,572 | 0,689 | - |
| 13D | 1:512 | - | - | 0,924 | 0,933 | - |
| | průměr | 5,272 | 40,8 | 2,352 | 2,215 | 1,495 |

Celkové statistické shrnutí popisovaného souboru v tabulce číslo 13. obsahuje přehled počtu provedených vyšetření na celkové protilátky metodou KFR, na specifické protilátky třídy IgG, IgM, IgA, IgE a avidity IgG provedené metodou ELISA. Zahnuje výsledky jednotlivých vyšetřovaných skupin (ženy, gravidní ženy, muži, děti) a celkového počtu pacientů s akutní toxoplasmózou.

Tab.13. Statistický přehled sérologických výsledků.

| Přehled | F | % | GŽ | % | M | % | D | % | Σ | % |
|--------------------------------|----|-------|----|-------|----|-------|----|-------|-----|-------|
| Počet pacientů | 32 | - | 17 | - | 11 | - | 13 | - | 73 | - |
| Počet žádanek | 57 | - | 72 | - | 28 | - | 29 | - | 186 | - |
| Počet vyšetření KFR | 57 | - | 72 | - | 28 | - | 29 | - | 186 | - |
| KFR pozitivní | 57 | 100% | 71 | 98,6% | 28 | 100% | 29 | 100% | 185 | 99,5% |
| KFR negativní | - | - | 1 | 1,4% | - | - | - | - | 1 | 0,5% |
| IgG počet vyšetřených pac. | 20 | - | 16 | - | 8 | - | 9 | - | 53 | - |
| IgG celkový počet testů | 32 | - | 45 | - | 11 | - | 18 | - | 106 | - |
| IgG pozitivní testy | 32 | 100% | 45 | 100% | 11 | 100% | 18 | 100% | 106 | 100% |
| AVIDITA počet vyšetřených pac. | 9 | - | 16 | - | 6 | - | 9 | - | 40 | - |
| Avidita celkový počet testů | 14 | - | 38 | - | 7 | - | 14 | - | 73 | - |
| Avidita nízká | 9 | 63,3% | 17 | 44,7% | 4 | 57,1% | 5 | 35,7% | 35 | 47,9% |
| Avidita hraniční | 1 | 7,1% | 0 | 0 | 1 | 14,3% | 2 | 14,3% | 4 | 5,5% |
| Avidita vysoká | 4 | 28,6% | 21 | 55,3% | 2 | 28,6% | 7 | 50% | 34 | 46,6% |
| IgM počet vyšetřených pac. | 32 | - | 17 | - | 11 | - | 13 | - | 73 | - |
| IgM celkový počet testů | 57 | - | 72 | - | 28 | - | 29 | - | 186 | - |
| IgM pozitivní testy | 49 | 86% | 53 | 73,6% | 25 | 89,3% | 19 | 65,5% | 146 | 78,5% |
| IgM hraniční | 7 | 12,3% | 3 | 4,2% | 2 | 7,1% | 3 | 10,3% | 15 | 8,1% |
| IgM negativní | 1 | 1,7% | 16 | 22,2% | 1 | 3,6% | 7 | 24,2% | 25 | 13,4% |
| IgA počet vyšetřených pac. | 30 | - | 16 | - | 8 | - | 12 | - | 66 | - |
| IgA celkový počet testů | 52 | - | 66 | - | 19 | - | 25 | - | 162 | - |
| IgA pozitivní testy | 36 | 69,2% | 29 | 44% | 18 | 94,7% | 16 | 64% | 99 | 61,1% |
| IgA hraniční | 11 | 21,2% | 9 | 13,6% | 1 | 5,3% | 4 | 16% | 25 | 15,4% |
| IgA negativní | 5 | 9,6% | 28 | 42,4% | 0 | 0 | 5 | 20% | 38 | 23,6% |
| IgE počet vyšetřených pac. | 20 | - | 16 | - | 8 | - | 10 | - | 54 | - |
| IgE celkový počet testů | 36 | - | 45 | - | 15 | - | 20 | - | 116 | - |
| IgE pozitivní testy | 16 | 44,4% | 3 | 6,7% | 11 | 73,3% | 11 | 55% | 41 | 35,3% |
| IgE hraniční | 7 | 19,4% | 4 | 8,9% | 1 | 6,7% | 5 | 25% | 17 | 14,7% |
| IgE negativní | 13 | 32,6% | 38 | 84,4% | 3 | 20% | 4 | 20% | 58 | 50% |

5.2. Dotazníkové šetření

5.2.1. Vyhodnocení dotazníků zaslaných ošetřujícím lékařům pacientů s akutní toxoplazmózou.

Výběrová skupina pacientů s akutní toxoplazmózou, která činí 73 osob, byla rozdělena do 4 skupin a to na ženy (32 osob), gravidní ženy (17 osob), muže (11 osob) a děti (13 osob).

Kontakt s *Toxoplasma gondii*

V tabulce číslo 14. je popsán možný kontakt a nakažení pacientů oocystami *Toxoplasma gondii* při kontaktu s kočkou domácí (při hraní si s kočkami, při úklidu fekálií, ošetřování koček), při práci na zahradě a práci s pískem, hlínou či jinými přírodními materiály. Kontakt s domácími kočkami vykazovaly nejvíce děti (84,6%) a ženy (81,5%). Zahradničení nejvíce vykonávají gravidní ženy (70,6%). Nejvíce si hrají s pískem a hlínou děti (92,3%).

Tab. 14. Kontakt s *Toxoplasma gondii*

| Kontakt s toxoplazmózou | F | % | GŽ | % | M | % | D | % |
|-------------------------|----|-------|----|-------|---|-------|----|-------|
| Kočky | 26 | 81,3% | 11 | 64,7% | 6 | 54,5% | 11 | 84,6% |
| Práce na zahradě | 13 | 40,6% | 12 | 70,6% | 5 | 45,5% | 0 | 0% |
| Práce s pískem a hlínou | 28 | 87,5% | 15 | 88,2% | 6 | 54,5% | 12 | 92,3% |
| Bez kontaktu | 2 | 6,25% | 0 | 0% | 3 | 27,3% | 0 | 0% |

Konzumace masa

Tabulka číslo 15. popisuje možnost nakažení pacientů alimentární cestou při konzumaci masných výrobků. Jedná se především o konzumaci syrového nebo nedostatečně tepelně upraveného masa (tatarský biftek, grilované maso), ochutnávání masa při vaření (sekaná, játrová zavářka), konzumace masa z králíků a nutrií vykazujících možný kontakt s *Toxoplasma gondii* (s oocystami při spásání trávy).

Tab. 15. Konzumace masa.

| Konzumace masa | F % | GŽ % | M % | D % |
|--------------------|----------|----------|---------|---------|
| Syrové maso | 7 21,9% | 0 0% | 3 27,3% | 0 0% |
| Ochutnávání masa | 19 59,4% | 13 76,5% | 3 27,3% | 0 0% |
| Králičí maso | 17 53,1% | 13 76,5% | 3 27,3% | 6 46% |
| Nutrie | 4 12,5% | 3 17,6% | 0 0% | 2 15,4% |
| Bez konzumace masa | 4 12,5% | 2 11,8% | 5 45,5% | 6 46% |

Konzumace zeleniny

Tabulka číslo 16. nám ukazuje další možnost nákazy při konzumaci nedostatečně umyté zeleniny ze zahrady, na které se mohou vyskytovat oocysty pocházející z fekálií infikovaných koček. Jedná především o kořenovou zeleninu jako je mrkev, petržel, celer a ředkvičky, které jsou konzumovány i se slupkou.

Tab. 16. Konzumace zeleniny

| Konzumace zeleniny | F % | GŽ % | M % | D % |
|------------------------|----------|----------|---------|----------|
| Zelenina ze zahrady | 8 25% | 4 23,5% | 4 36,4% | 2 15,4% |
| Mrkev se slupkou | 12 37,5% | 8 47,1% | 3 27,3% | 5 38,5% |
| Ředkvičky a okurky | 28 87,5% | 15 88,2% | 9 81,8% | 11 84,6% |
| Bez konzumace zeleniny | 3 9,4% | 2 11,8% | 2 18,2% | 2 15,4% |

Uzlinový nález

Tabulka číslo 17. ukazuje kolik pacientů klinicky vykazovalo lymfadenitidu a u kolika z nich se jednalo o uzlinový syndrom (cervikální, okcipitální, axiální a inguinální uzliny) nebo se zvětšené uzliny vyskytovaly jednotlivě převážně jako cervikální či okcipitální. Také je zde popsáno kolik pacientů bylo takto klinicky negativních (bez uzlinového nálezu).

Tab.17. Uzlinový nález

| Uzlinový nález | F % | GŽ % | M % | D % |
|-----------------------|-----------|---------|---------|---------|
| Uzlinový nález celkem | 30 93,75% | 8 47,1% | 9 81,8% | 13 100% |
| Uzlinový syndrom | 18 56,3% | 4 23,5% | 6 54,5% | 9 69,2% |
| Jednotlivé uzliny | 12 37,5% | 4 23,5% | 3 27,3% | 4 30,8% |
| Bez uzlinového nálezu | 2 6,25% | 9 52,9% | 2 18,2% | 0 0% |

Ostatní klinické příznaky

Tabulka číslo 18. popisuje další možné (méně specifické) klinické příznaky u zkoumané skupiny pacientů s akutní toxoplazmózou. Jedná se především o bolest hlavy, zvýšenou teplotu, krátkodobou a dlouhodobou únavu, vyrážku, nevolnost, vomitus, zažívací obtíže, průjem. Někteří pacienti (převážně gravidní ženy) nevykazovali žádné z výše uvedených klinických příznaků.

Tab. 18. Přehled ostatních klinických projevů.

| Ostatní klinické příznaky | F | % | GŽ | % | M | % | D | % |
|---------------------------|----|-------|----|-------|---|-------|---|-------|
| Zvýšená teplota | 8 | 25% | 2 | 11,8% | 3 | 27,3% | 7 | 53,8% |
| Únava krátkodobá | 16 | 50% | 0 | 0% | 6 | 54,5% | 5 | 38,5% |
| Únava dlouhodobá | 9 | 28,1% | 0 | 0% | 2 | 18,2% | 3 | 23,1% |
| Vyrážka | 2 | 6,2% | 1 | 5,9% | 1 | 9,1% | 3 | 23,1% |
| Bolest hlavy | 12 | 37,5% | 1 | 5,9% | 5 | 45,5% | 3 | 23,1% |
| Zažívací obtíže | 2 | 6,25% | 0 | 0% | 1 | 9,1% | 0 | 0% |
| Průjem | 1 | 3,1% | 0 | 0% | 0 | 0% | 1 | 7,6% |
| Zvracení | 0 | 0% | 0 | 0% | 1 | 9,1% | 0 | 0% |
| Nevolnost | 3 | 9,4% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Nechutenství | 2 | 6,25% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Bez klinických příznaků | 5 | 15,6% | 13 | 76,5% | 1 | 9,1% | 2 | 15,4% |

Doplňující laboratorní vyšetření

Mezi doplňující laboratorní vyšetření hematologická patří krevní obraz, kde nás nejvíce zajímá celkový počet leukocytů, diferenciální rozpočet leukocytů a mezi biochemická vyšetření patří jaterní testy, při kterých se měří enzymová aktivita AST (aspartátaminotransferasa), ALT (alaninaminotransferasa).

Tab. 19. Hodnoty laboratorních vyšetření.

| Hodnoty laboratorních vyšetření | F % | GŽ % | M % | D % |
|---|------------|------------|------------|-------------|
| Leukocyty průměr | 8 - | 8 - | 9 - | 10 - |
| Diferenciální rozpočet leukocytů | | | | |
| - normální | 15 45,5% | 5 29,4% | 4 36,4% | 4 30,8% |
| - posun doleva | 3 9,4% | - - | 1 9,1% | 1 7,7% |
| Jaterní testy | | | | |
| - normální | 13 39,4% | 6 35,3% | 5 45,5% | 5 38,5% |
| - elevace | 5 15,6% | 2 11,8% | 3 27,3% | 1 7,7% |

Celkové shrnutí výsledků dotazníků

V tabulce číslo 20. je vyčíslen celkový přehled výsledků všech 73 infikovaných z naší výběrové skupiny pacientů s akutní toxoplazmózou.

Tab. 20. Shrnutí výsledků z dotazníků.

| Shrnutí dotazníků | Celkem | % |
|-----------------------------|--------|-------|
| Kočky | 54 | 74% |
| Práce na zahradě | 30 | 41,1% |
| Práce s hlínou a pískem | 61 | 83,6% |
| Bez kontaktu | 5 | 6,8% |
| Konzumace syrového masa | 10 | 13,7% |
| Ochutnávání masa při vaření | 35 | 47,9% |
| Konzumace králičího masa | 39 | 53,4% |
| Konzumace masa z nutrií | 9 | 12,3% |
| Bez konzumace masa | 17 | 23,3% |
| Konzumace zeleniny | 18 | 24,7% |
| Mrkev se slupkou | 28 | 38,4% |
| Ředkvičky a okurky | 63 | 86,3% |
| Bez konzumace zeleniny | 9 | 12,3% |
| Uzlinový nález | 60 | 82,2% |
| - z toho uzlinový syndrom | 37 | 50,7% |
| - z toho jednotlivé uzliny | 23 | 31,5% |
| Bez uzlinového nálezu | 13 | 17,8% |
| Zvýšená teplota | 20 | 27,4% |
| Únava krátkodobá | 29 | 39,7% |
| Únava dlouhodobá | 14 | 19,2% |
| Vyrážka | 7 | 9,6% |
| Bolest hlavy | 21 | 28,8% |
| Zaživační obtíže | 3 | 4,1% |
| Nechutenství | 2 | 2,7% |
| Průjem | 2 | 2,7% |
| Zvracení | 1 | 1,4% |
| Nevolnost | 3 | 4,1% |
| Bez klinických příznaků | 21 | 28,8% |

5.3. Kazuistika

Muž (46 let) po transplantaci progenitorových buněk kostní dřeně v imunosupresivní terapii. 6 týdnů od provedení transplantace se objevily klinické příznaky susp. pro mozkovou toxoplazmózu. Byl odebrán vzorek krevního séra k sérologickému vyšetření (výrobce KFR testů: Sevapharma, Praha; EIA testů: Test – Line, Clinical Diagnostic, Brno): KFR 1:512, IgG 2,216 (pozitivní), IgM 4,816 (pozitivní), IgA 1,555 (pozitivní.), IgE 1,220 (pozitiví), avidita IgG 35 (hraniční).

Vzhledem ke skutečnosti, že pacient měl před přípravou k transplantaci pozitivní výsledek testu na přítomnost IgG protilátek (IgG 2,256) a negativní výsledek ve třídě IgM (IgM 0,498), byla provedena biopsie mozku a histologické vyšetření k odlišení akutního toxoplazmového procesu v mozku od případných proliferačních ložisek.

Histologickým vyšetřením byla diagnostikována *Toxoplasma gondii* v materiálu z biopsie mozku a mozková toxoplazmóza byla potvrzena pozitivním průkazem DNA *T. gondii* metodou PCR. Po vizualizaci v agarózovém gelu byla patrná silná pozitivita v oblasti TGR1E genu.

Infekcionista byla indikována účinná terapie proti *T. gondii*. Pacient se klinicky po několika dnech značně zlepšil a je nadále hospitalizován v intermediárním oddělení integrovaného onkologického centra Fakultní nemocnice V Hradci Králové. Klinický stav je aktuálně komplikován bronchopneumónií s nálezem DNA *Pneumocystis jiroveci* metodou PCR.

6. Diskuze

Základem laboratorní diagnostiky toxoplazmózy v uvedené studii je detekce antitoxoplazmových protilátek ve vzorcích biologického materiálu metodou KFR (Sevapharma, Praha) a metodou EIA (Test – Line Clinical Diagnostic, Brno) pro průkaz jednotlivých tříd imunoglobulinů IgG, IgM, IgA, IgE a avidity IgG.

V námi sledované skupině pacientů s akutní toxoplazmózou byly hodnoty KFR testů vyšší než hraniční titer 1:32 a vysoké hodnoty titerů specifických protilátek ve třídě IgM, IgA, IgE a nízká IgG avidita, které jsou brány jako markery akutní infekce (4,11,13,17).

V souladu s literaturou (1,11,12,17,21,24) je metoda ELISA IgM citlivá, ale její nevýhodou je dlouhodobé přetrvávání positivity; k poklesu hodnot dochází 9 – 12 měsíců od nákazy. IgA protilátky přetrvávají 6 – 9 měsíců od nákazy. Stanovení třídy protilátek IgE je velmi specifickou metodou určení akutní toxoplazmózy, pozitivita u většiny pacientů nepřetrvává déle než 6 měsíců (9).

V naší studii 73 pacientů bylo ošetřujícími lékaři předepsáno 186 vyšetření KFR, z toho bylo pozitivních 185 (99,5%). Všichni pacienti měli pozitivní IgG protilátky. Nízkou aviditu IgG vykazovalo 47,9%; pozitivní protilátky IgM mělo 78,5%; IgA 61,1% a IgE 35,3% pacientů.

Montoya a spol. (17) doporučují z důvodu obtížnosti klinické interpretace sérologických nálezů u nemocných při podezření, při probíhajícím onemocnění a eventuálně latentní toxoplazmóze, průkaz akutní parazitémie v infikovaném organismu metodou PCR na přítomnost DNA *Toxoplasma gondii*.

Multicentrická studie WHO (Světová zdravotnická organizace) rizikových faktorů pro získání akutní toxoplazmózy proběhla v 6 evropských centrech. Rizikové faktory predikující nejčastěji akutní infekci byly požívání syrového a nedostatečně tepelně upraveného masa. Druh rizikového masa byl však různý. V norské studii bylo zjištěno jako rizikové polosyrové jehněčí a vepřové, zatímco ve Francii bylo rizikové hovězí nebo jehněčí, ale ne vepřové (25). Z naší studie vyplývá, že vysoká možnost nákazy je také alimentární cestou při konzumaci syrového masa (13,7%) a ochutnávání nedostatečně tepelně zpracovaných masitých pokrmů (47,9%). Nejvíce bylo konzumováno králičí

maso (53,4%), zajímavá je konzumace masa z nutrií v domácích chovech (12,3%).

Dle WHO byl kontakt s hlínou, pískem a zeleninou (kontaminovanými trusem koček s oocystami) také potvrzen jako rizikový faktor získání toxoplazmózy. V naší studii konzumovali pacienti zeleninu ze zahrady v 86,3%. Práci na zahradě vykazovalo 41,1% a kontakt s hlínou a pískem 83,6% pacientů (3).

V naší studii byla nejčastějším klinickým příznakem lymfadenitida u 82,2% pacientů, z toho 50,7% jako uzlinový syndrom a 31,7% jednotlivé zvětšené mízní uzliny. Bez uzlinového nálezu bylo 17,8% infikovaných a to převážně gravidní ženy. U dětí byla prokázána lymfadenitida ve 100% a nejméně čtený uzlinový nález vykazovaly gravidní ženy 47,1%. U 76,5% gravidních žen nebyly nalezeny jiné klinické příznaky.

Studie Paličky a spol.(18) uvádí, že onemocnění probíhá asymptomaticky u 9 z 10 (90%) gravidních žen. Klinické symptomy jsou tedy slabým indikátorem probíhající infekce.

V naší studii bylo 17 gravidních žen a jejich těhotenství bylo zakončeno 17 spontánními porody. Narodilo se 18 dětí (jedna dvojčata), z toho 11 chlapců a 7 děvčat. Všichni novorozenci vykazovali negativní sérologické testy a negativní ultrazvukové vyšetření mozku. V této studii nebyl zaznamenán žádný abortus ani případ kongenitální toxoplazmózy a to patrně z důvodu malého počtu vyšetřovaných gravidních žen. V České republice neexistuje organizovaný sérologický screening toxoplazmózy u těhotných žen jako je to například ve Francii a Rakousku (13,17).

Studie Paličky a spol.(18,20) vyhodnocuje screening 50 023 gravidit na Karvinsku, z nich 4 128 (8,3%) skončilo abortem a 45 860 (91,7%) porodem. Sérologicky pozitivních bylo 40,2% abortů a 40,0% porodů, většinou v nízkých titrech protilátek. Celkově v důsledku nákazy *Toxoplasma gondii* v graviditě bylo poškozeno 2,25 ‰ těhotenství a výskyt kongenitální toxoplazmózy činil 1,23 ‰.

Zkušenost z francouzské praxe, kterou popisuje Lécolier a spol. (13), je zaměřena na dvě úrovně prevence. Primární prevence má uchránit těhotnou ženu před primární infekcí *T. gondii*. Prostředky primární prevence zahrnují zjištění, zda žena před otěhotněním či na začátku těhotenství nebyla

infikována; informovat ženy o hygienických a dietických zásadách. Sekundární prevence má zabránit infekci plodu, a nebo pokud je již infikován, zamezit jeho závažnému poškození. Prostředky sekundární prevence jsou: pravidelná měsíční sérologická vyšetření; léčba ženy spiramicinem; prenatální diagnostika a prenatální léčba plodu.

7. Závěr

Prvok *Toxoplasma gondii* je celosvětově nejrozšířenější parazit. V České republice je prevalence toxoplazmózy okolo 30 – 50%. Ve Francii, kde je monitoring výskytu toxoplazmózy nejpropracovanější se uvádí prevalence okolo 70%.

Naše výběrová skupina pacientů s akutní toxoplazmózou vykazovala všechny markery akutní infekce a to KFR vyšší než hraniční titr 1:32, hodnoty IgG, IgM, IgA a IgE vyšší než hodnota 1 u indexu positivity. Avidita IgG jako marker akutní infekce musí být nižší než hodnota indexu avidity 35.

Pozitivní KFR mělo 99,5% pacientů, 1 gravidní žena vykazovala KFR 1:16. Všech 73 pacientů mělo pozitivní hodnoty titrů IgG imunoglobulinů. Pozitivní IgM bylo v 78,5%, IgA v 61,1% a IgE v 47,9%.

V této retrospektivní studii jsme vyhodnocovali možné rizikové faktory získání infekce prvokem *Toxoplasma gondii*. Jedním z možných rizikových faktorů je chov a pravidelný kontakt s kočkami, který vykazovalo 74% pacientů (nejvíce děti 84,6%), práci na zahradě provádělo pravidelně 41,1% dotazovaných (nejvíce gravidní ženy 70,6%) a kontakt s hlínou a pískem uvedlo 83,6% pacientů (nejvíce děti 92,3%). Kontakt s kočkami nevykazovalo 6,8% dotázaných.

Důležitou cestou nákazy je konzumace infikovaného nedostatečně tepelně upraveného masa. Syrové maso (například tatarský biftek, krvavé steaky) konzumovalo 13,7% dotázaných (nejvíce muži 27,3%), ochutnávání masitých pokrmů při vaření potvrdilo 47,9% osob (nejvíce gravidní ženy 76,5%). Nejvíce bylo konzumováno králičí maso 53,4% (nejčastěji gravidní ženy 76,5%). Možným rizikovým faktorem je i maso z nutrie, které konzumuje 12,3% dotázaných (gravidní ženy 17,6%). Ostatní druhy masa nebyly předmětem naší studie. Maso syrové a uvedené vybrané druhy nekonzumuje 23,3% pacientů.

Přenos nákazy alimentární cestou při konzumaci zeleniny ze zahrady je dalším rizikovým faktorem vzniku infekce. Konzumaci zeleniny ze zahrady uvedlo 24,7% infikovaných (nejvyšší muži 36,4%), mrkev se slupkou pojídalo 38,4% pacientů (nejvíce gravidní ženy 47,1%), konzumaci ředkviček a okurek

uvedlo 86,9% osob (nejčastěji gravidní ženy 88,6%). Bez syrové zeleniny v jídelníčku se obešlo 12,3% dotázaných.

Pacienti s akutní toxoplazmózou v naší výběrové skupině klinicky vykazovali v 82,2% případů uzlinový nález (nejvíce děti 100%, nejméně gravidní ženy 47,1%), z toho byl uzlinový syndrom v 50,7% případů(nejčastěji děti 69,2%) a jednotlivé uzliny v 31,5% případů (nejvíce ženy 37,5%). Bez uzlinového nálezu bylo 17,8% osob.

Mezi jiné klinické příznaky patřily nejčastěji zvýšená teplota 27,4% osob (nejvíce děti 53,8%), krátkodobá únava 37% (nejvíce muži 54,5%), dlouhodobá únava 19,2% (nejvíce ženy 28,1%) a bolest hlavy 28,8% (nejčastěji muži 45,5%).

Doporučení WHO k účinné ochraně před toxoplazmózou jsou : konzumace pouze dobře tepelně upraveného masa (hovězí, skopové, vepřové a v ČR hlavně králičí maso). Nezbytné je, aby se maso i uvnitř prohřálo na teplotu minimálně 65 °C po dobu alespoň 20 minut. Vyhýbání se uzenému a grilovanému masu. Při vaření je důležité důkladné omytí zeleniny, kuchyňského náčiní a stolu a po manipulaci s masem omytí rukou. Jíte-li mimo domov, nejezte syrovou zeleninu a z masa si vybírejte raději ryby a drůbež.

Vyhýbejte se kontaktu s kočičím trusem a se vším, co by mohlo být kočičím trusem kontaminováno. Při úklidu po kočkách je vhodné používat rukavice a po úklidu si omýt ruce. Používat rukavice i při práci na zahradě, vyhýbat se kontaktu s hlínou a ruce si po práci pečlivě umýt a to i v případě, že jste pracovali v rukavicích.

Vzhledem ke skutečnosti, že u imunokompetentních jedinců probíhá toxoplazmóza zpravidla s lehkými klinickými příznaky a bez příznaků, platí výše uvedená doporučení především u gravidních žen jako prevence kongenitální toxoplazmózy a u speciálních kategorií pacientů s imunosupresí (léčba onkologických onemocnění, pacienti v procesu transplantace orgánů, progenitorových buněk kostní dřeně apod).

8. Literatura

1. Ashburn A., Joss A. W. L.: Do IgA, IgE a IgG avidity tests have any value in the diagnosis of toxoplasma infections in pregnancy? *J Clin Pathol* 1998;51: 312-315.
2. Bastien P.: Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Transaction of the Royal society of Tropical medicine and hygiene* 2002;96 (Suppl 1): 205-215.
3. Breugelmans Maria, Naessens Anne: Preventions of toxoplasmosis during pregnancy - epidemiologic survey over 22 consecutive years. *J. Perinat. Med.* 2004;32: 211-214.
4. Buffolano W., Lappalainen M.: Delayd maturation of IgG avidity in congenital toxoplasmosis. *Eur J Microbiol Infect Dis* 2004;23: 825-830.
5. Buchta V., Förstl M., Jílek P., Kubanová P: Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví. *Avicenum* 2002.
6. Čatár G., Červeň D., Jalili N.: *Toxoplasma gondii*. *Bratisl Lek Listy* 1998;99 (11): 579-583.
7. Čermáková Z., Plíšková L.: Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) v diagnostice toxoplazmózy. *Acta Medica* 2004;47 (2): 71-73.
8. Dubey J. P.: Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol* 2004;126: 57-72.
9. Fouadrinier F., Villena I.: Clinical Value of Specific Immunoglobulin E Detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in CASE of Acquired and Congenital Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2003;41 (4): 1681-1686.
10. Hrodek O., Vavřinec J.: *Pediatric. Galén* 2002.

11. Kodym P., Tolarová V.: Laboratorní diagnostika toxoplasmózy. Klinická mikrobiologie. Remedica 1998;2 (7): 224-226.
12. Lappalainen Maija, Hedman Klaus: Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. Ann ist super Sanita 2004;40 (1): 81-88.
13. Lécolier R.: Prevence kongenitální toxoplasmózy: zkušenost z francouzské praxe. Klinická mikrobiologie. Remedica 1999;3 (8): 248-254.
14. Lobovská A., Nohýnková E.: Parazitární nemoci častého výskytu (kromě střevních infekcí) – postupy pro terénní praxi. Projekt MZ ČR 2002.
15. MacLaren A., Attis M., de Souza W.: Aspects of the early moments of interaction between tachyzoites of *Toxoplasma gondii* with neutrofiles. Vet Parasitol 2004;125: 301-312.
16. Montoya J. G., Liesenfeld O.: Toxoplasmosis. Lancet 2004;363: 1965-1976.
17. Montoya Jose G.: Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis. The Journal of Infectious Diseases 2002;185 (Suppl 1): 73-82.
18. Palička P., Slabá H., Zitek K.: Aktivní ovlivňování kongenitální toxoplasmózy v populaci. Praktická gynekológia 1998;5 (1): 23-27.
19. Pataki M., Mészner Z., Todorova R.: Congenital Toxoplasmosis. International Pediatrics 2000;15 (1): 33-36.
20. Petersen Eskild, Magorzata Paul: Prevalence of Congenital *Toxoplasma gondii* Infection among Newborns from Poznań Region of Poland: Validation of a New Combined Enzyme Immonoassay for *Toxoplasma gondii* – Specific Immunoglobulin A and Immunoglobulin M Antibodies. J Clin Microbiol 2001;39 (5): 1912-1916.

21. Roberts A., Hedman K.: Multicenter Evaluation of Strategie for Serodiagnosis of Primary Infection with *Toxoplasma gondii*. Eur J Microbiol Infect Dis 2001;20: 467-474.

22. Roberts F., McLeod R.: Pathogenesis of Toxoplasmic Retinochoroiditis. Parasitology Today 1999;15 (2): 51-57.

23. Slivkova D., Gerinec A.: Ocular sytmatology of toxoplasmosis in children. Bratisl Lek Listy 1999;100 (5): 259-262.

24. Suzuki Lisandra A., Rocha Rosangela J.: Evaluation of serological markers for the immunodiagnosis of acute acquired toxoplasmosis. J Med Microbiol 2001;50: 62-70.

25. Zitek K.: Zdroje toxoplazmové infekce u gravidních žen. Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2000;9 (11): 464-465.

FOTOGRAFIE:

Obr. 2. Jizvení chorioretiny. <http://www.emedicine.com/OPH/topic707.htm>

Obr. 3. Intrakraniální kalcifikace. <http://www.emedicine.com/radio/topic703.htm>

Obr. 4. Hydrocefalus a mikroftalmus u kongenitální toxoplazmózy. J.P.Dubey
<http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch084.htm>

Obr. 5. Interpretace výsledků CIP-WB. Fotografie pořízena z manuálu od firmy LDBIO DIAGNOSTIC, Lyon, Francie.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „**Laboratorní diagnostika toxoplazmózy**“ vypracovala samostatně s konzultační pomocí mého školitele. Použité prameny jsou uvedeny v literárních odkazech.

V Hradci Králové

Dne 2. května 2006

Martina Kovářová

.....
podpis