

Ústav mikrobiologie LF UK a FN v Plzni

DIZERTAČNÍ PRÁCE

**Toxoplazmóza – vybrané epidemiologické charakteristiky a
plzeňské laboratorní zkušenosti**

Plzeň 2006

RNDr.Karel Fajfrlík

**Disertační práce kombinované formy doktorského studijního programu
mikrobiologie LF UK v Plzni**

**Toxoplazmóza - vybrané epidemiologické
charakteristiky a plzeňské laboratorní zkušenosti**

Autor:

RNDr. Karel Fajfrlík

Školitel:

Doc.MUDr.Petr Pazdiora,CSc.

Pracoviště:

Ústav mikrobiologie LF UK a FN v Plzni, dr.E.Beneše 13, Plzeň 305 99

Plzeň 2006

Obsah:

Úvod	6
1. Historie poznatků o toxoplazmóze	7
2. Systematické zařazení původce	8
3. Morfologie parazita	10
4. Životní cyklus	12
5. Klinické příznaky	14
5.1. Formy onemocnění	14
6. Epidemiologie toxoplasmózy	20
6.1. Zdroj infekce	20
6.2. Výskyt protilátek v lidské populaci	21
6.3. Výskyt protilátek u zvířat	21
6.4. Počet onemocnění ve světě	22
6.5. Počet onemocnění v ČR	22
7. Prevence před onemocněním	24
7.1. Vakcinace	25
8. Imunitní odpověď organismu	26
9. Diagnostické metody	28
9.1. Metody přímého průkazu	28
9.1.1. Mikroskopický průkaz	29
9.1.2. Izolační pokus	29
9.1.3. Detekce nukleové kyseliny	30
9.2. Metody nepřímého průkazu	30
9.2.1. Průkaz antitoxoplazmových protilátek	30
9.2.1.1. Průkaz protilátek v séru	31
9.2.1.1.1. Sabinova – Feldmanova reakce	31
9.2.1.1.2. Komplementfixační reakce	32
9.2.1.1.3. Imunofluorescenční reakce	32
9.2.1.1.4. Hemaglutinační reakce	32
9.2.1.1.5. Precipitační reakce v svarovém gelu	33
9.2.1.1.6. Aglutinační reakce	33
9.2.1.1.7. Flokulační reakce	33

9.2.1.1.8. Neutralizační reakce	33
9.2.1.1.9. ELISA reakce	34
9.2.1.1.10. Western blot	34
9.2.1.2. Intradermální test	35
10. Interpretace sérologických vyšetření	35
11. Cíle práce	39
12. Materiál a metodika	40
12.1. Soubor vyšetřených	40
12.2. Laboratorní metody v ČR	40
12.3. Vyšetřovací schéma	40
12.4. Statistické zpracování	41
12.5. Laboratorní metody použité naší laboratoří	42
12.5.1. Komplementfixační reakce	42
12.5.2. Mikroprecipitace v agaru	50
12.5.3. Detekce specifických imunoglobulinů ELISA reakcemi	51
12.5.3.1. Imunoglobuliny IgG	51
12.5.3.2. Imunoglobuliny IgM	53
12.5.3.3. Imunoglobuliny IgA	56
13. Výsledky	59
13.1. Charakteristika vybraného souboru	59
13.2. Rozložení titrů u vyšetřeného souboru	60
13.3. Celkový počet hlášených onemocnění do informačního systému hygienické služby (EPIDAT)	62
13.3.1. Počet hlášených případů ve vztahu k bydlišti	63
13.3.2. Počet hlášených případů dle nejpravděpodobnějšího zdroje infekce	64
13.3.3. Rozdělení dle formy onemocnění	65
13.3.4. Sezónnost záchytů	67
13.3.5. Rozložení titrů v KFR	69
13.3.6. Přítomnost specifických imunoglobulinů IgM a IgA	70
13.3.7. Srovnání počtu vyšetření a pozitivních osob v období 1996-2000 a 2001-2004	72
13.4. Nemocnost a počet vyšetřených v jednotlivých	

věkových skupinách	73
13.5. Přítomnost protilátek u zdravé ženské populace	75
14. Diskuse	78
15. Závěry	89
Literatura	90

Úvod

Historii výzkumu parazita *Toxoplasma gondii* lze rozdělit do několika etap. Po jeho objevení a popsání v roce 1908 se v dalších letech badatelé soustředili převážně na odhalování biologických vlastností prvoka a vztahů s mezipřenositeli. Až po roce 1923 se pozornost upřela na jím vyvolané onemocnění - toxoplazmózu a její zdravotnický význam pro člověka. Objevilo se mnoho teorií, později potvrzovaných i vyvrácených, které souvisely s úrovní a rozvojem poznání. Postupně byly popisovány její rozmanité formy a jejich vliv na zdraví člověka. V současnosti lze u toxoplazmózy vyčlenit dvě jasně vyhraněné skupiny lidí s největším možným zdravotním rizikem. Jsou to imunosuprimovaní pacienti a těhotné ženy. Právě role toxoplazmózy jako jedné z oportunních infekcí u HIV pozitivních pacientů a problematika možného přenosu infekce z matky na plod otevřely novou etapu výzkumu. V současnosti se stále častěji hovoří o možné manipulaci lidské osobnosti při trvalé perzistenci parazita v těle a o možné souvislosti s výskytem schizofrenie u člověka.

Že je nutné se tímto parazitem intenzivně zabývat, dokládá i jeho celosvětové rozšíření a prokázaný výskyt v populaci. V některých oblastech světa je prokázaná přítomnost protilátek až u 80 % lidí. V České republice je to v různých krajích od 25 do 50 %.

Výzkum problematiky toxoplazmózy má velkou tradici i v naší zemi. Český oftalmolog dr. Janků se zapsal nesmazatelně k odborným veličinám při řešení kongenitální toxoplazmózy.

Českoslovenští odborníci významně přispěli i k rozvoji laboratorní diagnostiky tohoto onemocnění. Na zavádění nových metod i inovaci používaných se podílela celá řada předních parazitologů na akademické půdě i ve zdravotnických zařízeních. Hlavní cíle těchto inovací zůstávají po léta stejné: co nejpřesněji určit fázi onemocnění. To má největší význam zejména při interpretaci sérologických vyšetření těhotných žen.

1 Historie poznatků o toxoplazmóze

Prvok *Toxoplasma gondii* byl objeven a popsán v roce 1908 v Tunisu u severoafrické pamyši hřebenoprsté *Ctenodactylus gondi*. Od té doby přibývaly další záchyty u různých druhů zvířat (mezihostitelů) a často i podle nich nazývány (*Toxoplasma alencari*, *Toxoplasma brumpti*, *Toxoplasma colubri*, *Toxoplasma hammondi*, *Toxoplasma ranae*, *Toxoplasma .serpai* atd.). Tak se počet pojmenování tohoto prvoka neustále zvyšoval. Celková suma druhových jmen, která se v historii výzkumu objevila, dosáhla čísla 40. Okolo roku 1952 ale opět začíná převládat unitaristický názor. Je třeba připomenout, že se v literatuře objevuje zpočátku velké množství poznatků převážně z oblasti biologie tohoto prvoka. Jeho závažnost a dopady na zdraví člověka z klinického hlediska a popisy nově objevených skutečností zůstávaly zpočátku na okraji zájmu (1).

Zprávy o možnosti infikovat člověka se objevují od roku 1914, ale důkazy jsou sporné. Až v roce 1923 byla toxoplazmóza prokazatelně označena jako lidské onemocnění českým oftalmologem dr. Josefem Janků, který u dítěte zemřelého na kongenitální hydrocephalus popsal tkáňové cysty v chorioretinických lézích a od počátku byl přesvědčen o parazitárním původci onemocnění (2).

První zmínky o významu koček v biologii *T. gondii* s návazností na člověka se objevují koncem 60. let minulého století. Tak bylo prokázáno, že pro tohoto prvoka je definitivním hostitelem kočka a některé další kočkovité šelmy. Člověk v životním cyklu plní pouze roli mezihostitele (3,4,5).

Odhalování a popisy klinických příznaků onemocnění sice přibývaly, ale laboratorní pracovníci věnovali více pozornosti objevování a zavádění nových diagnostických metod. Jejich cíl byl jediný: co možná nejpřesněji určit fázi infekce s důrazem na akutní období. To měla specifikovat detekce imunoglobulinů produkovaných organismem v časně fázi onemocnění - imunoglobuliny IgM. (6). Po zjištění skutečnosti, že u některých pacientů přetrvává výjimečně tato třída imunoglobulinů až 3 roky (zcela běžně 1 rok), byla zavedena do rutinní diagnostiky detekce imunoglobulinů IgA (7). To má zásadní význam v interpretaci výsledku při vyšetřování gravidních žen a při následné péči o ně. (Metody viz kapitola Materiál a metodika).

Úroveň poznání o toxoplazmóze a nejdůležitější oblasti současného bádání lze tedy shrnout následovně:

1. Je to patrně jeden z nejrozšířenějších parazitů.
2. I v mírném podnebném pásmu patří mezi nejzávažnější parazitózy díky možným negativním důsledkům pro imunosuprimované lidi a v případě primoinfekce ženy v graviditě i pro plod.
3. Člověk není pro původce onemocnění finálním hostitelem, ale pouze mezihostitelem. Vedle člověka může být těmito mezihostiteli celá řada dalších obratlovců.
4. Definitivním hostitelem je kočka a některé kočkovité šelmy jako jeden z možných zdrojů infekce pro člověka, a proto je onemocnění řazeno mezi zoonózy. (Jako definitivního hostitele označujeme toho, ve kterém parazit pohlavně dospívá a dokončuje pohlavní rozmnožování.)

Ve zdravotnictví se zájem soustřeďuje na výzkum následujících problémů:

- toxoplazmóza a těhotenství
- toxoplazmóza a imunosuprimovaní lidé
- oční forma onemocnění
- toxoplazmóza a psychika člověka
- laboratorní či klinické určení fáze infekce, odlišení primoinfekce od reinfekce nebo reaktivace

2 Systematické zařazení původce

Klasifikační systémy a systematické zařazení všech organizmů jsou v neustálém vývoji. Doslova revoluci v těchto náhledech způsobilo používání molekulárně biologických metod a řazení jednotlivých taxonů dle podobnosti nukleových kyselin nebo jejich segmentů, zvláště pak sekvenování malých podjednotek rRNA. Odborníci se shodují, že díky neustálému vývoji má jakýkoliv současný systém prvků pouze dočasnou platnost. Rovněž je připouštěn stav, kdy pro výuku a neformální účely mohou být akceptovány termíny jako bičíkovci, améby, rizopoda atd. pouze na základě určitého typu organizace. Pro označení taxonomických skupin to ale není přijatelné.

Vznik prvních systémů prvoků se dá datovat od dob van Leeuwenhoeka. Až do 20. století byla hlavním taxonomickým kritériem morfologická podobnost. První systém prvoků byl navržen Butschlim (Butschli 1881) s jediným kmenem (Protozoa) a čtyřmi třídami (Sarcodina, Sporozoa, Mastigophora a Infusoria). Na základě pokračujícího výzkumu ultrastruktur prvoků se měnil i pohled na jejich taxonomické zařazení, který si vyžadoval četné změny. Jedna z důležitých revizí, na které se podíleli i naši protozoologové, byla publikována v roce 1980, rozlišuje již 7 kmenů (8).

Od tohoto roku prochází taxonomie neustálým vývojem a je soustavně upřesňována. Do současnosti byla několikrát upravena a tento trend bude samozřejmě pokračovat (9,10,11,12).

Důsledkem těchto velmi rychlých změn jsou dnes vydávané protozoologické monografie bez publikování jakýchkoliv systémů. Důkazem je i poslední monografie, z roku 1996 (originál v angličtině), přeložená Lomem a vydaná v češtině v roce 2003 (13). Jsou zde popisovány různé systémy, které se objevily v době od vydání originálu po vydání českého překladu s vizi potřebných a nutných změn do budoucnosti.

Podle jednoho z posledních dnes uznávaných systémů rozlišujeme 13 kmenů protozoí a taxonomické zařazení prvoka *T. gondii* je v současnosti následující (14).

Nadříše: **EUKARYOTA**
Chatton, 1925

Říše: **MASTIGOTA**
Hulsmann a Hausmann, 1994

Podříše: **DIMASTIGOTA**
Hulsmann a Hausmann, 1944

Nadkmen: **METACARYOTA**
Cavalier-Smith, 1991

Kmen: **Alveolata**
Cavalier-Smith, 1992

Podkmen: **Apicomlexa** (dříve tento taxon prezentován na úrovni kmene)
Levine, 1970

Třída: **Coccidea**

Leuckart, 1879

Řád: **Eimeriida**

Léger, 1911

Do tohoto řádu kromě prvoka *Toxoplasma gondii* patří také zástupci dalších cizopasných prvoků jako je: *Cryptosporidium*

Eimeria

Frenkelia

Isospora

Sarcocystis

Ani tento systém není definitivní a v budoucnosti se přílivem nových poznatků bude jistě měnit. Názor na zařazení do podkmenu (kmenu) Apikomplexa spojuje všechny tvůrce dosud existujících systémů.

3 Morfologie parazita

Tvar těla tohoto prvoka je konkávokvexní, plankvexní nebo oválný. Povrchová membrána je dvoulamelová, z nichž vnitřní je silnější. Na předním pólu buňky tvoří pelikula třívrstevnou prstencovitou strukturu – apikální prstenec.

Charakteristickým znakem všech zástupců podkmene Apikomplexa je apikální komplex, který dal celé skupině i jméno. V současnosti je to jeden z nejstudovanějších souborů organel. Prvok jej využívá hlavně k průniku do hostitelské buňky (15). Patří sem již zmíněný apikální prstenec, konoid a mikrotubuly (cytoskeletální výbava) a dále žláznaté komponenty (mikronemy, rhoptrie, denzní granula). Všechna tato zařízení slouží k pohybu buňky (mikronemy), nalezení vhodné hostitelské buňky (konoid a mikronemy), průniku do hostitelské buňky (konoid a rhoptrie), úpravě prostředí parazitoformní vakuoly (rhoptrie a denzní granula) a prostředí parazitované buňky a jejího dalšího osudu (řada genových produktů) (16). Genom je složen s 8×10^7 párů bazí (17).

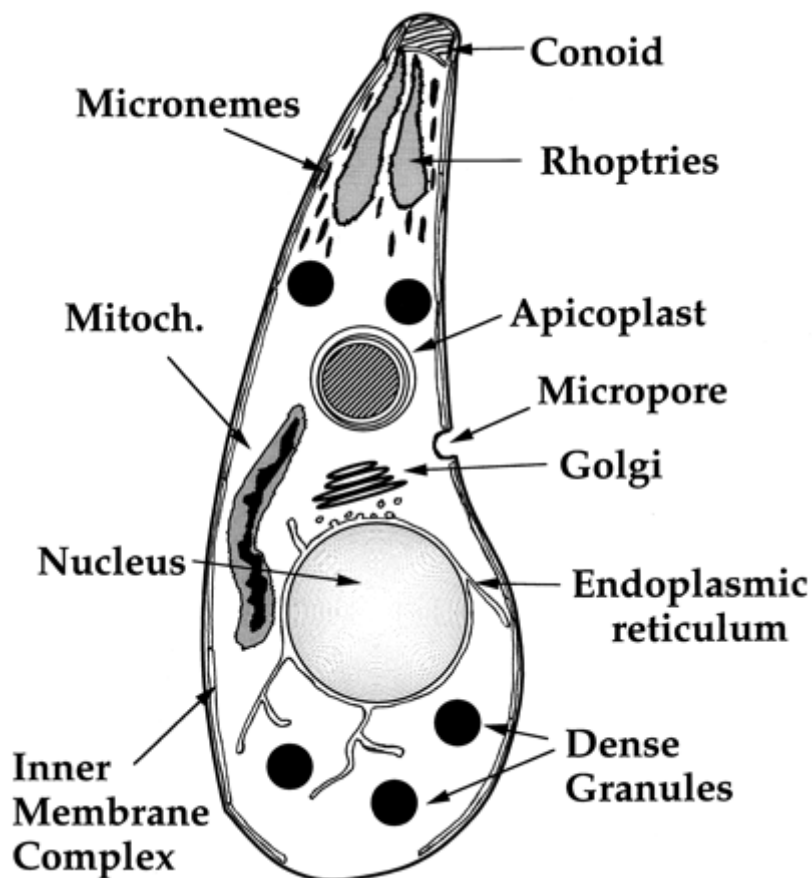
Pomocí syntetických peptidů (18) je druh *T. gondii* je rozlišován do tří typů: I, II a III dle virulence a epidemiologických modelů (19,20). Typ II je častěji izolován u HIV pozitivních pacientů, typy I a II jsou popisovány u kongenitálních forem a typ III

se častěji vyskytuje u zvířat (21). Mezi rozdílně virulentními kmeny *T. gondii* je možná rekombinace (22).

Dříve byla popisována pouze jaderná DNA, dnes víme, že v jedné buňce jsou genomy tři:

1. Jaderná DNA (25 Mb)
2. Mitochondriální DNA (5,9 kb). Jde o vývojový relikv proteobakterií, které se účastnily v dávné historii na výstavbě prvních eukaryotických buněk.
3. Genom plastidu (apikoplast) (35 kb) organely rostlinného původu.
Dnes asi nejsledovanější organela celého taxonu.

Obr.1: *Toxoplasma gondii*. Organely tachyzoitů. (M.W. Black 2000) (23)



4 Životní cyklus

Při popisu jednotlivých klinických příznaků narážíme u člověka na výskyt odlišných stádií tohoto prvoka v určité fázi infekce. Jednotlivá stadia mají rozdílný vliv na epidemiologii, respektive způsob nákazy jedince. Někdy velmi těsně souvisí s klinickými příznaky .

Ve srovnání s ostatními druhy kokcií má toxoplazma schopnost absolvovat jak jedno, tak vícehostitelský vývojový cyklus. Jednohostitelský vývoj může probíhat celý v kočkovitých šelmách, při vícehostitelském cyklu část asexuálního množení probíhá v orgánech různých druhů mezipřehostitelů.

Definitivní hostitel - kočka se infikuje požitím tachyzoitů, bradyzoitů nebo sporozoitů (5,24,25,26,27,28,29).

Konečným výsledkem pohlavního cyklu v zaživacím traktu je tzv. **oocysta**. Její velikost je 12-15 x 10-13 μm .

Oocysty jsou vylučovány nevysporulované - neinfekční. Sporulují až ve vnějším prostředí během 1–5 dnů (závisí na teplotě a provzdušnění prostředí). Vždy obsahují dvě sporocysty velikosti 8-10 x 6-8 μm . Každá sporocysta obsahuje 4 sporozoity (2x8 μm) (30). Jimi se může infikovat mezipřehostitel (včetně člověka), ale i kočka.

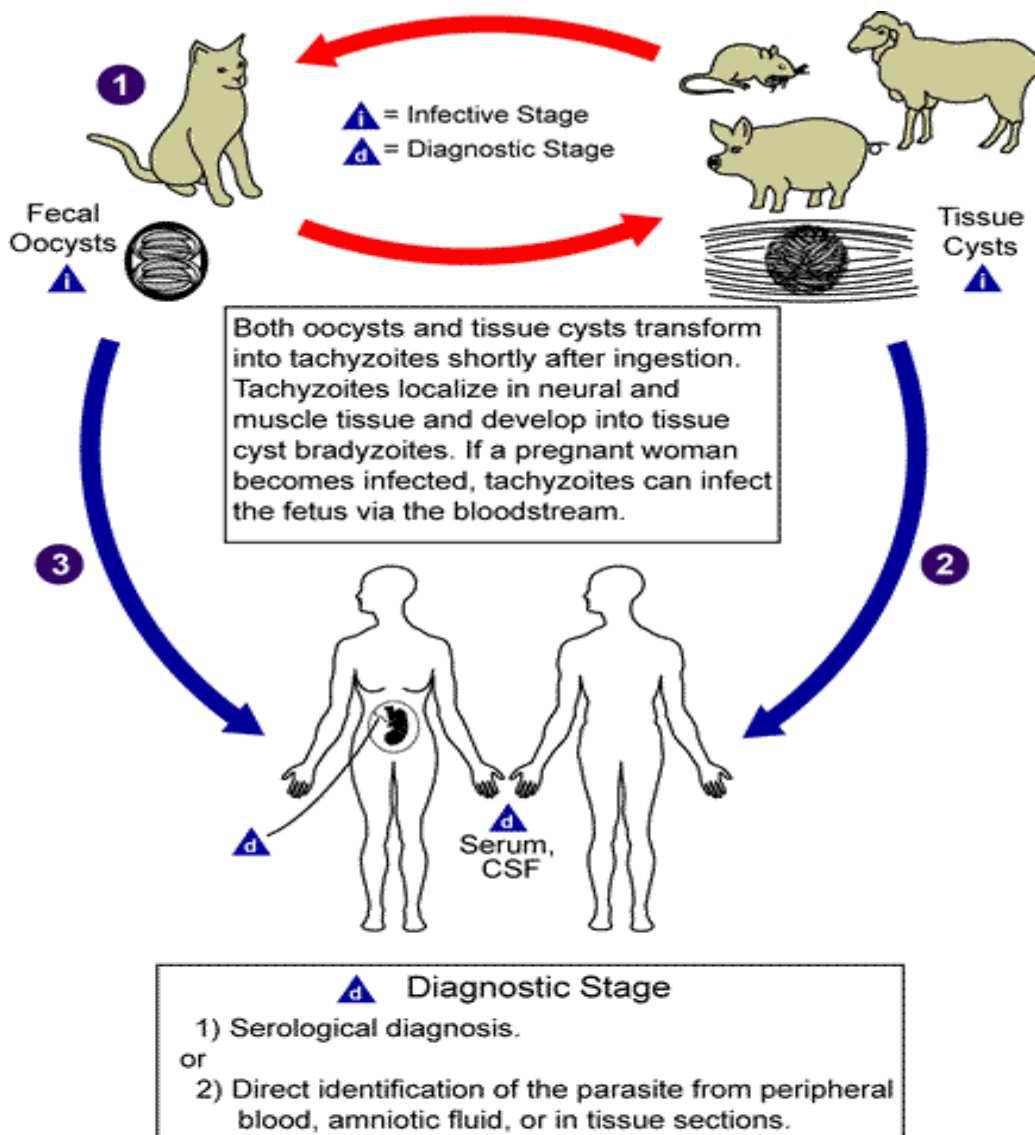
V mezipřehostitelích se setkáváme se dvěma formami: tachyzoit a bradyzoit. **Tachyzoity** jsou nejdéle známou formou parazita a vyskytují se v akutním stadiu infekce. Jejich velikost je 4-8 x 2-4 μm) (31). Mají půlměsíčitý tvar a mohou se vyskytovat u hostitele jednak volně nebo intracelulárně. Mají schopnost asexuálního množení. Při *i n v i t r o* pokusech bylo zjištěno, že jejich generační doba uvnitř buňky se pohybuje od 6 do 8 hodin. Množení probíhá do smrti buňky. Jejich počet v hostitelské buňce se pohybuje od 64 do 128 (32). Jsou většinou obklopeny parazitoformní vakuolou, která je chrání před působením hostitelových obranných mechanismů (33).

Mohou infikovat buňky různých tkání organismu včetně centrálního nervového systému (CNS), kosterní i srdeční svalovinu, oko, placentu.

Bradyzoity jsou nazývána klidová intracelulární stadia parazita. Vznikají po průniku tachyzoitů do buněk a po jejich namnožení. Shluk bradyzoitů označujeme jako tzv. **tkáňovou cystu**. Obsahuje až tisíce parazitů. Může se vytvořit v jakémkoliv

orgánu, ale nejčastěji v buňkách CNS a kosterní svalovině. Tyto cysty jsou charakteristické pro chronickou infekci, jsou obklopeny membránou a jsou značně odolné proti mechanickým vlivům. Přežívají i v imunokompetentním mezipříteli po celý život a jsou infekční pro definitivního hostitele i mezipřítel. V případě oslabení imunity mohou způsobit reaktivaci onemocnění (34, 35).

Obr.2: Vývojový cyklus *T. gondii* (Materiály CDC) (36)



5 Klinické příznaky

Klinické projevy toxoplazmózy nejsou vždy typické. U většiny imunokompetentních osob probíhá infekce asymptomaticky, její faktický výskyt v populaci je zjišťován pomocí tzv. sérologických přehledů a nebo údaje získáváme při vyšetřování gravidních žen, kdy je vyšetřována klinicky zdravá ženská populace. V současnosti je prezentován poměr 10 % onemocnění s klinickými příznaky a 90 % případů s asymptomatickým průběhem (37).

Podle převažujících a nebo výrazných klinických příznaků dělíme onemocnění na tzv. klinické formy onemocnění.

5.1 Formy onemocnění

Dělením onemocnění na jednotlivé formy podle převažujících nebo nejvýraznějších klinických příznaků se odborníci zabývají od objevení jeho významu pro člověka. Zdravotnický dopad na lidstvo nebo biologii parazita samozřejmě toto třídění neovlivňuje, ale z epidemiologického hlediska význam nepochybně má. Historicky se objevuje mnoho pokusů o nejpřesnější terminologii, ale jen některá má logiku, byla využívána a zachovala se do současnosti. Vždy se ale jedná o dělení více méně umělé, ne vždy komplexně vystihující celý problém. Problematiku komplikuje otázka, zda příznaky (podklady) pro přiřazení k určité formě jsou primární, nebo důsledek jiné příčiny, reinfekce toxoplazmózou nebo reaktivace vývojového stádia parazita. Pochopitelně nejvíce nesnází někdy přináší pocit nutnosti pojmenování formy „za každou cenu“ - jako jsme svědky při detekci vysokých titrů protilátek a pozitivitách specifických imunoglobulinů třídy IgM u klinicky zdravých pacientů, převážně gravidních žen (viz níže).

Řada autorů oponuje vysvětlením, že při této infekci je vždy postižen celý organismus, všechny orgány a klinické příznaky jsou jen momentálním projevem potíží nejpostiženějšího orgánu.

Základní dělení dle období života člověka, na kterém se shodli snad všichni odborníci, se užívá dodnes. Je to:

- a) vrozená toxoplazmóza (kongenitální)

b) získaná toxoplazmóza.

Převážně onemocnění získané se pak dále dělilo do specifitějších, více či méně důležitých podskupin velmi rozmanitých podle různých autorů. Nejpodrobnější přehled o vývoji rozlišování forem podává monografie Toxoplazmóza autorů Kouba, Jíra, Hübner (38).

Patrně první práce s pokusem o co nejdůležitější rozdělení se objevila v roce 1968 (39). Tento autor dělí toxoplazmózu na :

1. Získanou formu uzlinovou
2. Formu septickou či hematogenní
3. Formu viscerální
4. Formu frustní a inaparentní.

V dalších letech dochází k řadě změn a pohledů na zařazení. Tak se objevují formy:

Lymfatická

Exantematická

Cerebrospinální

Myokarditická

Oftalmologická

Získaná forma uzlinová

Forma septická či hematogenní

Viscerální

Inaparentní

Chřipková

Forma podobná infekční mononukleóze

Systémová získaná

- rickettsiová forma
- febrilní s postižením více orgánů
- akutní chorioretinitis
- akutní encephalitis

Chronická a opakovaná chorioretinitis

Kongenitální infekce.

Je třeba připomenout ještě jednoho autora, který ve své práci uvádí praktičtější, zjednodušené dělení (40):

1. Vrozená

2. Získaná

- a) lymfatická
- b) exantematická
- c) cerebrospinální
- d) myokarditická
- e) oftalmologická.

Našimi autory (38) bylo v roce 1974 navrženo dělení získané formy na:

- a) akutní
- b) subakutní
- c) chronickou
- d) latentní
- e) Následky po proběhlé toxoplazmóze.

Jako doplněk uvádějí dělení dle nejvíce postižených orgánů na formu:

1. Oftalmologickou
2. Akutní uzlinovou
3. Gynekologickou
4. Postižení CNS
5. Viscerální forma
 - a) thorakální forma (postižení srdce a plic)
 - b) abdominální forma (postižení jater, sleziny atd.)
6. Zvláštní orgánové postižení.

Ad 1. Oftalmologická

U této formy se u pacientů nejčastěji objevuje uveitida a chorioretinitida. Zprvu se o této formě mluvilo převážně u dětí, jako o následku kongenitální toxoplazmózy. Dávno je již jasné, že se dotýká i dospělých a z laboratorního hlediska se jedná stále o diagnostický oříšek. Velmi často nelze diagnózu potvrdit jen na základě laboratorních výsledků (41).

Ad 2. Akutní uzlinová forma

Tato forma (po bezpříznakovém průběhu) je asi nejčastější získanou formou Onemocnění (na rozdíl od některých ostatních) nemá vybrané cílové uzliny, ale může postihnout téměř všechny.

Klinickým průvodním jevem může být subfebrilie. Ostatní potíže bývají velmi vzácné.

Ad 3. Gynekologická

Tato forma je z klinického hlediska snad nejdiskutovanější. Někteří autoři sem zahrnují všechny formy, které mají vztah k fertlnímu období ženy. Toto období je poměrně dlouhé a členění vůbec nekoreluje s ostatními. Nezabývá se převažujícími klinickými příznaky, ale fyziologickým obdobím. Pomineme-li ho, pak můžeme formu specifikovat jako infekci v graviditě, hovořit o kongenitální toxoplazmóze a nebo ji zařadit do jiné klinické formy. Bohužel byla v průběhu let stále upravovaná, a tak ji můžeme v epidemiologických hlášeních stále nacházet. Situaci asi lépe vystihuje termín infekce v graviditě.

Ad 4. Postižení CNS

Rozsah postižení a příznaků u této formy je třeba rozlišovat u imunokompetentních pacientů a u imunosuprimovaných.

Dojde-li k infekci u imunokompetentních lidí, nemluvíme o klinických příznacích v pravém slova smyslu, ale stále častěji se hovoří o ovlivnění psychiky infikovaného člověka.

Někteří autoři ale podle převládajících cílových postižení dokonce rozlišili tuto formu na:

- a) meningeální
- b) encefalickou
- c) myelitidy
- d) atak periferní nervové soustavy (s možnými kombinacemi).

K nejčastějším klinickým příznakům patří izolovaná meningitida, meningoencefalitida nebo encefalomyelitida (42). Velkým problémem u této formy je definitivní zařazení. Vždy by se mělo jednat o soulad klinických nálezů, výsledků zobrazovacích metod a laboratorního potvrzení (sérologie, biopsie).

Dojde-li k infekci imunosuprimovaných lidí, dochází často k těžkému, až fatálnímu poškození CNS (43). V USA toxoplazmóza patří k onemocněním s vysokou smrtností u HIV pozitivních pacientů (44). Proto i veškeré současné publikace se zabývají problematikou u HIV+ osob. Za nejčastější komplikaci je považován mozkový absces. Se stejnou četností je tato forma popisována u plodů a novorozenců jako následek kongenitální toxoplazmózy.

Ad 5. Viscerální forma

O viscerální formě hovoříme při zjevném převažujícím poškození různých orgánů. Zasažený orgán a rozsah jeho poškození se potom odrazí na klinických příznacích.

Vrozená forma může být vedle infekce imunokompromitovaných pacientů svým průběhem nejzávažnější. Také díky tomu je mnohem déle známá. Thalhammer v roce 1962 navrhuje rozdělení této formy na:

1. Generalizovanou (s hepatomegalií, splenomegalií, žloutenkou, myokarditidou a pneumonií)
2. Cerebrální s chorioretinitidou a intracerebrálními kalcifikacemi
3. Cerebrální s poškozením CNS bez poškození očí a bez intracerebrálních kalcifikací (45).

Někteří autoři dělí vrozenou formu podle aktivity procesu na:

1. Inaktivní
2. Aktivní
3. Recidivující (38).

Postupně se podle nejtypičtějších postižení zavedl termín Sabinova tetráda, který popisuje čtyři nejtypičtější postižení:

1. Hydrocefalus internus, mikrocefalie
2. Poruchy CNS
3. Chorioretinitis
4. Cerebrální kalcifikace.

Tato postižení se nemusí vyskytovat vždy pohromadě. Mohou se navzájem kombinovat a nebo se mohou vyskytnout další, méně typická onemocnění - lymfadenitidy, lymfadenopatie, myokarditidy, perikarditidy, intersticiální pneumonie,

meningoencefalitidy, hepatitidy, parézy různého stupně, sepse, křeče, apatie, atd. (46,47,48).

Proto i podle našich autorů dnes musíme i na tuto formu pohlížet komplexněji jako na získanou.

Z hlediska budoucnosti poškozeného plodu nebo novorozence mohou nastat následující situace:

1. Potrat
2. Předčasný porod poškozeného dítěte
3. Porod mrtvého dítěte
4. Porod dítěte s těžkými anomáliemi
5. Porod zdánlivě zdravého dítěte, kdy k manifestaci dojde v pozdějším věku.

V současnosti je infektology používáno následující schéma:

Tab.1 Dělení toxoplazmózy do forem dle klinických příznaků (49)

Toxoplazmóza		Klinické příznaky	
Získaná	akutní	inaparentní	vznik séropozitivity
		abortivní	chřipkové onemocnění
		uzlinová	zduření lymfatických uzlin
		oční	chorioretinitida
		nervová	meningoencefalitida
		viscerální	pneumonie, myokarditida
	chronická	únavový syndrom	subfebrilie, únavnost, bolest hlavy
		gynekologická	opakované potraty
reaktivace (při imunodeficienci)		ložisková encefalitida, pneumonie	
Vrozená	odumření plodu	potrat, mrtvý plod	
	inaparentní	séropozitivita dítěte	
	oční	chorioretinitida, katarakta, strabismus mikroftalmus	
	mozková	hydrocefalus, intrakraniální kalcifikace, křeče, psychomotorická retardace	
	viscerální	hepatitida, pneumonie	

6 Epidemiologie toxoplasmózy

Toxoplasmóza je onemocnění řazené k zoonózám, tj. onemocněním přenosným ze zvířete na člověka. Po objevení původce přes vztah k onemocnění člověka trvalo téměř 60 let, než byl odhalen definitivní hostitel tohoto parazita a jeho vývojový cyklus.

K hlavním tématům výzkumu v historii patřila otázka šíření a přenosu infekce. Tak byla v jisté době zařazena i mezi nákazy s přírodní ohniskovostí, ale nikdy se nepodařilo prokázat vektor původce onemocnění. Jeden znak tohoto fenoménu však platí bez omezení - existence v přírodě nezávisle na člověku.

Až po úplné kompletaci poznatků o životním cyklu parazita je dnes uznáván názor, že definitivním hostitelem je kočka (i další kočkovité šelmy) a člověk s ostatními druhy obratlovců (je jich okolo 350) patří k tzv. mezihostitelům (50). Spektrum mezihostitelů stále narůstá. (Mezihostitel nebo přechodný - intermediární hostitel je jedinec, ve kterém dochází k nepohlavnímu rozmnožování.)

6.1 Zdroj infekce

Zdroje infekce pro člověka jsou dva:

- zvířata, jejichž maso, orgány a produkty slouží člověku jako potrava. Mezi tato zvířata patří druhy domestikované, chované pro maso, vejce, mléko, kožešiny, zvířata chovaná pro zábavu, zvířata lovená a zvířata žijící v blízkosti člověka – synantropní. Z jatečných zvířat v našich krajích to jsou převážně prasata, ovce, kozy, králíci a drůbež. Méně často se hovoří o skotu. Původcem nákazy jsou tkáňové cysty, které díky své velikosti unikají samozřejmě jakékoliv jateční prohlídce.

U poikilotermních živočichů byly sice nějaké nálezy publikovány, ale patrně se jednalo o záměnu s jinými prvoky.

- zvířata, v jejichž exkrementech se vyskytují oocysty. Ty mohou druhotně kontaminovat vodu, potraviny a vnější prostředí (51,52).

Možností nákazy z vnějšího prostředí se v posledních letech zabývají převážně jihoameričtí autoři. V některých oblastech Brazílie prokazují až u 60 % 6-8 letých dětí tento způsob nákazy (53).

S rozvojem moderní medicíny, konkrétně možností transplantace, se rozšiřuje i spektrum takto přenosných onemocnění. Bohužel se ukazuje, že toxoplazmóza k nim náleží. Jedná se zde hlavně o problematiku reaktivace tkáňových cyst od dárce a nebo reaktivaci cyst v těle příjemce při navození imunosuprese (54,55).

Přenos infekce krví (56,57) nebo nákaza při manipulaci s infikovanými laboratorními zvířaty jsou známy již delší časové období.

6.2 Výskyt protilátek v lidské populaci

Séroprevalence v jednotlivých zemích světa je udávána v širokém rozpětí. V Evropě je uváděno 47 % u rakouské populace (58), 53 % lidí v Belgii (59), 22–23 % v Anglii (60, 61), 13–17 % ve Skotsku (62) 84 % v Paříži (63). Průměrně je na evropském kontinentu uváděna prevalence 50–80 % (64,65). Jelikož v žádné zemi z různých důvodů není prováděn pravidelný průzkum přítomnosti protilátek (sérologické přehledy), většina těchto dat byla získána v rámci skríninku gravidních žen a přesnější by bylo uvádět „přítomnost protilátek u ženské populace“.

V České republice se pohybuje u dětí do 15 let okolo 12 %, celkově od 25 do 38 % lidské populace (38).

6.3 Výskyt protilátek u zvířat

Největší pozornost je věnována vyšetřování koček. Rozsáhlé studie přítomnosti protilátek u koček probíhaly v USA. Jednotliví autoři uvádějí procento pozitivních koček od 16 % do 68 % (66,67,68). V protikladu k tomu je přítomnost oocyst v trusu koček prokazována u malého procenta těchto domácích zvířat. Tento fakt je přisuzován podobnému fenoménu jako u člověka – přibývání počtu infikovaných s protilátkami s věkem. Tak jsou oocysty detekovány v Německu a Maďarsku u 1 % koček (69,70), v Itálii u 0,4 % (71). Naopak vysokou prevalence prokazují v Egyptě – 41,3 % (72). V ČR udává Zástěra 4,4 % (73) a Svobodová 1,3 % (74).

Ve světě bylo provedeno mnoho experimentů se sledováním vylučování oocyst po experimentální nákaze jiných živočišných druhů (morčata, prasata, psi, cibetky atd.),

všechny měly negativní výsledek. Tím se prokázalo, že jiné druhy savců než kočkovité šelmy nemohou vylučovat toxoplasmové oocysty.

Z epidemiologického hlediska má velký význam pro šíření nákazy i spektrum mezipřenositelů. V 70. letech minulého století se pohybovala jejich četnost okolo 100 druhů (65), dnes je jich známo kolem 350. Výskyt parazita u mezipřenositelů má pro člověka obrovský význam z hlediska možné alimentární nákazy pozřením nedostatečně tepelně opracovaného masa nebo orgánů.

6.4 Počet onemocnění ve světě

Literární údaje o počtech pozitivních (hlášených) případů ve světě jsou málo dostupné, toxoplazmóza vesměs nepatří k povinně hlášeným infekcím.

6.5 Počet onemocnění v ČR

V České republice díky informačnímu systému hygienické služby jsou data dostupná. Tento systém vykazuje samozřejmě určitá chybová zatížení, která se během let minimalizují.

Vzhledem ke klinickému průběhu onemocnění, kdy až 90 % případů proběhne bezpříznakově, je skutečný výskyt infekce v naší populaci samozřejmě mnohonásobně vyšší. Ve statistických údajích se objevují dvě skupiny případů - případy s klinickými příznaky a potom případy odhalené sérologickým skríninkem těhotných žen. U nich se stále objevují velké nesrovnalosti v zařazení do jednotlivých forem onemocnění. Tak se nepřesně objevuje v hlášeních: primoinfekce v graviditě, kongenitální toxoplazmóza, gynekologická forma nebo forma latentní.

Hodnota vykazovaných absolutních čísel (a z nich vzešlý přepočet na 100 000 obyvatel) jsou závislé na:

- a) nastavení kritérií pro hlášení
 - výše titru
 - přítomnost specifických imunoglobulinů
 - klinické příznaky
- b) rozhodujícího lidského faktoru
 - kdo má povinnost hlásit onemocnění?

Ad a) Historicky se nastavení kritérií několikrát měnilo. V době používání pouze metod MPA (mikroprecipitace v agaru) a KFR (komplementfixační reakce) byla dána limitující hodnota titru 1:32. Každý pacient s titrem vyšším podléhal hlášení a při důsledném plnění povinností všech zúčastněných se objevil ve statistice.

Po zavedení detekce specifických imunoglobulinů IgM podléhali hlášení pouze pacienti pozitivní v této třídě. Zákonitě tak počet hlášených klesl, protože se nezdá objevují výsledky s titry 1:64 i vyššími, ale s negativními imunoglobuliny IgM. Tyto případy se dříve ve statistikách objevovaly. Mohl tak vzniknout dojem tzv. přehlášenosti počtu onemocnění toxoplasmózou v minulosti .

Ad b) Opakem možnosti hlášení vyššího počtu onemocnění je jeho „nedohlášenost“.

V našich krajích existuje po léta diskutovaný problém, kdo má povinnost hlásit. Ukazuje se, že existuje mnoho krajových variant. Ideálem je, když laboratoř pouze tzv. signalizuje onemocnění a ošetřující lékař v souladu s klinickým průběhem hlásí událost epidemiologům příslušného spádového území. Pak je předpoklad, že se čísla objeví v celostátním hlášení a odráží reálnou aktuální situaci v ČR.

Tab. 2 Počet hlášených případů onemocnění v letech 1997-2004 (75).

Forma	rok							
	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
GYNEKOLOGICKA JINA	52	47	38	37	-	-	-	-
HEPATITIDA	3	4	-	1	-	-	1	-
INAPARENTNI	62	40	50	51	31	58	61	29
JINA	45	33	38	31	25	30	19	32
KONGENITALNI	11	2	3	3	4	5	2	
MENINGOENCEFALITIDA	-	-	-	1	-	-	1	-
OCNI	37	30	41	31	24	29	34	31
PLICNI TOXO	3	-	-	-	-	-	2	-
PRIMOINF.V GRAVIDITE	27	24	20	38	33	39	23	10
U IMUNODEFIC. OSOBY	2	-	1	-	-	2	1	-
UZLINOVA	696	595	664	474	399	480	310	215
Celkem	938	775	855	667	516	643	454	319

Jak ukazuje tabulka, celkový trend počtu onemocnění (nebo hlášených onemocnění) má trvale sestupnou tendenci.

7 Prevence před onemocněním

Prevence před onemocněním se odvíjí od mechanismů nákazy. Samozřejmě jsou všechny zákonitosti platné obecně pro nejširší lidskou populaci, ale největší pozornost je věnována nejohroženějším skupinám. V zemích, kde gynekologové, neonatologové a laboratorní pracovníci neprosadili povinný skrínink v období gravidity (nebo alespoň vyšetření před otěhotněním), je věnována prevenci a osvětě u gravidních a imunokompromitovaných značná pozornost.

Jednak jsou neustále upravována pravidla pro ochranu konkrétně proti toxoplazmóze nebo jsou využívány systémy používané proti ostatním alimentárním nákazám (převážně bakteriálním). U těch je třeba samozřejmě doplnit oblast prevence proti nealimentárním nákazám. Jedním z těchto návodů je systém HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points). Tento systém umožňuje v prvních krocích analyzovat všechna možná rizika a pak navrhuje možnosti ochrany proti nim (76).

1. Nekonzumovat nedostatečně tepelně upravené maso a vyhýbat se výrobkům tepelně neopracovaným. *T. gondii* je spolehlivě zabijena při vystavení vysokým teplotám (nad 50 °C) nebo zmrazení. Tkáňové cysty jsou likvidovány teplotou přes 67 °C, takže i pasterace je proti nim účinná (77). Rovněž teplota pod – 13 °C spolehlivě ničí tkáňové cysty (78). Tachyzoity nejsou odolné vůči žaludečním šťávám a nepřežívají v nich déle než 60 minut (79). Tyto poznatky jsou důležité z hlediska možnosti či nemožnosti nákazy pitím nepasterizovaného mléka. Naproti tomu bradyzoity odolávají žaludeční šťávě nejméně dvě hodiny.
2. Dbát zvýšené hygieny při kontaktu s kočkou. V tomto případě jsou informace o možnosti tohoto přenosu velmi důležité. K ochraně proti infekci oocystami je doporučována pouze zvýšená osobní hygiena při kontaktu z kočkou, popřípadě v období těhotenství tyto kontakty omezit na minimum, či je přímo vyloučit.
3. Dbát zvýšené hygieny při manipulaci s potencionálně kontaminovaným vnějším prostředím nebo potravinou. Tato problematika je asi nejnanonymnější. Jak rozeznat kontaminované prostředí? Opět v kritických obdobích (těhotenství, imunosuprese) je třeba věnovat jeho vlivu větší pozornost. Objevuje se stále více informací a důkazů o hromadných výskytech tohoto onemocnění získaného právě kontaktem s vnějším prostředím (80). Samozřejmě k tomu opět patří dodržování osobní hygieny. Tímto prostředím může být voda, půda, pískoviště, potraviny

(zelenina) , ale i manipulace s masem a masnými výrobky. Bohužel oocysty jsou ve vnějším prostředí poměrně odolné. Vysporulované přežívají při -20°C po dobu 28 dní. Jsou inaktivovány teplotou $55\text{--}60^{\circ}\text{C}$ za 15 minut, teplotou 90°C za 30 vteřin. Oocysty s úspěchem odolávají působení desinfekčních prostředků (1-4% chloramin, louh sodný atd.) a to až po dobu 24 hodin. To má samozřejmě velký význam při pokusech desinfikovat vnější prostředí, např. dětská pískoviště (1).

K této osobní ochranné činnosti existují samozřejmě další opatření na úrovni mimo jedince. Jsou to opatření systémová, např. zabraňování přístupu koček do blízkosti chovu jatečných zvířat a skladů potravin, do prostor určených pro hru dětí, opatření osobní i technologická při zpracovávání masa atd.

7.1 Vakcinace

Očkování lidské populace kmeny s nízkou virulencí by asi mělo za následek navození odolnosti proti toxoplazmóze. Největší smysl by to samozřejmě mělo u negativních žen před otěhotněním, ale i u domácích zvířat, převážně u koček k zabránění vylučování oocyst a tím šíření infekce (81).

Veškeré studie byly prováděny převážně na prasatech , myších nebo ovčích. K vakcinaci byly používány jak vysoce virulentní kmeny, tak téměř avirulentní (82,83). Výsledky byly velmi rozdílné u různých druhů zvířat. Rovněž byly zkoušeny různé frakce RNA toxoplazem, ale bez úspěchu. Žádná neměla výrazný ochranný efekt (84). Vakcinace, jako prevence kongenitální toxoplazmózy, neměla žádný významný efekt u primátů, ale u ovčí ano. Je to patrně důsledkem velmi rozdílné stavby placenty (85).

Studie některých autorů byly zaměřeny na pasivní imunizaci. Tomu ale musí předcházet podrobné rozpoznání konkrétní role jednotlivých frakcí imunitního systému k fázi onemocnění (86). Na myších modelech byla bez aplikovatelných konkrétních závěrů testována imunizace T-lymfocyty, B-lymfocyty (87) .

V současnosti je u ovčí s úspěchem používána živá vakcína TOXOVAX. Jedná se o atenuovaný kmen TS-20, ale u lidí nepoužitelný.

Ostatní vakcíny mají pouze částečný protektivní efekt u laboratorních zvířat a zatím se žádná neblíží do fáze klinických zkoušek.

8 Imunitní odpověď organismu

V imunokompetentním hostiteli jsou infekční trofozoiti zabíjeni makrofágy. Tato schopnost vzrůstá, jsou-li v předchozím kroku vystaveni účinku protilátek a komplementu. Parazit má schopnost uvnitř makrofágu se množit, ovšem jen do doby, než je buňka rozrušena. Pak přicházejí trofozoiti opět do kontaktu s protilátkou a jsou zabíjeni.

Buňkami zprostředkovaná imunita se také účastní v ochraně proti toxoplazmóze. Pozdní přecitlivělost se vyvíjí časně a ochrana vzniká pouze v důsledku infekce živými organismy. Je produkován interferon a lze prokázat aktivované makrofágy se schopností zabíjet prvoky nebo zabránit jejich množení, což snižuje zátěž vyvolanou parazity.

U buněčné imunity je aktivace makrofágů pravděpodobně ovlivněna působením antigenu na specificky senzibilizované T lymfocyty, které produkují lymfokiny aktivující makrofágy.

Jak již bylo výše řečeno, pro účinnou ochranu proti toxoplazmóze je zapotřebí intaktní imunitní systém. Jakákoliv imunosuprese může vyvolat aktivaci toxoplazmózy.

To může být důsledkem eliminace senzibilizovaných lymfocytů dosud omezujících inaparentní infekci nebo neschopností imunosuprimovaného hostitele vyvinout účinnou protektivní odpověď na novou infekci.

Znalost imunitních pochodů v organismu je prakticky využívaná při diagnostice onemocnění u novorozenců. Některé protilátky procházejí v období intrauterinního vývoje přes placentu (komplementfixační, IgG) a některé z různých důvodů nemohou (IgM).

V **akutní fázi** infekce je toxoplazma ve fázi tachyzoitů. Tachyzoity jsou schopny se rychle dělit a invadovat prakticky do všech orgánů hostitele (i procházet placentární bariérou). V počáteční fázi akutní infekce není vytvořena specifická protilátková odpověď, v expanzi tachyzoitů nic nebrání. Buňky makrofágové řady neschopné toxoplazmy zabíjet je roznáší po organismu a slouží jim jako útočiště. Nejdůležitější roli v této fázi hraje nespecifická přirozená imunita: slizniční imunita a natural killer cells (NK buňky), které produkují interferon gama (INF- γ). Ten bývá označován jako hlavní mediátor rezistence vůči toxoplazmám (88). Jeho účinky se brzy projeví – dále stimuluje NK buňky a společně s tumor necrosis faktorem alfa (TNF- α)

aktivuje makrofágy (89). Aktivované makrofágy již mají schopnost toxoplazmy ničit a navíc produkcí cytokinů (včetně TNF- α) aktivují další prostředky imunitní obrany.

Až několik dní po infekci se objeví klony T lymfocytů specificky odpovídajících na antigen *T. gondii*. Klíčovou úlohu mají CD8⁺ T lymfocyty vázané na MHC 1 antigen parazitované buňky (90,91,92). Ty jsou schopny buňky i s parazitem lyzovat a produkují cytokiny potřebné k modulaci imunologického boje – mimo jiné i IFN- γ .

Produkované cytokiny rovněž podporují maturaci B lymfocytů v plazmatické buňky schopné produkovat specifické protilátky proti *T. gondii* (93). Nástup tvorby specifických protilátek lze očekávat 2-3 týdny po infekci. Nejdříve se začínají tvořit protilátky třídy IgM, IgA, IgE – jejich hladiny prudce stoupají (94,95). Protilátky třídy IgG se objevují asi o 1-2 týdny později a mají pozvolný nástup. Dosud není známo, které z nich mají protektivní roli (87).

Nástup tvorby specifických protilátek, specifických T lymfocytů, aktivovaných makrofágů, vysoká hladina IFN- γ a dalších cytokinů volné tachyzoity v organismu velmi rychle likvidují.

Toxoplazmy, které přežily v tkáňových cystách, se mění z energeticky aktivních tachyzoitů na méně náročné bradyzoity. Infekce tak postupně přechází do **latentní fáze**.

V této fázi infekce jsou hlavním zdrojem IFN- γ CD4⁺ T lymfocyty vázané na MHC 2 antigen parazitované buňky. Bradyzoity se uvnitř buňek maskují v parazitoformních vakuolách (stěny cyst se maskují částmi lidské buněčné membrány), což stěžuje jejich rozpoznávání imunitním systémem (96,97,98). Hostitel proti cystám přímo neútočí, ale jejich produkty stále stimulují imunitu. V latentní fázi infekce se vytváří zvláštní rovnovážný systém mezi parazitem a lidským organismem. Hostitel nemá prostředky, aby parazita zcela zlikvidoval. Parazit nemá možnost proliferovat a hostitele nepoškozuje. Imunita je s největší pravděpodobností celoživotní. Výjimku tvoří stav těžkého narušení imunity, kdy může dojít k reaktivaci infekce. Pro toto období infekce jsou hlavními protilátkami imunoglobuliny třídy IgG.

Závěrem se dá konstatovat, že imunitní odpověď organismu je velmi účinná a klinicky závažné formy jsou vždy spojeny s oslabením imunity pacienta.

9 Diagnostické metody

V této kapitole je uveden celý výčet diagnostických metod používaných v historii až po současnost. Metody využívané naší laboratoří budou rozebrány s jejich výhodami i nedostatky v kapitole „Materiál a metodika.“

Jednotlivé metody jsou popisovány podrobněji také z toho důvodu, protože jedním z diskutovaných problémů je i výskyt onemocnění v ČR. Interpretace jednotlivých diagnostických metod byla historicky odlišná a opakovaně se stalo, že onemocnění hlášená do informačních systémů hygienické služby se zavedením nové metody již nesplňovala dosud zavedená kritéria. I z toho je třeba vycházet, chceme-li porovnávat incidenci toxoplazmózy v jednotlivých obdobích. Na počty lidí v populaci s přítomností protilátek to samozřejmě vliv nemá. Ale u počtů hlášených akutních onemocnění může být porovnání v jednotlivých letech obtížné.

Stejně jako u většiny infekčních onemocnění máme dvě možnosti průkazu etiologického agens:

1. Využití metod přímého průkazu
2. Využití metod nepřímého průkazu.

9.1 Metody přímého průkazu

Jde o konkrétní průkaz celých parazitů, stadií životního cyklu nebo jeho částí. Tyto testy byly jedinými používanými diagnostickými metodami po dobu téměř 30 let po objevení *T. gondii*. Je třeba si uvědomit, že pouze pozitivní výsledek má 100% výpovědní hodnotu. Negativní výsledek toxoplazmovou infekci nevylučuje.

Používané techniky jsou následující:

1. Mikroskopický průkaz
2. Izolační pokus
3. Detekce nukleové kyseliny.

(Aby byl výčet kompletní, musíme jmenovat ještě možnost průkazu antigenu infekčního agens pomocí známých protilátek, ale tyto metody nebyly k diagnostice toxoplazmové infekce nikdy využívány.)

9.1.1 Mikroskopický průkaz

Jako vhodný materiál k mikroskopickému průkazu je nejčastěji zasílán bioptický materiál (exstirpované lymfatické uzliny, materiál z kyretáže děložní sliznice, kostní dřev, excize kosterních svalů, tělní tekutiny – krev, likvor, komorová voda atd.).

Biologický materiál by měl být vždy odebrán za aseptických podmínek, musí být skladován i přepravován v chladu. Přeprava do vyšetřující laboratoře ve sterilních nádobách by měla být realizována v co nejkratším čase.

Dalším materiálem je pitevni materiál. V podstatě je možno vyšetřit jakýkoliv výše jmenovaný materiál, mozek, prodlouženou míchu, plíce, případně jiné orgány podezřelé ze specifického postižení.

a) Tekuté materiály

Z tekutých materiálů se zhotovují nejčastěji barvené preparáty (barví se Giemsa-Romanovským barvivem).

Pokud je k dispozici čerstvá periferní krev k přímému průkazu, je nutno ji ihned smístit s protisrážlivým roztokem (heparin) a po centrifugaci zhotovit běžnou technikou roztěrové preparáty. Ty se potom barví.

b) Z orgánů a bioptického materiálu se zhotovují otiskové preparáty a po zaschnutí opět barví dle Giemsy.

Celý soubor těchto přímých mikroskopických technik zjednodušila imunofluorescenční reakce, kterou lze uplatnit při použití specifických protilátek k detekci trofozoitů i cyst. Kromě této reakce se nikdy mikroskopická diagnostika v rutinních diagnostických laboratořích nepoužívala.

9.1.2 Izolační pokus

Izolace prvoka *T. gondii* je dosud používaná nejméně pravděpodobnější technika přímého průkazu. Tohoto prvoka nelze kultivovat na žádných umělých živných půdách a je nutno striktně používat živočišnou buňku. V minulosti se nejčastěji používaly:

- a) Chorioalantois kuřecího embrya
- b) Tkáňové kultury
- c) Organismus vnímavého zvířete.

V současnosti je stále používanou metodou pokus na zvířeti.

I k tomuto vyšetření je nutno materiál odebírat za aseptických podmínek a co nejdříve inokulovat do zvířete.

9.1.3 Detekce nukleové kyseliny

Tyto techniky byly zavedeny poměrně nedávno a využívají se jako výborný doplněk k průkazu protilátek převážně u gravidních žen a imunokompromitovaných pacientů (99,100). Výhodou zůstávají jejich známé vlastnosti - citlivost a rychlost stanovení.

Jako materiál k detekci nukleové kyseliny *T. gondii* se vyšetřuje nejčastěji plodová voda, nesrážlivá krev, oční tekutina, likvor, bioptický materiály, punktáty.

K průkazu se používá detekce DNA *T. gondii* (101).

9.2 Metody nepřímého průkazu

Ne všechny výše jmenované techniky přímého průkazu jsou snadno a rychle proveditelné, ne všechny vhodné pro rutinní laboratoře, ne všechny mohou provádět laboratorní pracovníci ve všech laboratořích.

Vzhledem k těmto obtížím byly vyvíjeny a dnes jsou v 99 % laboratoří prováděny metody nepřímého průkazu tzv. metody sérologické – metody průkazu protilátek.

Obecně jde vždy o průkaz reakce prokazované protilátky se známým antigenem. Všechny se potom liší v závěrečné fázi – zviditelnění této realizované vazby, jsou-li protilátky přítomny.

Druhou skupinou jsou v ČR dříve prováděné metody založené na specifické přecitlivělosti organismu na toxoplazmové antigeny.

9.2.1 Průkaz antitoxoplazmových protilátek

Tyto metody se začaly používat zhruba po 40 letech přímé diagnostiky, aby eliminovaly obtížnost přímého průkazu. Je třeba ale připomenout, že si s sebou nesou všechny dosud známé obtíže průkazu protilátek.

Velmi důležité pro kvalitu těchto reakcí je používaný antigen. Dříve byl používán převážně korpusekurální antigen (celí trofozoiti nebo jejich drť), dnes je převáděn z technických důvod na formy solubilní (38). V historii platilo také pravidlo, že téměř každá laboratoř si vyráběla vlastní antigen. Dnes se používají komerčně vyráběné sety.

Všechny reakce doznaly během doby řadu změn, které se týkaly nejen používaného antigenu, ale i metodiky provádění testů, stabilizace a standardizace používaných ingrediencí, přechod z klasických metod na mikrometody atd. Je třeba také zdůraznit, že v používání konkrétních metod existují národní odlišnosti a někdy i rozdílná vyšetřovací schémata v jednotlivých státech.

9.2.1.1 Průkaz protilátek v séru

Pro laboratorní diagnostiku toxoplazmózy byly dosud používány následující reakce, ne všechny ale našly v laboratořích široké uplatnění:

1. Sabinova-Feldmanova (SFR)
2. Komplementfixační reakce (KFR)
3. Imunofluorescenční reakce (NFR)
4. Hemaglutinační reakce (IHA)
5. Precipitační reakce (MPA)
6. Aglutinační reakce
7. Flokulační reakce
8. Neutralizační reakce
9. ELISA reakce
10. Western blot.

9.2.1.1.1 Sabinova-Feldmanova reakce

SFR byla popsána autory již v roce 1948 (102). Detekuje protilátky velmi krátce po infekci člověka. Můžeme je touto reakcí detekovat mnoho let a na středních hodnotách se udržují dlouhodobě. Proto je vhodná pro epidemiologické studie promořenosti obyvatelstva.

Princip této metody spočívá ve změně morfologie a barvitelnosti živých trofozoitů alkalickým roztokem methylenové modři za přítomnosti imunního séra.

V ČR nedosáhla velkého rozšíření a uplatnila se jen na několika specializovaných pracovištích.

9.2.1.1.2 Komplementfixační reakce

Je jednou z prvně popsaných a zavedených reakcí (38). Tato reakce se v ČR používá od 50. let minulého století a po prodělání mnoha modifikací se v laboratořích udržela dodnes. Má proto velice dlouhou historii, se kterou souvisí i její znalost a snad právě proto je v naší republice tak často používaná. Reakce má celou řadu výhod, které zatím žádné jiné reakce nenahradily. Určité nevýhody se dají eliminovat použitím dalších metod. (Více v kapitole „Materiál a metodika“).

9.2.1.1.3 Imunofluorescenční reakce

Tato metoda byla mozaikovitě používaná po celém světě, ale širokého uplatnění nikdy nedosáhla. Hlavním problémem byla vždy standardizace používaného antigenu. Samozřejmě i ona procházela historicky celou řadou modifikací podle různých autorů. Kromě reakce záchytu komplexu protilátek byly vypracovány i metody na detekci jednotlivých tříd imunoglobulinů.

Antigen se připravuje z peritoneálního exsudátu myší, jako konjugátu se využívá prasečího gamaglobulinu proti globulinové frakci lidského séra SwAHu/FITC. Svoji citlivostí a výškou dosahovaných titrů se interpretace výsledků nejvíce přibližuje SFR. Tak jako každá imunofluorescenční reakce i tato podléhá subjektivnímu hodnocení.

9.2.1.1.4 Hemaglutinační reakce

Princip metody je podobný všem ostatním hemaglutinačním reakcím. Solubilní antigen je navázán na erytrocyty a ty jsou pak za přítomnosti specifické protilátky aglutinovány. Adsorpční schopnost erytrocytů se zvyšuje taninem. Nejprve byly užívány lidské erytrocyty, později se přešlo na beraní. I tento test prošel přechodem z metody zkumavkové k metodám prováděným v mikrotitračních destičkách.

Její velkou výhodou je technická nenáročnost, avšak rutinního uplatnění nenalezla. Hlavním důvodem je poměrně pozdní nástup pozitivitu při akutním onemocnění.

9.2.1.1.5 Precipitační reakce v agarovém gelu

Ve skličkové modifikaci byla v laboratořích používána v 80. letech minulého století jako kvalitativní test poměrně často pod označením MPA (mikroprecipitace v agaru).

Tato metoda je velice skromná na laboratorní vybavení, a proto se velmi brzy rozšířila k rutinnímu využití. Standardnost jednotlivých složek reakce bylo nutno zabezpečit rutinní výrobou.

MPA byla od počátku považována za indikátor nesterilní imunity. U dlouhodobě sledovaných pacientů s prokázanou toxoplasmózou ukazuje velmi dobře účinnost terapie. U chronické formy zůstává řadu let pozitivní.

9.2.1.1.6 Aglutinační reakce

Reakce tohoto typu díky své nízké citlivosti nikdy nenašly na našem území široké uplatnění.

9.2.1.1.7 Flokulační reakce

Flokulační metody jsou vlastně obdobou reakcí aglutinačních. Různě připravené solubilní antigeny jsou vázány na imunologicky neaktivní partikule nosičů a ty jsou potom shlukovány za přítomnosti protilátek.

Jako nosiče byly využívány bentonit, polymetyl-metakrylátové částice, kaolinové partikule nebo kolodium. U nás v řídkých případech využití této reakce byly používány latexové partikule.

Největší nevýhodou těchto reakcí je podobně jako u aglutinací jejich poměrně nízká citlivost.

9.2.1.1.8 Neutralizační test

Historicky byl tento test prvně použitý k detekci antitoxoplazmových protilátek. Antigen se mísil s koncentrovaným vyšetřovaným sérem a po inkubaci se směs intradermálně injikovala zdravé myši nebo králíkovi. V negativním případě se po několika dnech objevila v místě vpichu zánětlivá reakce s nekrózou. Pozitivní reakce s imunním sérem zabránila vývinu lokální reakce.

Tento test byl dosti nespolehlivý a často se projevovaly nespecifické reakce.

9.2.1.1.9 ELISA reakce

Tyto reakce jsou dnes v laboratorní diagnostice asi nejrozšířenější. Lze diagnostikovat specifické imunoglobuliny třídy IgA, IgE, IgG a IgM (103, 104). Vyšetřovaným materiálem může být sérum, plodová voda, mozkomíšni mok a oční tekutina.

Princip reakce spočívá v reakci antigenu se specifickou protilátkou. Na vytvořený imunokomplex se naváže specifický imunoglobulin značený enzymem (IgG). Při stanovení imunoglobulinů IgA, IgE a IgM se využívá metody „double-sandwich“. Protilátka proti imunoglobulinům příslušné řady navázaná na mikrotitrační destičku vyváže při inkubaci imunoglobuliny IgA, IgE a IgM. V dalším kroku dojde k navázání antigenu a pak označené protilátky na antitoxoplazmické imunoglobuliny příslušné řady.

U imunoglobulinů IgG lze možnost stanovovat tzv. aviditu (pevnost vazby mezi antigenem a protilátkou). Čím delší dobu infekce trvá, tím je tato vazba pevnější.

Tyto reakce při znalosti dynamiky tvorby jednotlivých tříd imunoglobulinů umožňují poměrně přesně určovat fázi infekce.

Stanovení indexu AVIDITY protilátek proti *T. gondii*

Avidita protilátek je veličina vyjadřující pevnost vazby mezi antigenem a protilátkou. V období po infekci není tato vazba téměř žádná a její pevnost narůstá časem. Stanovení avidity protilátek se osvědčuje, podobně jako stanovení imunoglobulinů IgM a IgA, k určení fáze infekce.

Metody stanovení avidity protilátek jsou založeny na narušení vazby antigenu s protilátkou aviditním roztokem. Jeho účinkem se část protilátek navázaných na antigen uvolní. Je-li avidita nízká, zůstane po inkubaci v aviditním roztoku navázaná jen malá část komplexu. Vysokoavidní protilátky zůstávají navázané i po této inkubaci (105,106).

9.2.1.1.10 Western blot

Tato metoda má největší význam při detekci tvorby protilátek u novorozenců. To je důležité především při diagnostice kongenitální toxoplazmózy. Některé protilátky se přenášejí přes placentu (imunoglobuliny IgG) a pak je těžké rozlišit, jsou-li

vytvořeny matkou nebo novorozencem. Western blot nám prokáže protilátky u dítěte, na které matka nereaguje, a to znamená, že je produkuje novorozenec (107).

9.2.1.2 Intradermální test

K metodám průkazu protilátek lze ještě přiřadit metodu specifické přecitlivělosti na toxoplazmový antigen. Sem patří v historii používaný intradermální test s toxoplazminem dle Frenkela (IDT). Tento test byl modifikován Jírovcem a spol (38).

Test spočívá v aplikaci toxoplazmického antigenu intradermálně na laterální straně paže nebo na volární straně předloktí. Alergická reakce opožděného typu dosahuje maxima za 48 hodin. Celá reakce se hodnotí dle následující tabulky:

<u>Erytém</u>	<u>Indurace</u>	<u>Interpretace</u>
< 5 mm	není	negativní
5–14 mm	do 5 mm, slabě hmatná	slabě pozitivní
15–30 mm	5–10 mm, zřetelně hmatná	středně pozitivní
> 30 mm	> 10 mm, zřetelně hmatná	silně pozitivní

Při silně pozitivní reakci reaguje celý organismus celkovými příznaky: zvýšením teploty, bolestí hlavy, bolestí svalů.

Tento test měl převážně význam pro epidemiologické přehledy promořenosti určité populace. Jeho pozitivita má celoživotní perzistenci a tak se pro klinickou diagnostiku hodí pouze jako doplňkové vyšetření. Význam má pouze při zachytu akutního onemocnění a přechodu od negativity k pozitivitě. U chronických onemocnění má význam negativní výsledek při chorioretinitidách jiné etiologie .

Dnes je ale nahrazen jinými sérologickými testy průkazu protilátek.

10 Interpretace sérologických vyšetření

I když u každého diagnostického setu pro detekci protilátek je poměrně striktní návod k použití včetně interpretací dosažených výsledků, není vždy hodnocení jednoduché. Zdá se, že protilátková odpověď proti většině infekčních onemocnění je uniformní, ale kdo se touto diagnostikou v profesním životě zabýval, získal

nepochybně zcela odlišné zkušenosti. Bohužel na konci každé reakce průkazu protilátek nedostaneme odpověď na otázku, zda pacient je nemocen nebo není, ale pouze zda má či nemá proti dané infekci protilátky. Při vyšetření většího spektra protilátek nebo specifických imunoglobulinů, můžeme určit i momentální fázi onemocnění.

I když byla popsána celá řada metod, zdaleka ne všechny našly stejné uplatnění. Tak existují rozdíly ve výběru a převaze prováděných metod v jednotlivých zemích, ale jsou i velké rozdíly v rámci konkrétních států. Každá země, každá laboratoř (má-li možnost) si vždy obhájí kvality prováděné metody.

Technické provedení užívaných metod je stále dokonalejší a snazší. V této kapitole je pozornost zaměřena na obecná pravidla interpretace průkazu protilátek. Interpretace sérologických metod používaných v naší laboratoři bude komentována v kapitole „Materiál a metodika“.

Obecně se hodnotí u všech reakcí kvantum zjištěných protilátek. Rozhodujeme se na základě jejich přítomnosti nebo absence (pozitivní x negativní). V případě pozitivy se hodnotí jejich přítomnost, stabilitu, pokles či vzestup u opakovaných vyšetření.

U všech reakcí, mluvíme-li o titru protilátek (jako titer je označována převrácená hodnota nejvyššího ředění séra, v němž ještě probíhá reakce antigenu s protilátkou), bylo stanoveno jednoduché rozmezí na:

- a) nízké hodnoty (1:8–1:32)
- b) střední hodnoty (1:64 a 1:128)
- c) vysoké hodnoty (1:256 a vyšší).

U všech reakcí, kde se vyjadřuje kvantum detekovaných protilátek v mezinárodních jednotkách a optických denzitách, se používá převážně rozmezí:

- a) negativní
- b) hraniční
- c) pozitivní.

U jednotlivých reakcí číselné vyjádření nebylo uniformní. U některých je za vysokou hodnotu považován již titer 1:256 (KFR), u jiných titer 1:1000 (SFR, IHA). Výjimku tvoří MPA, která se hodnotí pouze kvalitativně – pozitivní x negativní reakce.

Obecně lze shrnout:

Negativní výsledek - svědčí o tom, že se člověk s konkrétním agens dosud nesešel.

Nízké titry – dokazují infekci pravděpodobně před delší dobou. Při interpretaci těchto hodnot je nutné být na pozoru u oční formy, kdy jsou titry standardně nízké i při recentní infekci.

Střední titry – patrně svědčí o infekci před nedávnou dobou a nebo indikují chronickou infekci

Vysoké titry – indikují právě probíhající a nebo zcela nedávnou infekci

Uvedené schéma je nejméně vhodné a každý hodnotitel výsledku raději vyslovuje závěr na základě vyšetření minimálně dvou sér s časovým odstupem. Pak se vyskytnou následující možnosti:

Titry se vzestupnou tendencí - ukazují na čerstvou aktivní infekci

Titry se sestupnou tendencí – ukazují na ustupující infekční proces.

Při této možnosti se hovořilo o sledování dynamiky tvorby protilátek, což umožňuje lépe popsat současný stav infekce. Mělo by být pravidlem, že první vyšetření se vyžaduje na počátku onemocnění a druhé nejdříve za 14 dnů. O případném dalším laboratorním vyšetření se rozhoduje na základě výsledků.

Právě pouze možnosti této hrubé interpretace si vyžádaly nutnost preciznějšího stanovení fáze infekce, možnost stanovení specifických imunoglobulinů tvořících se v různých časových horizontech od počátku infekce a přetrvávajících po různě dlouhou dobu. K tomuto cíli v současnosti slouží používání ELISA reakcí ve třídách IgA, IgE, IgG a IgM. Obecně se vyznačují vysokou citlivostí a malými nároky na přístrojové vybavení. Tyto reakce se začaly používat při diagnostice toxoplazmózy od 70. let minulého století (108,109).

Tyto jednotlivé třídy od počátku infekce mají v organismu jinou odlišnou funkci a v diagnostice a následné interpretaci je využívána znalost jejich produkce v různých fázích

onemocnění. Tak nám specifické imunoglobuliny třídy IgG indikují i kontakt s infekcí v minulosti (přetrvávají velmi dlouhou dobu i po celý život).

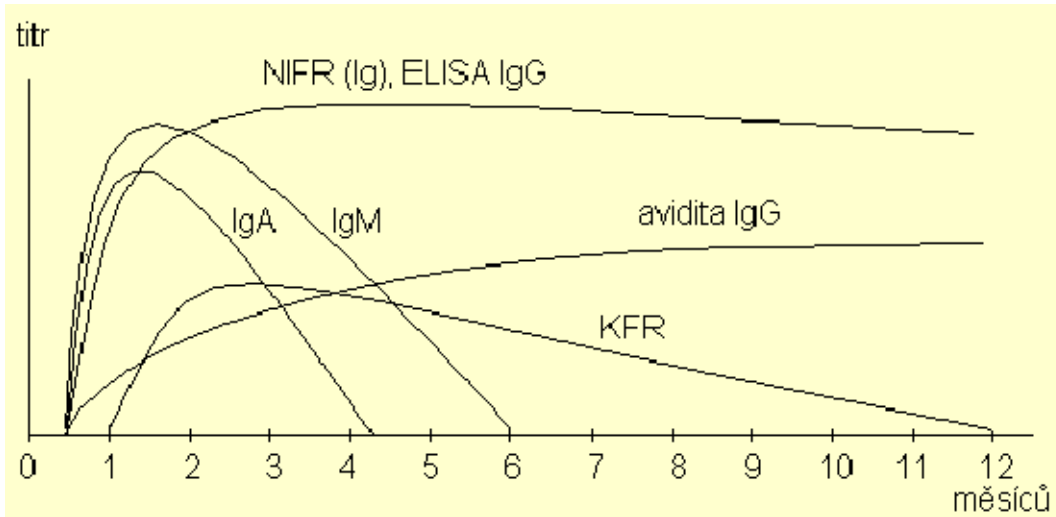
Imunoglobuliny IgA vnikají velmi časně po infekci, takže indikují akutní nebo nedávno proběhlou infekci. Důležité je, že přetrvávají nejdéle 1 rok .

Podobné vlastnosti jako imunoglobuliny IgA mají i IgM. Také většinou svědčí o akutní nebo nedávno proběhlé infekci. Ale díky poznatkům o jejich nespecifickém

zvýšení, či přetrvávání v pozitivních hodnotách i déle než 1 rok je zařazují svým významem pro interpretaci až za IgA.

Interpretace získaných výsledků je specifickou záležitostí každého diagnostického setu.

Obr 3: Dynamika tvorby antitoxoplazmových protilátek



11 Cíle práce

Protože se naše pracoviště zabývá problematikou toxoplazmózy od svého vzniku a systematictěji od roku 1982, shromažďování publikovaných údajů pro tuto práci probíhalo po dlouhá léta. Všechny samozřejmě zahrnutý nebudou. V této práci jsou hodnoceny pouze epidemiologické aspekty tohoto závažného onemocnění v období říjen 1996 – prosinec 2004 (celkem zpracováno 37 515 vyšetření u 28 757 lidí). Důvodem je možnost analýzy dat pomocí statistických metod laboratorního informačního systému v tomto období.

Přes mnoho různých objevů ve světě publikovaných i nepublikovaných i studií prováděných v ČR existuje ještě stále mnoho otazníků a krajových či oblastních odlišností. Tato práce si klade za cíl odpovědět na některé otázky a vznikala v několika časových úrovních. Hlavní body, kterými se zabývá, jsou následující:

- shromažďování dat
- výběr epidemiologických kritérií
- statistické zpracování dat
- zhodnocení výsledků
- používané laboratorní metody, jejich výhody a nedostatky
- jejich zhodnocení z hlediska výpovědní hodnoty
- kvalita interpretace
- změny používaných metod v souvislosti s přesnější interpretací výsledku.

Některé z těchto otázek byly v minulosti studovány na základě vyšetření různě početných souborů z jednotlivých územních celků, s použitím různých laboratorních metod. Výsledky těchto studií jsou ovlivněny faktory metodologickými (použitá metodika, diagnostická kritéria, velikost sledovaného souboru), faktory epidemiologickými (způsob života, hygienická úroveň obyvatelstva, stravovací návyky, promořenost domácích i divokých zvířat, hygienická úroveň zpracovatelských potravinářských závodů atd.)

Epidemiologické faktory jsou specifické pro každou oblast, a proto vyšetření určitého reprezentativního vzorku populace přináší jedinečné výsledky.

12 Materiál a metodika

12.1 Soubor vyšetřených

Zpracovaným vyšetřeným materiálem byly vzorky zaslané na naše pracoviště ze „spádové oblasti“ Plzeň-město (PM), Plzeň-jih (PJ), Plzeň-sever (PS), Rokycany (RO), Domažlice (DO) s žádankou o vyšetření na toxoplazmózu při podezření na toto onemocnění. Ke confirmaci byly zasílány vzorky z Klatov (KT) a dnešního Karlovarského kraje.

S přibývajícím počtem nových laboratoří v našem teritoriu se toto rozložení rozpadlo a náš materiál tvořily všechny „pozitivní vzorky“ z těchto laboratoří a od pacientů, kteří byli zasláni na Infekční kliniku FN Plzeň, na Ústav lékařské genetiky LF a FN Plzeň a na soukromé pracoviště Genetika s.r.o. Z pracovišť mimo FN materiál zasílají pouze jednotliví specialisté, převážně gynekologové.

Druhou složku vyšetřovaného materiálu tvořilo vyšetřování těhotných žen na přítomnost protilátek proti toxoplazmóze.

12.2 Laboratorní metody v ČR

Během období diagnostiky toxoplazmózy se používané metody k detekci protilátek vyvíjely a měnily. Od roku 1997 do současnosti platí standardní schéma postupů vyšetřování na toxoplazmózu, kterým se řídí i naše laboratoř (110,111).

Podle této metodiky se praktikuje rozdílný přístup k různým druhům materiálu a kategorii pacientů. Neliší se ale vyšetřovací schéma. Odlišnosti najdeme v interpretaci a následné potřebnosti dalších vyšetření k upřesnění výsledku. Na rozdíl od zahraničních laboratoří a některých laboratoří v ČR používáme jako základní vyšetření u všech materiálů od všech pacientů komplementfixační reakci.

12.3 Vyšetřovací schéma

K dosažení co nejobektivnějšího závěru o momentálním vztahu lidského organismu (jeho imunitního systému) k onemocnění jsou vytvořena schémata, která se liší dle používaných metod. Odlišná jsou při používání pouze ELISA metod, jiná při použití KFR a ELISA metod.

V naší laboratoři používáme podle doporučení Národní referenční laboratoře pro toxoplazmózu v jednotlivých skupinách pacientů, resp. suspektních diagnóz tato schémata:

1. Imunokompetentní pacienti

KFR – při titru 1:32 a vyšším IgA, IgG a IgM

- opakovat za 2-3 týdny

2. Gravidní ženy

KFR – při negativě vyšetřit za 3 měsíce

- při titru 1:8 až 1:64 a IgM negativní dále nevyšetřovat
- při titru 1:128 a/nebo IgM pozitivní, vyšetřit IgA a IgG (aviditu) (vyšetřujeme IgA i IgM již u titrů 1:64)
- opakovat za 2 – 3 týdny

3. Novorozenci

Vzhledem k interpretaci získaného výsledku je ideálem současné vyšetření krve matky.

KFR – a současně IgA, IgG, IgM (sérum ředíme 1:20)

- opakovat za 2-3 týdny i při negativě

U ostatního materiálu (fetální krev, pupečnicková krev, plodová voda, mozkomíšní mok) používáme stejný postup a snažíme se o vyšetření séra novorozence.

4. Podezření na oční formu onemocnění

KFR – a současně IgA, IgG, IgM

- i v případě nízké pozitivity v kterémkoliv vyšetření pacienta žádáme další sérologické sledování pacienta

5. Imunosuprimovaní pacienti

KFR – a současně IgA, IgG, IgM

- při negativě opakovat za 3–6 měsíců

12.4 Statistické zpracování

Výsledky byly statisticky zpracovány programem EPI - INFO verze 6,04. Podklady byly čerpány z Listů epidemiologického vyšetření onemocnění Odboru epidemiologie Krajské hygienické stanice Plzeňského kraje.

Při přepočtech nemocnosti na počet obyvatel bylo čerpáno z dat Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky. V letech 1996-2004 byl průměrný počet obyvatel Západočeského kraje 855 428 (z toho 418 720 mužů a 436 708 žen).

Ve městě (Plzeň) žilo 79 762 mužů a 86 118 žen, celkem 165 880 osob. Na venkově (mimo město Plzeň) žilo 338 958 mužů a 350 590 žen, celkem 689 548 osob.

12.5 Laboratorní metody použité naší laboratoří

Výběr diagnostických metod má zásadní význam pro vyslovení kvalitní interpretace a co nejpřesnějšího závěru.

V naší laboratoři byly a jsou používány následující laboratorní metody k diagnostice toxoplazmózy, resp. k detekci protilátek proti toxoplazmovým antigenům v lidském séru:

1. Komplementfixační reakce
2. Precipitační reakce v agarovém gelu (v období shromažďování dat již nebyla používána)
3. Detekce specifických imunoglobulinů ELISA reakcemi
 - a) Imunoglobuliny IgG
 - b) Imunoglobuliny IgM
 - c) Imunoglobuliny IgA.

12.5.1 Komplementfixační reakce

Tato reakce byla od počátku laboratorní diagnostiky v rutinních laboratořích vyžadována jako závazné minimum. Celý laboratorní postup byl vypracován kolektivem autorů Zástěra, Pokorný, Kramář, Hübner a s drobnými úpravami je ve stejné podobě používána dodnes (112).

Princip reakce

Vazba komplementu je sérologická reakce, při níž se specifická protilátka váže

s antigenem za vzniku komplexu, který váže komplement. Detektorem volného komplementu je tzv. hemolytický systém (směs stejných dílů suspenze beraních krvinek a imunního séra proti beraním krvinkám).

Materiální vybavení

- plastové mikrotitrační destičky typu U
- ředící kličky nebo hřeben
- automatické pipety a kapačky (0,05–0,025 ml)
- lednice (+4 °C)
- termostat (37 °C)
- sérologická třepačka
- spektrofotometr k případnému měření denzity erytrocytů
- zvětšovací zrcadlo
- stolní centrifuga
- laboratorní sklo.

Ingredience

Veronalový pufr (VP)

Je ředícím roztokem pro všechny komponenty používané v reakci. Proto na jeho kvalitě závisí celý konečný úspěch či neúspěch.

S ohledem na standardizaci reakce byl od počátku dle metodiky doporučován tabletováný od firmy SEVAC. Tableta byla rozpouštěna v 10 ml destilované vody zahřáté na 80 °C. Po vychladnutí byl objem doplněn o dalších 10 ml destilované vody. Bylo nutné připravovat vždy čerstvý před každou reakcí.

Vzhledem k nepřesnostem v minulosti je v naší laboratoři používán veronalový pufr tohoto složení:

A) 5,5 diethylbarbiturová kyselina.....	5,75 g
B) NaCl.....	83,0 g
Na 5,5 diethylbarbiturát.....	3,75 g
MgCl ₂ 6 H ₂ O.....	1,68 g
CaCl ₂	0,28 g

Pracovní postup je následný:

1. Navážíme roztok A, rozpustíme v 300 ml horké redestilované vody a necháme vychladnout.
2. Do odměrné baňky na 2000 ml nalijeme cca 500 ml redestilované vody, ve které rozpustíme navážené složky roztoku B.
3. Přilijeme horký roztok A.
4. Objem doplníme na 2000 ml.
5. Hotový roztok promísíme a filtrujeme.
6. Upravíme pH na 7,2 a skladujeme při 4 °C.
7. Před použitím ředíme 1:5 studenou redestilovanou vodou.
8. Pro roztoky používáme chemikálie p.a. a vodu redestilovanou ve skle.

Beraní erytrocyty

Byly používány konzervované v Alseverově roztoku. Čerstvá defibrinovaná beraní krev se smísila se stejným množstvím Alseverova roztoku. Rozplnila se po 6–8 ml do sterilních tkáňově mytých zkumavek. Je nutno je uchovávat při 4 °C. Takto konzervované vydrží až 3 měsíce.

Alseverův roztok

H ₂ O.....	800 ml
NaCl.....	4,2 g
Natrium citricum.....	8,0 g
Acidum citricum.....	0,55 g
H ₂ O redest. ad.....	980 ml
pH 6,1 (nutno měřit pH metrem)	
glukóza.....	20,5 g

Roztok byl filtrován, sterilizován v Arnoldově přístroji při teplotě 100 °C třikrát v průběhu 3 dnů po dobu 30 minut.

Suspenze krvinek

Krvinky je nutno resuspendovat. Ze zkumavky se odsaje supernatant, doplní se veronalovým pufrem a centrifugují se 10 minut při 1000 otáček. Tímto způsobem se „promyjí“ celkem 3x vždy s výměnou pufru.

Pak byl odstraněn supernatant a byla připravena asi 3% suspenze ve veronalovém pufru. Žádaná 2,8% koncentrace byla dosažena doředěním a zpočátku kontrolována na spektrofotometru. Krvinky byly uchovávány při 4 °C a do reakce spotřebovány nejpozději do 24 hodin.

Hemolyzín

Byl užíván lyofilizovaný komerčně vyráběný. Do reakce se používá v ředění 1:1500 až 1:3000. Novou šarží hemolyzínu je třeba vždy titrovat.

Hemolytický systém (HS)

Byl připravován těsně před použitím smícháním stejného množství 2,8% suspenze krvinek a hemolyzínu. Směs byla inkubována v lázni 37 °C po dobu 30 minut.

Komplement

V zájmu standardizace je opět doporučován komplement lyofilizovaný, který vydrží bez ztráty aktivity několik let. Každou novou šarží je nutno titrovat. Komplement nesmí obsahovat antitoxoplazmové protilátky.

Používáme-li komplement nelyofilizovaný, musíme ho uchovávat při -60 °C. Uchovávaný při vyšších teplotách ztrácí svoji aktivitu a musí být před každou reakcí titrován.

Komplement je termolabilní látka, a tak veškeré operace s ním prováděné musí být za chladu. Rozpouštíme ho zásadně těsně před reakcí a používáme nejpozději do 2 hodin.

Stanovení hemolytické jednotky komplementu a optimálního ředění hemolyzínu se zjišťuje dvourozměrnou titrací obou složek současně.

Titrace komplementu a hemolyzínu

1. Do stojánku připravíme 11 zkumavek ve 3 řadách a umístíme do nádoby s vodou a ledem, aby 1/3 zkumavky byla ponořena. V první řadě jsou zkumavky označené 30, 60, 120, 240, ve druhé řadě 37,5, 75, 150 a 300 a ve třetí 47,5, 95 a 190.
2. Do zkumavky označené 30 napipetujeme 2,9 ml studeného VP, do

zkumavky označené 3,75 napipetujeme 3,65 ml VP a do zkumavky označené 47,5 napipetujeme 4,65 ml VP. Pak do prvních jamek v každé řadě po 0,1 ml studeného komplementu.

3. Titrovat začínáme od zkumavky 47,5 a přenášíme po 1 ml do dalších zkumavek (95 a 190). Stejným způsobem pak pokračujeme i u dalších zkumavek. Pak je seřadíme do jedné řady se stoupajícím ředěním komplementu od 30 do 300.
4. Nakapeme do mikrotitrační destičky po 0,05 ml studeného VP a do kontrol HS po 0,1 ml.
5. Od nejvyššího ředění (1:300) komplementu kapeme do každé jamky od shora dolů po 0,05 ml. Pak pokračujeme ředěním 1:240 atd.
6. Destičku protřepeme a uložíme do vlhké komůrky do ledničky. Připravíme po 1 ml ředění hemolyzínu 1:1000, 1:1500, 1:2000, 1:2500, 1:3000, 1:4000, 1:6000 a 1:8000. Zazátkované zkumavky uložíme do lednice.
7. Připravíme 10 ml suspenze 2,8% krvinek a uložíme v lednici.
8. Druhý den napipetujeme do 8 zkumavek označených ředěním hemolyzínu 1:1000–1:8000 po 1 ml 2,8% krvinek a přidáme po 1 ml příslušného ředění hemolyzínu. Opatrně promísíme a uložíme na 30 minut do lázně 37 °C. Během inkubace občas promísíme.
9. Po ukončení senzibilizace krvinek ve vodní lázni vyjmeme z lednice destičku s titrovaným komplementem a do příslušných řad zkumavek přidáváme po 0,025 ml příslušné hemolytické systémy, počínaje ředěním hemolyzínu 1:8000. Po nakapání a roztřepání se destička inkubuje ve vlhké komůrce při 37 °C 2x 30 minut. Po uplynutí 1. třicetiminutovky se destička opět protřepe. Potom se destička vyjme a uloží do lednice.
10. Odečítáme po 2 hodinách.

Hodnocení výsledků:

Optimální ředění hemolyzínu je to, které za přítomnosti minimální koncentrace komplementu působí úplnou hemolýzu krvinek.

Hemolytickou účinnost komplementu vyjadřujeme v jednotkách. Jednu jednotku obsahuje nejvyšší ředění komplementu, které při titraci způsobí úplnou hemolýzu.

Do reakce bereme vždy 2 jednotky komplementu.

Titrace antigenu

Jedná se o dvourozměrnou titraci pozitivního séra a antigenu, která umožňuje stanovit jeho optimální a pracovní ředění. To pak používáme ve vlastní reakci. Obě složky opět předředíme ve zkumavkách a přenášíme do mikrotitrační destičky.

Pozitivní sérum naředíme geometrickou řadou od 1:8 do 1:2048.

Negativní sérum naředíme pouze 1:8.

Antigen připravíme v ředění od 1:8 do 1:256.

1. Destičku popíšeme.
2. Do kolmých řad KA-2 a KA-1,25 a do vodorovné řady KS+ 0,025 VP. Do obou jamek kontrol HS 0,1 ml VP.
3. Do kolmé řady označené NS nakapeme 0,025 ml negativního séra ředěného 1:8.
4. Od nejvyššího ředění (1:2048) kapeme od shora dolů do každé jamky 0,025 ml příslušného ředění pozitivního séra.
5. Do každé jamky přidáme 0,025 ml antigenu. Pouze do řady označené KS+ a HS ne.
6. Do všech jamek mimo řady KA-1,25 a HS přidáme 0,05 ml 2 jednotkového komplementu.
7. Do řady označené KA-1,25 přidáme 0,05 ml 1,25 jednotkového komplementu
8. Destičku inkubujeme 18 hodin ve vlhké komůrce při +4 °C.
9. Druhý den připravíme hemolytický systém a přidáme do všech jamek 0,025 ml.
10. Destičku protřepeme a inkubujeme 30 minut v termostatu při 37 °C. Znovu protřepeme a inkubujeme dalších 30 minut.
11. Pak destičku uložíme do lednice. Odečítáme po dvou hodinách.

Hodnocení titrace

Kontroly označené KS+, NS a KA-2 musí být negativní.

V kontrole KA 1,25 může být pozitivita pouze na 1 křížek (silná pozitivita v této

kontrola signalizuje antikomplementaritu antigenu a v těchto ředěních nemůže být antigen použit do reakce).

Kontrola HS musí být pozitivní na 4 křížky.

Kvalita antigenu se určuje optimálním pracovním ředěním. To jsou ta, kdy antigen dosáhne s pozitivním sérem nejvyšší titr. Je-li těchto ředění více, používáme nejbližší nižší.

Vlastní provedení reakce

Séra nemají být chylózní, a kontaminovaná. Před vlastní reakcí se inaktivují 30 minut při 56 °C k odstranění přirozeného komplementu.

1. Do všech jamek destičky nakapeme 0,025 ml vychlazeného komplementu.
2. Ředící kličkou přeneseme do první jamky 0,025 ml vyšetřovaného séra (ředění 1:2), 10x otočíme kličkou a přeneseme do další jamky (ředění 1:4). Takto pokračujeme až do ředění 1:4096.
3. První jamka (1:2) slouží jako pomocné ředění, druhá jamka (1:4) jako kontrola antikomplementarity
4. Do každé jamky od ředění 1:8 kapeme 0,025 ml antigenu.
5. Dvoujednotkový komplement kapeme po 0,05 ml.
6. Systém kontrol:
 - známé pozitivní sérum
 - známé negativní sérum
 - kontrola antigenu
 - kontrola komplementu
 - kontrola hemolytického systému.
7. Po nakapání všech složek destičku protřepeme a uložíme ve vlhké komůrce do lednice na 16 – 18 hodin.
8. Druhý den připravíme hemolytický systém.

Hodnocení reakce

Hodnotí se sediment nelyzovaných krvinek a současně je nutné sledovat i čírost a zabarvení reakční směsi v každé jamce. Masivnost sedimentu krvinek se hodnotí na počet křížků:

1. negativní – v jamce není žádný sediment, reakční směs je čirá, homogenně zbarvená hemoglobinem lyzovaných krvinek
2. +/- - v jamce je stopa sedimentu krvinek, reakční směs je čirá, homogenně zbarvená hemoglobinem
3. + - v jamce je malý, ale dobře patrný sediment krvinek, reakční směs je čirá, homogenně zbarvená hemoglobinem
4. ++ - v jamce je dobře patrný sediment, zbarvení čiré reakční směsí hemoglobinem je zřetelně slabší
5. +++ - v jamce je mohutný sediment, čirá reakční směs má ještě zřetelné stopy zbarvení hemoglobinem
6. ++++ - v jamce je mohutný sediment krvinek a čirá reakční tekutina je prakticky bezbarvá

Za pozitivní považujeme ještě jamku, kde reakce dosáhla hodnoty alespoň ++.

Interpretace výsledků KFR

Tato metoda je citlivá a velmi dobře reprodukovatelná. Detekuje protilátky poměrně časně, již 2. týden po infekci. To není rozhodně na závadu, protože vzhledem k většinou nejasným příznakům onemocnění uplyne vždy delší doba od infekce k první návštěvě pacienta u lékaře. Protilátky jsou detekovatelné po řadu let.

Výsledky hodnotíme podle dosažené výše titrů, jejich stability nebo kolísání k vyšším či nižším hodnotám v průběhu onemocnění.

V KFR hodnotíme jako nízké titry 1:8–1:32, jako střední 1:64–1:128 a jako vysoké titry 1:256 a vyšší. Pacienti s titrem 1:64 a vyšším podléhaly hlášení do informačních systémů hygienické služby. Později hrála hlavní roli přítomnost specifických imunoglobulinů IgM.

12.5.2 Mikroprecipitace v agaru

Tato dnes již nepoužívaná reakce byla v naší laboratoři používána do roku 1988. Protože k některým závěrům hodnoceným v dalších kapitolách se došlo právě použitím této reakce, je zde uveden stručně její popis.

Je to doplňující reakce ke KFR a byla prováděna pouze u KFR pozitivních sér.

Princip reakce

MPA je typickou precipitační reakcí, kdy na místě kontaktu antigenu se specifickou protilátkou v agarovém gelu dochází k vazbě antigenu s protilátkou. Tento komplex vypadává z roztoku a je zviditelněn.

Antigen a protilátka jsou umístěny proti sobě a v místě kontaktu se vytváří precipitační linie.

Materiální vybavení

- mikroskopická podložní skla
- vodní lázeň
- pipety
- vlhká komůrka
- termostat 37 °C

Ingredience

Agarové médium

Destilovaná voda

Vlastní provedení reakce

1. Rozvařený agar se nanese na podložní mikroskopické sklo v cca milimetrové vrstvě, která se nechá utuhnout. Sklíčko je nutné položit na zcela rovnou plochu, aby vrstva byla rovnoměrná!!
2. Kovovou rourkou o průměru 3 mm vyřízneme dle šablony 5 otvorů. Nutno zachovat přesné vzdálenosti!
3. Ihned uložit do vlhké komůrky a zde ponechat až do odečítání.
4. 1. obvodový otvor plníme kontrolním pozitivním sérem, ostatní séry vyšetřovanými. Séra nemusí být inaktivovaná, nesmějí být chylózní.

5. Do prostředního otvoru plníme antigen.
6. Otvory naplníme po okraj.
7. Sklíčka uložíme na 5 hodin do termostatu (37 °C).
8. Každou hodinu doplňujeme vypařené množství všech složek.
9. Po pátém doplnění ponecháme sklíčka při pokojové teplotě.

Hodnocení reakce

Reakci odečítáme za 24 hodin lupou zvětšující 3–5x. Nejprve se hodnotí kontrola pozitivního séra. Měla by mít 2-3 linie intenzity +++.

Interpretace výsledků MPA

Reakci hodnotíme pouze jako pozitivní nebo negativní.

12.5.3 Detekce specifických imunoglobulinů ELISA reakcemi

12.5.3.1 Imunoglobuliny IgG

tyto reakce byly zaváděny do laboratoří v ČR od roku 1990 (113). Díky používání KFR naše laboratoř detekci IgG (včetně avidity) zavedla až v roce 2005. Jejich detekce má hlavně epidemiologický význam. Protilátky třídy IgG dosahují svého vrcholu v séru asi ½ roku po infekci, přetrvávají po řadu měsíců ve vysokých hladinách a řadu let jsou detekovatelné v hladinách nízkých. Svědčí tedy o dříve prodělané infekci *T. gondii*. K přesnějšímu určení fáze infekce nám pomáhá avidita IgG. (Viz níže.)

Princip reakce

Na vnitřním povrchu jamek mikrotitrační destičky je navázán antigen *T. gondii*. Po aplikaci vzorků při přítomnosti specifických IgG dochází k jejich vazbě na antigen. Nenavázané zbytky vzorků se vymyjí.

Na specifické imunoglobuliny IgG se naváže značená zvířecí protilátka proti lidskému IgG konjugovaná křenovou peroxidázou. Nenavázaný konjugát se odstraní a detekujeme peroxidázovou aktivitu.

Materiální vybavení:

- mikrotitrační destičky
- automatické pipety
- promývačka
- termostat
- fotometr.

Ingredience (dodávané v komerčním setu):

Potažená destička s navázaným antigenem

Lidské sérum bez protilátek proti *T.gondii* – negativní kontrola

Lidské sérum obsahující protilátky proti *T.gondii* v hraniční koncentraci – CUT-OFF

Lidské sérum obsahující protilátky proti *T.gondii* (60 IU/ml a 240 IU/ml) – pozitivní kontroly

Zvířecí protilátka proti lidskému IgG značená peroxidázou

Pufr se stabilizátory bílkovin – ředící roztok

Koncentrovaný pufr – promývací roztok

Substrátový roztok

1 mol/l kyselina sírová – zastavovací roztok.

Vlastní provedení reakce

1. Všechny reagenty nechat vytemperovat na pokojovou teplotu

2. Dávkovat dle schématu

A1 „blank“

A2 negativní kontrola

A3 CUT-OFF

A4 CUT-OFF

A5 pozitivní kontrola

A6-A96 testované vzorky

Testovaná séra ředíme 1:100, fetální a novorozenecká ředíme 1:20!

3. Destičku zakrýt a inkubovat 60 minut při 37 °C ve vlhké komůrce

4. Odsát jamky a 5x promýt promývacím roztokem

5. Do každé jamky dávkovat 100 µm konjugátu

6. Destičku zakrýt a inkubovat 60 minut při 37 °C ve vlhké komůrce

7. Odsát jamky a 5x promýt promývacím roztokem
8. Do všech jamek dávkovat 100 µm jednosložkového substrátu
9. Destičku zakrýt a inkubovat a inkubovat 20 minut při 37 °C v temnu
10. Zastavit reakci přidáním 100 µm zastavovacího roztoku
11. Intenzitu zbarvení roztoků změřit na fotometru při vlnové délce 450 nm.

Validita testu

Test je platný, jestliže:

1. Absorbance „blanku“ je menší než 0,150
2. Absorbance negativní kontroly je menší než 0,250
3. Průměrná absorbance CUT-OFF je v rozmezí 0,200–0,800
4. Absorbance pozitivní kontroly je nejméně dvojnásobek průměrné absorbance CUT-OFF.

Interpretace výsledků

Výpočet indexu positivity IP:

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

<u>Index positivity</u>	<u>hodnocení</u>
< 0,8	negativní
0,8–1,0	hraniční
> 1,0	pozitivní

12.5.3.2 Imunoglobuliny IgM

Tyto reakce byly v ČR zavedeny v roce 1990. Od počátku diagnostiky antitoxoplazmových protilátek byl vždy problém v určení fáze infekce. K tomu má dopomoci právě detekce specifických imunoglobulinů a znalost dynamiky jejich tvorby. V ČR se jako první (i díky zavedené a tradiční KFR) zavedla jako doplňková reakce detekce imunoglobulinů IgM. Nejprve jako „polotovar“ NRL a firmy SEVAC (113), později se objevily komerčně vyráběné sety různé provenience.

Princip reakce

Na vnitřním povrchu jamek mikrotitrační destičky jsou navázány zvířecí protilátky proti lidským IgM. Po aplikaci vyšetřovaného séra se na ně naváží všechny IgM (včetně antitoxoplasmových u „pozitivních sér“).

V druhém kroku se na specifické IgM naváže antigen *T.gondii* s antitoxoplazmovou protilátkou značenou peroxidázou (konjugát).

Po té se detekuje peroxidázová aktivita aplikací substrátu.

Materiální vybavení:

- mikrotitrační destičky
- automatické pipety
- promývačka
- termostat
- fotometr.

Ingredience (dodávané v komerčním setu)

Lidské sérum bez protilátek proti *T. gondii* – negativní kontrola

Lidské sérum obsahující protilátky proti *T. gondii* v hraniční koncentraci – CUT-OFF

Lidské sérum obsahující protilátky proti *T. gondii* – pozitivní kontrola

Antigen *T. gondii* s konjugátem - tracer

Pufr se stabilizátory bílkovin – ředící roztok

Koncentrovaný pufr – promývací roztok

Substrátový roztok

1 mol/l kyselina sírová – zastavovací roztok

Vlastní provedení reakce

1. Všechny reagensie nechat vytemperovat na pokojovou teplotu
2. Dávkovat dle schématu
 - A1 „blank“
 - A2 negativní kontrola
 - A3 CUT-OFF
 - A4 CUT-OFF

A5 pozitivní kontrola

A6-A96 testované vzorky

Testovaná séra ředíme 1:100, fetální a novorozenecká ředíme 1:20!

3. Destičku zakrýt a inkubovat 60 minut při 37 °C ve vlhké komůrce
4. Odsát jamky a 5x promýt promývacím roztokem
5. Do každé jamky dávkovat 100 µm traceru
6. Destičku zakrýt a inkubovat 60 minut při 37 °C ve vlhké komůrce
7. Odsát jamky a 5x promýt promývacím roztokem
8. Do všech jamek dávkovat 100 µm jednosložkového substrátu
9. Destičku zakrýt a inkubovat a inkubovat 20 minut při 37 °C v temnu
10. Zastavit reakci přidáním 100 µm zastavovacího roztoku
11. Intenzitu zbarvení roztoků změřit na fotometru při vlnové délce 450 nm.

Validita testu

Test je platný, jestliže:

1. Absorbance „blanku“ je menší než 0,150
2. Absorbance negativní kontroly je menší než 0,250
3. Průměrná absorbance CUT-OFF je v rozmezí 0,250 – 1,000
4. Absorbance pozitivní kontroly je nejméně dvojnásobek průměrné absorbance CUT-OFF.

Interpretace výsledků

Výpočet indexu positivity IP:

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

<u>Index positivity</u>	<u>hodnocení</u>
<0,9	negativní
0,9 – 1,1	hraniční
> 1,1	pozitivní

12.5.3.3 Imunoglobuliny IgA

Tato reakce byla zavedena v naší laboratoři v roce 1995. Její zavedení si vyžádala hlavně zjištění dlouhého přetrvávání imunoglobulinů IgM. Od původně proklamovaných měsíců (maximálně 1 roku) se ukázalo, že v některých výjimečných případech přetrvávají i několik let. K eliminaci těchto „časových nedostatků“ slouží právě detekce imunoglobulinů IgA. Obecně se uvádí, že přetrvávají méně než jeden rok a jejich detekce pak svědčí o akutní nebo nedávno proběhlé infekci.

Princip reakce

Na vnitřním povrchu jamek mikrotitrační destičky jsou navázány zvířecí protilátky proti lidským IgA. Po aplikaci vyšetřovaného séra se na ně naváží všechny IgA (včetně antitoxoplasmových u „pozitivních sér“).

V druhém kroku se na specifické IgA naváže antigen *T.gondii* s antitoxoplazmovou protilátkou značenou peroxidázou (konjugát).

Pak se detekuje peroxidázová aktivita aplikací substrátu.

Materiální vybavení

- mikrotitrační destičky (s navázanou protilátkou proti lidským IgA)
- automatické pipety
- promývačka
- termostat
- fotometr.

Ingredience (dodávané v komerčním setu)

Lidské sérum bez protilátek proti *T. gondii* – negativní kontrola

Lidské sérum obsahující protilátky proti *T. gondii* v hraniční koncentraci – CUT-OFF

Lidské sérum obsahující protilátky proti *T. gondii* – pozitivní kontrola

Antigen *T.gondii* s konjugátem - tracer

Pufř se stabilizátory bílkovin – ředící roztok

Koncentrovaný pufř – promývací roztok

Substrátový roztok

1 mol/l kyselina sírová – zastavovací roztok

Vlastní provedení reakce

1. Všechny reagensie nechat vytemperovat na pokojovou teplotu
2. Dávkovat dle schématu
 - A1 „blank“
 - A2 negativní kontrola
 - A3 CUT-OFF
 - A4 CUT-OFF
 - A5 pozitivní kontrola
 - A6-A96 testované vzorkyTestovaná séra ředíme 1:100, fetální a novorozenecká ředíme 1:20!
3. Destičku zakrýt a inkubovat 60 minut při 37 °C ve vlhké komůrce
4. Odsát jamky a 5x promýt promývacím roztokem
5. Do každé jamky dávkovat 100 µm traceru
6. Destičku zakrýt a inkubovat 60 minut při 37 °C ve vlhké komůrce
7. Odsát jamky a 5x promýt promývacím roztokem
8. Do všech jamek dávkovat 100 µm jednosložkového substrátu
9. Destičku zakrýt a inkubovat 20 minut při 37 °C v temnu
10. Zastavit reakci přidáním 100 µm zastavovacího roztoku
11. Intenzitu zbarvení roztoků změřit na fotometru při vlnové délce 450 nm.

Validita testu

Test je platný, jestliže:

1. Absorbance „blanku“ je menší než 0,150
2. Absorbance negativní kontroly je menší než 0,250
3. Průměrná absorbance CUT-OFF je v rozmezí 0,250 – 1,000
4. Absorbance pozitivní kontroly je nejméně dvojnásobek průměrné absorbance CUT-OFF.

Interpretace výsledků

Výpočet indexu pozitivity IP:

IP = absorbance vzorku/průměrná absorbance CUT-OFF

<u>Index positivity</u>	<u>hodnocení</u>
< 0,9	negativní
0,9 – 1,1	hraniční
> 1,1	pozitivní

13 Výsledky

13.1 Charakteristika vybraného souboru

Během vybraného období říjen 1996 – prosinec 2004 bylo vyšetřeno:

Tab. 3: Počet provedených vyšetření a vyšetřených osob

	Počet vyšetření	Počet osob
Muži	4 920	4 080
Ženy	32 595	24 742
Celkem	37 515	28 822

Z tohoto počtu: bylo 1 508 dětí mužského pohlaví
1 765 dětí ženského pohlaví
(0–18 let)

Tento jasný nepoměr ve prospěch počtu vyšetřených žen je způsoben zavedeným systémem vyšetřování gravidních žen v naší oblasti.

Při vyšetřování mužů a dětí se zpravidla jedná o vyšetření při podezření na toxoplazmózu, u žen je vyšetření preventivní - spojené s těhotenstvím. Tento vzorek pacientů slouží jako kontrolní soubor ke zjištění výskytu protilátek u zdravé ženské populace.

Jako kritérium k povinnosti hlásit onemocnění do informačních systémů hygienické služby byl brán zřetel na pozitivitu specifických imunoglobulinů IgM. Zpočátku sledovaného období toto kritérium nebylo striktně dodržováno a jako podklad k hlášení postačovaly vysoké titry protilátek ve vazbě komplementu (1:64 a vyšší).

Povinnost hlásit infekční onemocnění je až druhotná. Prvotní je popsat fázi onemocnění. Hlavně ve vztahu k terapii či další péči o pacienty, či těhotné ženy. V minulých letech, jak již bylo výše uvedeno, pozitivita imunoglobulinů IgM byla považována za signál akutní infekce, a proto tato metoda měla zásadní význam. Zásadní význam měla i volba používaného diagnostického setu. Ukázalo se, že sety příliš citlivé v rukách nezkušených pracovníků mohou vést k falešně pozitivním výsledkům. To potom může ovlivnit počet falešných výsledků v pozitivních, ale i negativních hodnotách.

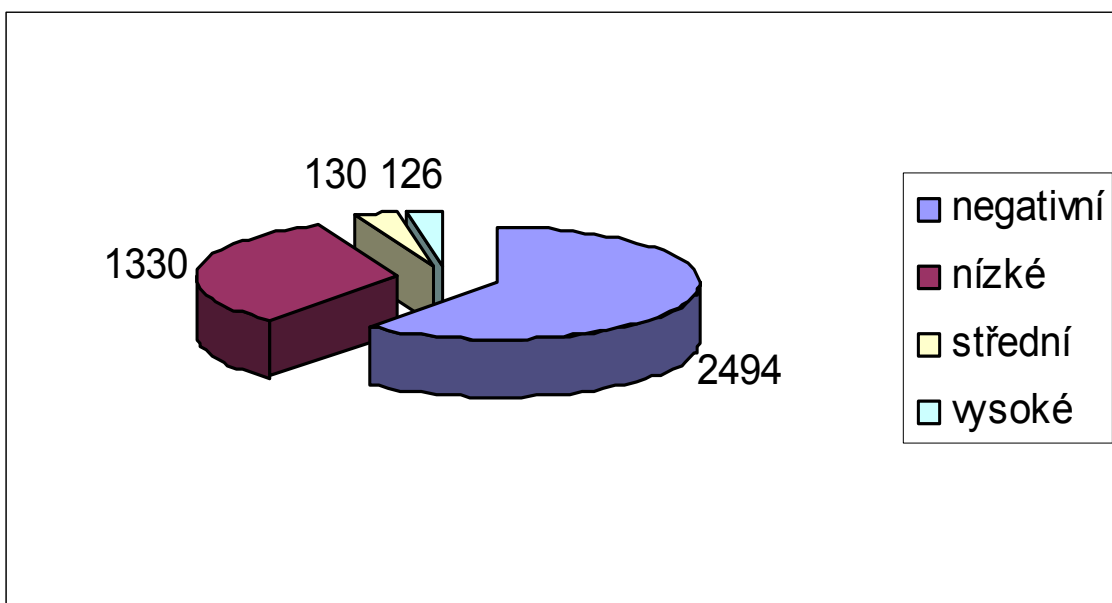
13.2 Rozložení titrů u vyšetřeného souboru

Tab. 4: Rozložení titrů u vyšetřeného souboru

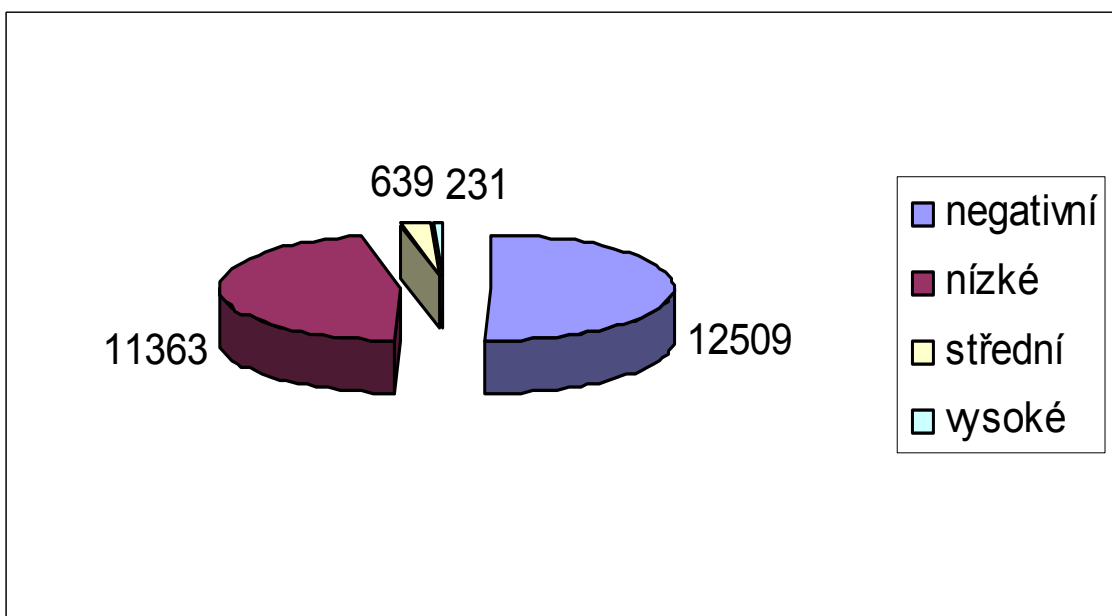
ROK	1996		1997		1998		1999		2000	
Pohlaví	Muži	Ženy	Muži	Ženy	Muži	Ženy	Muži	Ženy	Muži	Ženy
Negativ.	84	471	320	1484	315	1357	373	1732	341	1729
Pozitiv.	76	577	202	1355	221	1540	179	1427	172	1261
Titř 1: 8	30	249	64	529	65	502	68	563	42	413
16	20	181	69	447	69	590	39	508	64	470
32	12	95	35	242	38	293	31	237	23	249
64	4	19	15	70	17	88	9	55	14	76
128	2	16	8	28	6	28	2	18	6	29
256	5	9	0	14	7	10	1	19	5	7
512	0	3	5	8	3	10	11	9	4	7
1024	1	2	3	5	4	10	3	7	5	4
2048	2	2	0	6	7	5	10	7	4	6
4096	0	1	3	6	5	4	5	4	5	0

ROK	2001		2002		2003		2004		CELKEM	
Pohlaví	Muži	Ženy	Muži	Ženy	Muži	Ženy	Muži	Ženy	Muži	Ženy
Negativ.	289	1613	267	1514	229	1191	276	1418	2494	12509
Pozitiv.	172	1322	199	1523	220	1746	145	1482	1586	12233
Titř 1:8	61	425	91	802	113	832	72	788	606	5103
16	52	530	64	494	64	627	45	478	486	4325
32	29	257	29	159	22	227	19	176	238	1935
64	8	68	8	32	11	30	7	24	93	462
128	7	13	4	19	2	15	0	11	37	177
256	1	9	3	7	1	9	1	2	24	86
512	5	7	0	6	1	4	0	3	29	57
1024	3	11	0	3	2	2	1	0	22	44
2048	5	2	0	1	3	0	0	0	31	29
4096	1	0	0	0	1	0	0	0	20	15

Graf 1: Rozložení titrů u mužů



Graf 2: Rozložení titrů u žen



Jak ukazují tabulky a grafy, nejvyšší počet pozitivních titrů se pohybuje v oblasti nízkých hodnot (1:8 až 1:32) u 12 693 vyšetřených lidí (91,9 %). Střední hodnoty (1:64 a 1:128) vykazovalo 769 lidí (5,6 %) a vysoké titry (1:256 až 1:4 096) 357 lidí (2,5 %).

Zjevný je trend ubývání vysokých titrů (tab. 15). Zatímco v letech 1996–2000 byly detekovány u 263 lidí ze 7 010 pozitivních, v letech 2001–2004 to bylo pouze u 94 lidí z 6 809 pozitivních. Úbytek četnosti vysokých titrů je statisticky významný ($\chi^2=157,6$, $P=0,000$).

Jedním z důvodů by mohlo být rozdílné věkové rozložení pacientů s těmito titry v jednotlivých obdobích. Údaje v tabulce 5 tuto teorii nepotvrzují.

Tab. 5: Průměrný věk pacientů s titry 1:512 – 1:4 096

ROK	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
Muži	(19,6)	(18,3)	20,0	24,9	29,8	25,9	(-)	(17,2)	(25,0)
Ženy	(8,6)	30,6	29,2	29,6	21,8	26,1	(23,3)	(27,3)	(26,3)

(...) – počet sledovaných <20

13.3 Celkový počet hlášených onemocnění do informačních systémů hygienické služby (EPIDAT)

Počet hlášených onemocnění z naší laboratoře ukazuje následující tabulka. Všichni nemocní měli titr $\geq 1:64$ a byly u nich detekovány imunoglobuliny IgM, u některých i IgA. Opět je třeba si povšimnout zhruba stálých hodnot v prvních pěti letech studie a sestupného trendu v její druhé polovině. Odpovídá to situaci v celé ČR.

Následující data jsou výsledky vyšetření 22 977 žen, 2 572 mužů a 3 273 dětí do 18 let. Z tohoto počtu podléhalo dle platných kritérií hlášení do EPIDATu 177 žen, 49 mužů a 60 dětí do 18 let.

Tab. 6: Počet hlášených případů do informačních systémů hygienické služby

Rok	Celkem	Muži	Ženy	Děti	z toho Muži	Ženy
1996	43	6	25	12	7	5
1997	30	1	20	9	4	5
1998	45	11	25	9	7	2
1999	45	8	28	9	6	3
2000	41	9	21	11	6	5
Celkem	204	35	119	50	30	20
2001	27	6	18	3	1	2
2002	25	3	20	2	0	2
2003	16	4	8	4	4	0
2004	14	1	12	1	0	1
Celkem	82	14	58	10	5	5
Celkem	286	49	177	60	35	25

13.3.1 Počet hlášených případů ve vztahu k bydlišti

Tab. 7: Počet hlášených případů ve vztahu k bydlišti

	Celkem	Muži	Ženy	Děti	z toho Muži	Ženy
Město	148	33	89	26	16	10
Venkov	138	16	89	33	19	14

Jak ukazuje počet pozitivních případů ve vztahu k bydlišti (dříve uváděn jako rozhodující faktor odlišný způsob života ve městě a na vesnici), není v absolutních hodnotách ve vztahu k toxoplazmóze žádný statisticky významný rozdíl ($\chi^2 = 2,07, P = 0,15$). Dříve bylo uváděno, že těsnější vztah k přírodě má zásadní epidemiologický význam. Přepočteme-li ale nemocnost na 100 000 obyvatel, dostaneme se na výrazný rozdíl v nemocnosti městské populace oproti venkovské.

Tab. 8: Nemocnost populace přepočtená na 100 000 obyvatel.

	Město	Venkov
Muži	61,4	10,3
Ženy	114,9	29,4

Počet hlášených žen převažuje. Počet pozitivních dětí asi 3x, počet pozitivních mužů asi 4x. Venkovská populace byla z okresů Plzeň-jih (PJ), Plzeň-sever (PS) a Rokycany (RO). Jako městští pacienti jsou v naší studii vykazováni pouze obyvatelé města Plzně. Stejně rozdělení platilo i při realizaci tzv. sérologických přehledů prováděných SZÚ v Praze. V tomto souboru jsou tedy ženy většinou klinicky bezpříznakové a vysoké titry (podléhající hlášení) jsou odhaleny při těhotenském skríninku.

13.3.2 Počet případů dle nejpravděpodobnějšího zdroje infekce

Tab. 9: Počet případů dle nejpravděpodobnějšího mechanismu přenosu

Rok	Celkem	Strava	Kontakt se zvířaty	Neuvedeno
1996	43	6	21	16
1997	30	4	20	6
1998	45	6	19	20
1999	45	7	17	21
2000	41	6	16	19
Celkem	204	29	93	82
2001	27	3	14	10
2002	25	4	6	15
2003	16	3	7	6
2004	14	2	5	7
Celkem	82	12	32	38
Celkem	286	41	125	120

	Celkem	Muži	Ženy	Děti	z toho	Muži	Ženy
Strava	40	5	34	1		1	0
Kontakt se zvířaty	133	16	67	50		28	22
Neuvedeno	113	28	76	9		4	5

Jak se ukazuje, vliv požívání nedostatečně tepelně upraveného masa ustupuje do pozadí za uváděný kontakt se zvířaty. Z „Listů epidemiologického šetření“ lze velmi těžko rozlišovat „kontakt se zvířetem“ a „práci na zahrádce“. Většina lidí toto uváděla vždy současně. Tento možný způsob nákazy uvádí zhruba 3x vyšší počet pacientů.

To je poněkud v rozporu s trendem vyššího počtu onemocnění ve městě. Možná začíná ustupovat kontakt se zvířaty hospodářskými a převažuje městský chov koček.

Přibližně stejný počet lidí si neuvědomuje žádnou z výše uvedených možností. To je problém asi u většiny epidemiologických šetření. Srovnáme-li navzájem období 1996-2000 s obdobím 2001-2004, nezjistíme žádný statisticky významný rozdíl ($\chi^2=0,21$, $P=0,64$). Stejný výsledek dostaneme při srovnání obou pohlaví ($\chi^2=0,18$, $P=0,66$).

13.3.3 Rozdělení dle formy onemocnění

Tab. 10: Rozdělení dle forem onemocnění

Rok	Celkem	Uzlinová	Latentní	Gynekologická	Oční	Jiná
1996	43	32	8	0	0	4
1997	30	18	6	2	0	4
1998	45	32	6	5	1	1
1999	45	35	9	0	0	0
2000	41	29	10	1	1	0
Celkem	204	146	29	8	2	9

2001	27	17	7	2	0	1
2002	25	15	8	1	0	1
2003	16	11	4	0	0	1
2004	14	5	5	2	1	1
Celkem	82	48	26	5	1	4
Celkem	286	194	63	13	3	13

	Celkem	Muži	Ženy	Děti	z toho	Muži	Ženy
Uzlinová	194	47	91	56		26	30
Latentní	63	0	63	0		0	0
Gynekol.	13	0	13	0		0	0
Oční	3	0	2	1		0	1
Ostatní	13	1	9	3		2	1

Velkých chyb se klinici nedopouštějí při zaslání materiálu na vyšetření protilátek proti toxoplazmóze při konkrétním podezření na toto onemocnění. Do této oblasti spadají všechny formy uzlinové a oční u mužů a dětí.

Zpočátku byl problém se zařazením formy u těhotných žen. Gynekologové se dopouštěli chyb a přiřazovali některým ženám vyšetřeným v graviditě formu gynekologickou nebo dokonce „primoinfekce“ v graviditě. Obě dvě zařazení jsou nesprávná. Je-li v graviditě u ženy toxoplazmóza diagnostikována a nemá-li klinické příznaky, má být hlášena jako forma latentní nebo latentní v graviditě. (Viz tabulka dr. Beneše).

13.3.4 Sezónnost záchyťů

Tab. 11: Sezónnost záchyťů u jednotlivých skupin

ŽENY

	Měsíce											
Rok	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1996	9	3	3	5	2	0	0	4	3	2	4	2
1997	4	3	5	3	1	7	0	0	6	3	2	2
1998	6	5	3	2	2	3	6	3	5	1	2	0
1999	8	6	2	3	1	2	4	3	5	0	5	0
2000	3	1	2	0	1	7	2	4	6	4	0	3
2001	4	5	1	2	1	3	1	1	3	2	3	0
2002	2	4	2	1	2	1	0	2	3	3	3	1
2003	4	1	1	5	0	0	0	0	2	3	1	1
2004	1	1	3	0	0	4	1	1	2	3	0	1
	41	29	22	21	10	26	15	18	35	21	20	10

MUŽI

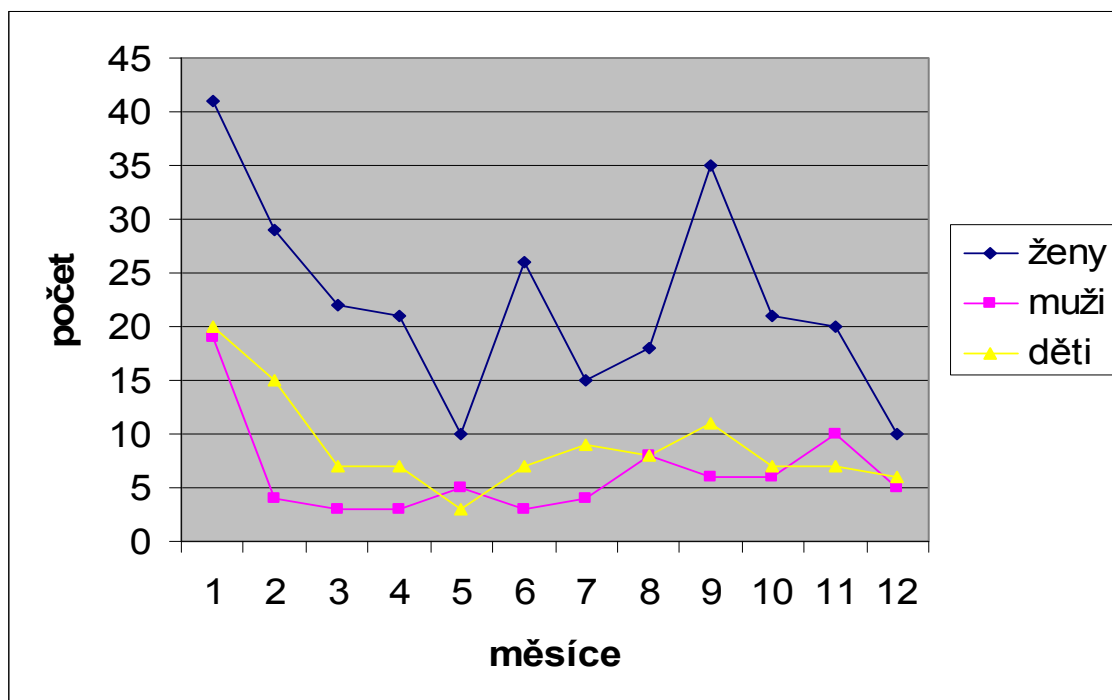
	Měsíce											
Rok	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1996	3	0	2	0	0	1	0	0	0	0	3	2
1997	0	0	1	0	1	0	0	0	2	1	0	1
1998	1	2	0	1	1	0	1	1	1	0	3	1
1999	4	0	0	0	1	0	1	1	2	0	1	0
2000	8	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
2001	1	0	0	0	0	1	0	2	1	2	1	1
2002	0	0	0	1	1	0	0	2	0	1	1	0
2003	2	1	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0
2004	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	19	4	3	3	5	3	4	8	6	6	10	5

DĚTI

Rok	Měsíce											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1996	4	4	1	2	1	1	4	1	2	3	1	2
1997	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1
1998	2	3	2	0	0	0	2	2	0	3	0	1
1999	8	2	1	1	0	0	1	1	2	0	1	0
2000	3	2	0	0	1	1	1	3	2	1	2	0
2001	0	0	1	1	1	2	0	0	2	0	1	1
2002	1	3	0	2	0	0	0	0	1	0	1	1
2003	0	1	1	0	0	2	0	0	1	0	0	0
2004	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	20	15	7	7	3	7	9	8	11	7	7	6

U všech sledovaných skupin je nejvyšší záchyt v prvních měsících roku. U žen a dětí dochází ještě k mírnému vzestupu v září.

Graf 3: Sezónnost záchytů u sledovaných skupin



Rozdělíme-li roky na zimní období (říjen–březen) a letní období (duben–září), dostaneme následující výsledky i v závislosti na způsobu nákazy:

Tab. 12: Počet hlášených případů v období zima/léto v závislosti na možném způsobu nákazy

	Zima (říjen–březen)	Léto (duben–září)
Strava	31	9
Kontakt se zvířaty	65	61
Neuvedeno	72	48
Celkem	168	118

Podíváme-li se na počet případů dle pravděpodobného mechanismu nákazy, je rizikový faktor „tepelně neupravené maso“ 3 x častější v zimních měsících. Rozdíl je statisticky významný ($\chi^2=8,36$, $P=0,0038$).

Žádné rozdíly během roku nebyly zjištěny u závislosti na kontaktu se zvířaty.

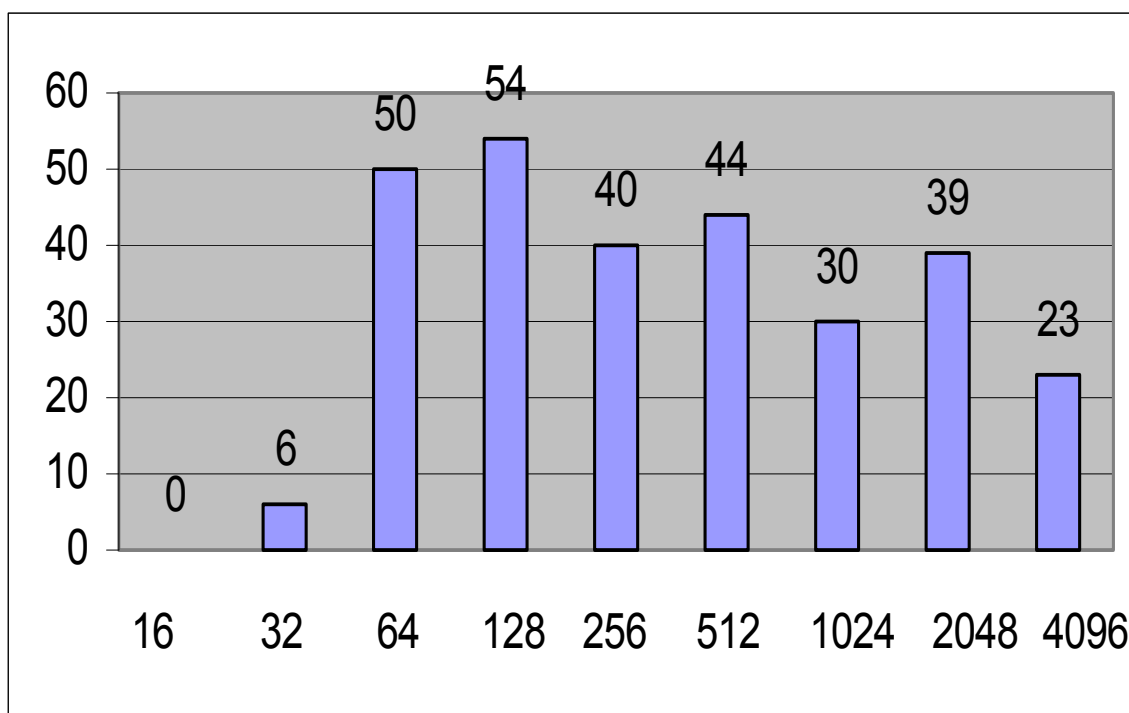
13.3.5. Rozložení titrů v KFR

V našem souboru bylo nejvíce případů v oblasti tzv. středních titrů (1:64–1:256) s klesající tendencí k titrům vysokým.

Tab. 13: Rozložení titrů v KFR

	CELKEM	1:16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096
1996	43	0	0	1	14	9	7	5	6	1
1997	30	0	2	5	2	3	3	2	6	6
1998	45	0	0	8	5	3	10	8	6	5
1999	45	0	0	4	8	7	7	4	7	8
2000	41	0	1	6	10	5	4	5	9	2
2001	27	0	2	5	2	6	6	3	4	0
2002	25	0	0	11	4	7	2	1	0	0
2003	16	0	0	4	6	0	2	2	1	0
2004	14	0	1	6	3	0	3	0	0	0
	286	0	6	50	54	40	44	30	39	23

Graf 4: Rozložení titrů v KFR



13.3.6 Přítomnost specifických imunoglobulinů IgM a IgA

Tab. 14: Detekce specifických imunoglobulinů IgM a IgA

	Celkem	IgM	IgA
1996	43	29	6
1997	30	29	14
1998	45	43	24
1999	45	42	20
2000	41	41	18
2001	27	27	11
2002	25	25	13
2003	16	16	11
2004	14	14	9
	286	266	126

Prvotní kritérium pro povinnost hlášení onemocnění (laboratorní signalizace) byl zjištěný titr $\geq 1:64$. Po rutinním zavedení detekce specifických imunoglobulinů IgM se pravidla upravila a podmínkou byla právě jejich pozitivita.

Jak ukazuje tabulka, i naše laboratoř se s tím vyrovnávala postupně a diskrepance v počtech hlášených onemocnění a počtem lidí s přítomností IgM jsou způsobeny někdy hlášením i vysokých titrů bez přítomnosti těchto specifických imunoglobulinů (nejsou zahrnuty ve sledovaném souboru). Naopak u šesti pacientů dosáhly titry v KFR pouze hodnoty 1:32. U všech byly pozitivní obě třídy imunoglobulinů.

Po zjištění, že mohou imunoglobuliny IgM přetrvávat až 3 roky, ani jejich přítomnost není důkazem o akutním, právě probíhající onemocnění.

13.3.7 Srovnání počtů vyšetření a pozitivních osob v období 1996-2000 a 2001-2004

Tab. 15: Počet vyšetřených a pozitivních osob v obdobích 1996-1999 a 2000-2004

Období	1996-2000			2001-2004		
Počet vyš.	19 656			17 859		
Poč. osob	15 216			13 606		
	Muži	Ženy	Celkem	Muži	Ženy	Celkem
Počet vyš.	2 749	16 907	19 656	2 171	15 688	17 859
Poč. osob	2 283	12 933	15 216	1 797	11 809	13 606
Negativní	1 433	6 773	8 206 (53,9 %)	1 061	5 736	6 797 (49,9 %)
Pozitivní	850	6 160	7 010 (46,1 %)	736	6 073	6 809 (50,1 %)
1:						
8	269	2 256	2 525	337	2 847	3 184
16	261	2 196	2 457	225	2 129	2 354
32	139	1 116	1 255	99	819	918
Nízké t.	6 237 (88,9 %)			6 456 (94,8 %)		
64	59	308	367	34	154	188
128	24	119	143	13	58	71
Střední t.	510 (7,3 %)			259 (3,8 %)		
256	18	59	77	6	27	33
512	23	37	60	6	20	26
1024	16	28	44	6	16	22
2048	23	26	49	8	3	11
4096	18	15	33	2	0	2
Vysoké t.	263 (3,8 %)			94 (1,4 %)		

13.4 Nemocnost a počet vyšetřených v jednotlivých věkových skupinách

Následující tabulky ukazují počet vyšetřených lidí (mužů a žen) v jednotlivých věkových skupinách.

U mužů je v jednotlivých skupinách počet velmi stálý bez výrazných výkyvů.

Naopak u žen dochází k markantnímu nárůstu počtu vyšetření v souvislosti s těhotenstvím (věkové skupiny 15–19, 20–24, 25–29, 30–39).

Od tohoto faktu se samozřejmě odvíjí počet zachycených latentních forem onemocnění, kdy ve věkové skupině 15–19 dochází ke zlomovému nárůstu v souvislosti s prenatálním skríninkem.

Zajímavostí je posun nejvyšších počtů vyšetření z věkové skupiny 20–24 do skupiny 25–29. Tento zlom nastává kolem roku 2000 a je to následkem prokázaného faktu v naší společnosti - posunu gravidity do pozdějšího věku.

Tab. 16: Počet vyšetřených v jednotlivých věkových skupinách

Muži

VĚKOVÉ SKUPINY											
Rok	0-4	5-9	10-14	15-19	20-24	25-29	30-39	40-49	50-59	>60	Celkem
1996	27	17	20	20	15	8	14	16	13	9	60
1997	123	77	49	53	43	24	48	46	30	29	522
1998	112	88	58	58	58	29	41	40	33	19	536
1999	113	78	59	64	50	44	50	42	30	22	552
2000	95	48	40	64	46	58	57	42	34	29	513
2001	87	51	44	46	43	43	84	38	15	10	461
2002	84	43	49	40	44	49	48	29	49	31	466
2003	89	40	29	28	39	36	68	48	47	26	449
2004	97	25	25	32	35	52	53	38	36	28	421
Cel.	827	467	373	405	373	343	463	339	287	203	4 080
Poz.	200	225	161	154	162	154	180	135	129	86	1 586
%	24,2	48,2	43,2	38,0	43,4	44,9	38,9	40,0	44,9	42,4	38,9

Ženy

VĚKOVÉ SKUPINY											
Rok	0-4	5-9	10-14	15-19	20-24	25-29	30-39	40-49	50-59	>60	Celkem
1996	31	15	31	90	408	264	158	31	10	10	1 048
1997	92	49	64	226	991	812	455	80	36	34	2 893
1998	80	64	48	208	973	854	526	78	36	30	2 897
1999	84	45	55	215	958	1 083	572	90	32	25	3 159
2000	69	39	61	153	824	1 102	600	75	37	30	2 990
2001	76	32	42	137	662	1 183	657	86	37	23	2 935
2002	80	32	36	102	509	1 178	939	87	47	27	3 037
2003	69	24	28	75	430	1 132	1 009	94	49	27	2 937
2004	52	19	29	95	438	1 201	936	79	28	23	2 900
Cel.	633	319	394	1301	6 193	8 809	5 852	700	312	229	24 742
Poz.	172	169	239	778	3 179	4 500	2 597	347	157	95	12 233
%	27,2	53,0	60,7	60,0	51,3	51,1	44,4	50,1	50,1	41,5	49,4

Tab. 17: Počet onemocnění v Plzeňském kraji v období 1996-2004

Věk	Muži	Ženy	Celkem
1-4	4	6	10
5-9	12	10	22
10-14	10	13	23
15-19	22	22	44
20-24	12	44	56
25-29	8	51	59
30-39	7	48	55
40-49	5	12	17
50-59	7	9	16
≥60	4	4	8

13.5 Přítomnost protilátek u zdravé ženské populace

Vzhledem k tomu, že naše laboratoř nikdy neorganizovala sérologické přehledy, jako vzorek zdravé populace k zjištění přítomnosti protilátek nám posloužil nemalý soubor žen, zaslaných k vyšetření v rámci prenatálního skríninku. Do tohoto souboru byly vybrány všechny ženy s tzv. neinfekční diagnózou:

Z311 – umělé oplodnění

Z312 – oplodnění in vitro

Z313 – jiné nápomocné oplodňovací metody

Z314 – vyšetřování a testování plodnosti

Z315 – genetická porada

Z316 – obecná porada a rada o plodnosti

Z318 – jiné řízení plodnosti

Z319 – řízení plodnosti

Z32 - vyšetření a test na těhotenství

Z320 – těhotenství dosud nepotvrzené

Z321 – těhotenství potvrzené

Z33 - náhodný stav těhotenství

Z34 - dohled nad normálním těhotenstvím

Z340 – dohled nad normálním prvním těhotenstvím

Z348 – dohled nad jiným normálním těhotenstvím

Z349 – dohled nad normálním těhotenstvím, NS

Z35 - dohled nad vysoce rizikovým těhotenstvím

Z350 – dohled nad těhotenstvím s anamnézou neplodnosti

Z351 – dohled nad těhotenstvím s anamnézou abortivního výsledku

Z352 – dohled nad těhotenstvím s jinou nepříznivou reprodukční porodnickou anamnézou

Z353 – dohled nad těhotenstvím s anamnézou nedostatečné antenatální péče

Z354 – dohled nad těhotenstvím ženy, která mnohokrát rodila

- Z355 – dohled nad starší prvorodičkou
 Z356 – dohled nad velmi mladou prvorodičkou
 Z357 – dohled nad vysoce rizikovým těhotenstvím vzhledem k sociálním podmínkám
 Z358 – dohled nad jinými vysoce rizikovými těhotenstvími
 Z359 – dohled nad vysoce rizikovým (ohroženým) těhotenstvím
- Z36 - předporodní screening
 Z360 – předporodní screening chromosomálních anomálií
 Z361 – předporodní screening zvýšené hladiny alfa proteinu
 Z362 – jiný předporodní screening založený na amniocentéze
 Z363 – předporodní screening nad (malformací) používající ultrazvukové a jiné fyzikální metody
 Z364 – předporodní screening opožděného růstu plodu používající ultrazvukové a jiné fyzikální metody
 Z365 – předporodní screening izoimunizace
 Z368 – jiný předporodní screening
 Z369 – předporodní screening, NS
 Z370 – jediné dítě, živě narozené.

V letech 1996 (od října) až 2004 bylo celkem provedeno 25 145 vyšetření u 17 850 těhotných žen.

Tab. 18: Počet vyšetření a pozitivita u těhotných žen

	Počet vyšetření	Počet těhotných žen (%)	Počet „nemocných“ žen (%)
Celkem	25 145	17 850	6 892
Negativní	11 899	9 356 (52,4 %)	3 153 (45,7 %)
Pozitivní	13 246	8 494 (47,6 %)	3 739 (54,3 %)
1:			
8	5 577	3 600	1 503
16	5 192	3 222	1 103
32	1 884	1 300 (95,6 %)	635 (86,6 %)
64	387	258	204
128	131	70 (3,9 %)	107 (8,4 %)
256	43	20	66
512	17	12	45
1024	9	6	38
2048	3	3	26
4096	3	3 (0,5 %)	12 (5,0 %)

Srovnáme-li výskyt protilátek u ženské populace v našem souboru s výsledky celostátních sérologických přehledů v letech 1977, 1983, 1985, 1987 a 1990, zjistíme, že prevalence v jednotlivých okresech je velmi variabilní. V těchto přehledech byly zahrnuty okresy s městským charakterem (Brno, Praha) i venkovským. Prevalence ve venkovských oblastech se pohybovala v rozmezí od 11,3 % (v souboru 17 žen z Chebu) do 68,7 % (90 žen ze Strakonice). Celkem tehdy bylo vyšetřeno 667 žen a 39,9 % bylo pozitivních. Možný vliv používání různých metod je diskutován v kapitole 14 v bodě 4: Rozložení titrů v populaci.

V našem souboru 17 850 žen je pozitivních 8 494, což je 47,6 %. 96,5 % žen vykazovalo nízké titry, 3,9 % titry středních hodnot a jen 0,5 % dosahovalo hodnot vysokých.

I v tomto souboru je patrný stejný trend pozorovaný u celého souboru pacientů. Zatímco v letech 1996–2000 vykazovalo velmi vysoké titry (1:512 – 1:4096) 20 žen, v letech 2001 až 2004 jen 4 ženy.

Srovnáme-li výsledky souboru gravidních žen (s neinfekční diagnózou) se souborem mužské populace (s podezřením na toxoplazmózu), dostaneme se k následujícím číslům:

Tab. 19: Pozitivita u jednotlivých vyšetřovaných skupin

	Muži	Ženy	Těhotné ženy
Negativní	60,5 %	45,7 %	52,4 %
Pozitivita celková	39,5 %	54,3 %	47,6 %
V nízkých titrech	83,9 %	86,7 %	95,6 %
Ve středních titrech	8,2 %	8,3 %	3,9 %
Ve vysokých titrech	7,9 %	5,0 %	0,5 %

Ve skupině vyšetřených mužů převažují (ve srovnání s ženskou populací) střední a vysoké titry. Jejich séra jsou zasílána s podezřením na toxoplazmózu a nebo k jejímu vyloučení.

Těhotné ženy s „neinfekční diagnózou“ odpovídají zdravé populaci, a tak je výskyt těchto hodnot výrazně nižší.

Zajímavá je celková pozitivita. Zatímco u žen ji můžeme brát jako procento promořenosti zdravé populace, u mužů nikoliv.

14 Diskuse

1. Používané diagnostické soupravy

V naší laboratoři jsou používány diagnostické metody a schémata dle doporučení NRL. Důvody jsou samozřejmě odborné (specifická, senzitivita), ale i ekonomické.

Používání KFR jako první reakce umožňuje již podle výše titru stanovit konkrétní doporučení pro ošetřující lékaře nebo rozhodnout o použití dalších laboratorních metod k detekci protilátek. Na základě těchto výsledků je od určité výše titru nutné používat paralelně i detekci imunoglobulinů IgM a IgA metodou ELISA. Jejich vyšetření pomáhá upřesnit fázi onemocnění. U imunosuprimovaných pacientů, při podezření na oční formu onemocnění nebo při nějakých rozporech doplňujeme schéma o detekci imunoglobulinů IgG včetně jejich avidity. Toto spektrum nám umožňuje co nejuvěstičněji specifikovat klinikům aktuální stav imunitního systému pacienta ve vztahu k onemocnění.

Používání pouze detekce specifických imunoglobulinů IgG, čehož jsme byli v počátcích diagnostiky na některých pracovištích svědkem, má omezený význam. Na základě výsledku této reakce - „pozitivní x negativní“ není možné vyslovit žádný závěr k aktuálnímu stavu pacienta. Pouze to, zda pacient má nebo nemá protilátky, tudíž zda se s onemocněním setkal, či nikoliv. V posledních letech nám situaci v přiblížení fáze infekce poněkud ulehčila možnost stanovení avidity IgG

Je tedy nutné ELISA reakce používat v kombinaci a provádět detekci minimálně IgG a IgM imunoglobulinů. To ovšem markantně zvyšuje náklady na vyšetření. V současném Seznamu zdravotních výkonů s bodovými hodnotami pro rok 2006 je výkon 82093 - Stanovení protilátek metodou konsumpce komplementu KFR ohodnoceno 164 body. Provádí-li laboratoř KFR jako skříninkovou reakci, u 80-90 % patientských vzorků postačuje tento krok a cena vyšetření je 164 x momentální hodnota bodu v korunách. Vyžaduje-li to situace, potom samozřejmě u vybraných sér dle výsledku KFR musíme připočítat náklady na ELISA reakce. Výkon 82077 – Stanovení protilátek proti antigenům virů, bakterií, prvků (ELISA) je ohodnocen 466 body. Provádí-li laboratoř pouze ELISA reakce, musí stanovit v prvním kroku imunoglobuliny IgG i IgM. To znamená u každého séra 2 x 466 x momentální hodnota bodu.

Rozhodující je rovněž výběr vhodného diagnostického setu. Opět je patrně minulostí neřízený dovoz od neznámých výrobců. Každý používaný set nebo systém by měl projít před distribucí kontrolou a doporučením (či nikoliv) Národní referenční laboratoří pro toxoplazmózu. Zpětnou reakci o používaných setech má NRL v současné době pravidelně prostřednictvím Externího hodnocení kvality (EHK) organizovaném Státním zdravotním ústavem v Praze. Každý z účastníků této kontroly je povinen nahlásit používané soupravy. Je to jedna z cest, jak zkvalitnit laboratorní diagnostiku toxoplazmózy.

Dle nejaktuálnějších výsledků se v roce 2005 tohoto EHK účastnilo 99 laboratoří z ČR (v roce 1995 51 laboratoří). Vzhledem k tomu, že zdravotní pojišťovny při proplácení laboratorních výkonů v současnosti stále důsledněji vyžadují potvrzení o účasti v této kontrole, toto číslo patrně zahrnuje všechny laboratoře diagnostikující v ČR sérologicky toxoplazmózu.

Z tohoto počtu metodu KFR používá okolo 64 laboratoří, ostatní pouze ELISA reakce.

Striktní metodický pokyn, které metody se musí používat, neexistuje. Nelze říci, která z obou používaných strategií je odborně kvalitnější. Rozhodují tedy jiné okolnosti, jako je přístrojové vybavení laboratoře, zkušenosti odborných pracovníků atd.

Cílem je jediné – co nejkvalitnější laboratorní výsledek a co nejpřesnější interpretace tohoto výsledku.

Jediným existujícím kontrolním systémem v ČR je výše zmíněné EHK, které sleduje jak dosažený výsledek u zaslaných testovacích sér, tak i schopnost jeho interpretace laboratorními pracovníky.

Diskuse o kvalitě a možné kontrole všech nepřímých diagnostických postupů je dlouholetá a možná věčná. K dispozici máme kontrolní systémy používaných diagnostických setů, možností vnitřní kontroly může být přidávání již vyšetřených sér o známém titru nebo optické denzitě atd. Záleží pouze na odpovědnosti laboratorních pracovníků každé laboratoře. Vnější kontrola kvality práce (EHK) případné nedostatky odhaluje zpětně a zatím bez možnosti jakýchkoliv sankcí proti nekvalitní laboratorní práci.

Důležitost znalosti kvality používaných diagnostických setů, od které se odvíjí interpretace, dokazuje následující tabulka. Bylo vyšetřeno 282 sér testy používanými

naší laboratoří - KFR, ELISA IgM (další jsme v té době neprováděli). Výsledky byly porovnány s dosaženými jiným systémem.

	Negativní	Pozitivní	
		1: 8 – 1:32	1:64 <
KFR	141	141	0
<u>ELISA IgM</u>	<u>282</u>	<u>0</u>	
ELISA I. IgM	278	4 (2x u titru 1:16 2x u titru 1:32)	
ELISA I. IgG	210	72	

Vidíme nesrovnalosti nejen při porovnání KFR s IgG, kde to možné je. Z nějakých důvodů někdy i séra s titry v KFR 1:8 mohou být negativní. To by vysvětlovalo vyšší počet negativních sér u citlivější ELISA reakce při detekci imunoglobulinů IgG.

Zarážející je pozitivita 4 sér v třídě imunoglobulinů IgM. (Test byl několikrát ověřen a jednalo se o falešné positivity.) Uvážíme-li, že pozitivita těchto imunoglobulinů dříve byla interpretována jako signál akutního onemocnění, mohou být následky z hlediska péče o takového pacienta nebo těhotnou ženu velmi vážné.

2. Zkušenosti při interpretaci výsledku

Tak jako v každém oboru i zde platí, že k interpretaci jakéhokoliv výsledku je třeba mnoho zkušeností. Tím více při interpretaci výsledků sérologických. I při používání setů, poloautomatických a automatických diagnostických systémů se každý odborník ocitne v situaci, kdy pouhý návod k provedení reakce a návod k interpretaci je naprosto nedostačující a získaný výsledek nespňuje žádná požadovaná kritéria. Pak musí pouze na základě osobních zkušeností rozhodnout o dalších krocích laboratoře, konzultaci s ošetřujícím lékařem, vyžádání dalšího vyšetření eventuelně nového vzorku. Musí ale nejprve tyto diskrepance odhalit. Spoléhá-li se pouze na pokyny výrobce, většinou se tak nestane.

Je třeba si uvědomit, že na základě každého laboratorního vyšetření lékař rozhoduje o další péči o pacienta. Jak kvalitní asi může být na základě výsledku nepravdivého?

3. Hlášení do informačních systémů hygienické služby

Hlášení do informačních systémů v České republice je zprostředkováváno hygienickou službou. Všechna data se pak objevují v systému EPIDAT. Na základě diagnostiky vybraných infekčních onemocnění existuje povinnost hlásit každý takový případ. Mezi tato onemocnění patří i toxoplazmóza.

V ČR systém hlášení řeší Zákon o ochraně veřejného zdraví 258/2000 Sb., který ukládá každé osobě poskytující zdravotní péči povinnost hlásit onemocnění. V minulosti laboratoř zaslala výsledek ošetřujícímu lékaři a tzv. signalizovala nález příslušnému spádovému pracovišti epidemiologie.

V informačním systému by se měly objevit pouze ty případy, u kterých příslušné pracoviště epidemiologie obdrží hlášení od ošetřujícího lékaře i z laboratoře.

Bohužel ani v minulosti, ani v současnosti není systém striktně dodržován.

I to může být důvod někdy velmi rozdílných počtů onemocnění v jednotlivých krajích republiky.

Naše pracoviště všechna infekční onemocnění podléhající hlášení do informačních systémů hygienické služby příslušnému pracovišti epidemiologie hlásí.

4. Soubor pacientů

Protože naše laboratoř je součástí Mikrobiologického ústavu LF a FN v Plzni, zpracovaným materiálem byly pouze nám dodané patientské vzorky z Fakultní nemocnice a externích zdravotnických zařízení. Do této skupiny patří mužská, ženská i dětská populace.

Většina požadavků na vyšetření žen pochází z gynekologických ordinací jako žádost o vyšetření v graviditě.

I když podrobné zpracování problematiky kongenitální toxoplazmózy není předmětem této práce, námi dosažené výsledky dokazují nutnost prenatálního vyšetření.

5. Rozložení titrů v populaci

Jedním ze sledovaných kritérií byl výskyt protilátek proti toxoplazmóze v populaci Plzeňského kraje. K tomu slouží buď detekce imunoglobulinů IgG a nebo v ČR používanější tradiční KFR. Měli jsme možnost srovnávat se sérologickými

přehledy prováděnými v ČR opakovaně a nebo s lokálními studii mimo těchto přehledů. V literatuře se uvádí pro naši republiku výskyt protilátek od 25 do 38 % (39). V současnosti je ale v našem kraji jejich prevalence podstatně vyšší.

U „nemocné“ populace mužů to bylo u 39,5 %. Dá se tedy předpokládat, že u zdravé populace bude promořenost nižší a bude odpovídat zjištěným celostátním hodnotám. Nemáme možnost tento soubor vyšetřovat.

Výsledky u zdravé ženské populace vykazují promořenost v Plzeňském kraji podstatně vyšší než udává průměr v celé ČR – 47,6 %. U „nemocných“ žen byla zjištěna ještě vyšší prevalence - 54,3 %. V celém souboru zdravých i „nemocných“ žen jsme prokázali pozitivitu u 49,4 % vyšetřených.

Je nutné také počítat s tím, že v sérologických přehledech prováděných do roku 1999 byla pozitivita zjišťována častěji než v současnosti (jak vidíme i v našem materiálu). Bohužel séra z našeho regionu v letech 1996-2001 nebyla v rámci sérologických přehledů na celostátní úrovni vyšetřována, a tak není bezprostředně možné naše výsledky porovnat.

Výsledky jsou bohužel neporovnatelné i díky odlišné metodice vyšetření. Byla prováděna pouze KFR, u které se navíc měnila hranice positivity. Až do roku 1985 byl brán jako první pozitivní titer 1:16. Později i 1:8, ale v té době už sérologické přehledy nebyly prováděny v našem kraji. To částečně vysvětluje, nižší výskyt protilátek v populaci v minulosti.

Poslední sérologické přehledy, které se prováděly v Západočeském kraji, jsou z roku 1985 (112). V tomto roce bylo vyšetřeno 293 sér z Plzně s velmi překvapivým výsledkem. U mužů bylo pozitivních 5,5 % sér, u žen 10,9 %. Takto nízké hodnoty nebyly nikdy dosaženy a patrně se jednalo o zvláštní shodu okolností. V tomtéž roce byla také vyšetřována séra z Mělníka a Trutnova, kde se výsledky blíží více celostátnímu průměru. V Mělníce byla pozitivita u 12,5 % mužů a 17,3 % žen, v Trutnově u 29,3 % mužů a 40,7 % žen.

Autoři těchto přehledů - Zástěra, Pokorný, Švandová připomínají, že ani před tím (ani potom) nabyla žádná oblast vyšetřena opakovaně, takže bezprostřední vývoj promořenosti populace v konkrétní oblasti není možné sledovat (114).

Další možnost porovnání máme z dat ze 70. let minulého století, kdy Beneda vyšetřoval ženy z Plzeňska s patologickým těhotenstvím (375 vzorků) a zároveň séra zdravých žen (350 sér). Kritéria hodnocení byla nastavena jako naše. Pozitivita byla

hodnocena od titru 1:8. Výsledkem bylo 28,8 % pozitivních žen s patologickým těhotenstvím a 22,3 % pozitivních zdravých žen (115).

Další ze studií, která byla realizována v západních Čechách, ale již v 60. letech minulého století, potvrzuje u 221 ženy vyšetřené po porodu pozitivitu u 23,0 % (1).

Zajímavá je distribuce titrů v nízkých, středních a vysokých hodnotách. Pochopitelně v nejvyšším počtu jsou zastoupeny nízké titry. U mužů to je 83,9 %, u žen 86,7 %, ale u těhotných žen 95,6 %. Střední titry vykazuje 8,2 % vyšetřených mužů a téměř shodné procento „nemocných“ žen - 8,3 %. U těhotných žen je toto číslo opět podstatně nižší – 3,9 %. Ve vysokých titrech je rozdíl ještě výraznější. U mužů v 7,9 %, u stejné skupiny žen v 5,0 % a u těhotných žen pouze v 0,5 % případů. Větší výskyt středních a vysokých titrů u prvních dvou kategorií vyšetřovaných je pochopitelný, protože přichází na vyšetření z nějakého důvodu na základě určitých klinických příznaků.

U všech vyšetřovaných sér byla srovnávána situace v letech 1996-2000 s obdobím 2001-2004. Byl vykázán významný posun. V oblasti nízkých titrů došlo k vzestupu z 88,9 % na 94,8 % v druhém období. Naopak u středních titrů došlo k poklesu ze 7,3 % na 3,8 % a u vysokých titrů z 3,8 % na 1,4 %. Lze jen usuzovat, čím je tento pokles způsoben. Důvodů může být více. Věk vyšetřených se podle našich údajů neměnil. Může to být odlišný způsob života, odklon člověka od přírody, odlišné stravovací návyky a nebo i včasější sérologická diagnostika díky včasnějšímu klinickému podezření. Pak samozřejmě nemáme možnost záchytů vysokých titrů. Při detekci časných imunoglobulinů (IgM, IgA) nejsou titry ještě na vysokých hladinách. Otázkou může být i terapeutický zásah lékaře. Tyto situace ale nejsou zpracovány, protože laboratoř o nich většinou informace nemá.

Všechny studie prováděné v minulosti mají jedno společné – zjištění, že k promořování lidské populace dochází postupně a procento pozitivních s věkem narůstá. Vzrůstá pravděpodobnost kontaktu s infekčním agens a dochází k postupné kumulaci infekčních podnětů. Laboratorní metodou ve všech těchto studiích byl intradermální test. Získaná přecitlivělost na toxoplazmin perzistuje po celý život, zatímco protilátky v detekovatelném množství mají časově omezenou existenci (1).

V současnosti jsou používány k zjištění prevalence protilátek pouze dvě metody: KFR a detekce imunoglobulinů IgG. Velmi často se hovoří o skutečnosti, že u titrů 1:8

v KFR se někdy jedná o negativní séra. Ovšem jak vysoké je to procento, nikde uvedeno není.

Vliv používání rozdílných metod a tudíž možnou různou distribuci titrů v hraničních mezích (nízké x střední, střední x vysoké) můžeme v našem souboru vyloučit. Ve sledovaném období nebyla používaná metodika změněna.

6. Onemocnění hlášená do informačních systémů hygienické služby

Kritéria pro povinnost hlášení jsou popsána výše. Na jejich základě bylo nahlášeno celkem 286 osob - 49 mužů, 177 žen a 60 dětí (35 chlapců a 25 dívek). Přesto, že jsou používány stále stejné metody na základě stejných kritérií, trend ubývání středních a vysokých titrů se odráží i v tomto souboru. V prvním období bylo hlášeno 35 mužů, 119 žen a 50 dětí (30 chlapců a 20 dívek). Ve druhém období to bylo pouze 14 mužů, 58 žen a 10 dětí (5 chlapců a 5 dívek). To je méně než polovina. U 266 byly detekovány imunoglobuliny IgM, u 126 ještě imunoglobuliny IgA. Titry v KFR se pohybovaly od 1:32 do 4 096. Nejvíce hlášených vykazovalo hodnoty v rozmezí 1:64 do 1:256.

7. Možnost nákazy ve vztahu k bydlišti

Bydliště pacienta bylo dříve bráno jako jeden z rozhodujících faktorů možnosti nákazy člověka. Počet pozitivních osob byl výrazně vyšší ve prospěch venkovského obyvatelstva, pravděpodobně díky odlišnému způsobu života, rozdílné expozici a dalším důvodům. Tím nejdůležitějším není ani chov hospodářských zvířat, jako možnost častějšího kontaktu s půdou a materiály kontaminovanými oocystami.

Později se patrně tyto rozdíly stále více smazávaly. Ještě v 60. letech minulého století uvádí Beneda (115) jen o 3 % vyšší frekvenci protilátek u venkovských žen s patologickým těhotenstvím ve srovnání se stejnou populací žen městskou. Zdravé městské ženy mají pozitivitu o 9 % nižší než zdravé ženy z venkova.

V našem souboru hlášených onemocnění jsou výsledky téměř totožné: 148 lidí s bydlištěm v Plzni oproti 138 na venkově. U mužů jde o vyšší počet právě u městské populace (33, respektive 16 onemocnění). Přepočteme-li ale počet hlášených případů na 100 000 obyvatel, dostaneme 176 ve městě a 39 ve venkovské oblasti na 100 000 obyvatel a rok . Došlo tedy k výrazné změně. Otázkou také je, zda při dnešní migraci obyvatel je kritérium bydliště stále zásadní.

I z jiných epidemiologických studií v ČR je zřejmé, že najít v současnosti opravdovou kontrolní skupinu venkovské populace k městské je prakticky nemožné.

Na základě studií prováděných ve světě i v ČR se ukazuje, že vliv bydliště se v některých oblastech projevit může, v jiných toto hledisko roli nehraje (1).

Podle údajů z hlášení se Plzeňský kraj nachází dlouhodobě na 5.-8. místě v ČR. Nejvyšší nemocnost vykazují dlouhodobě moravské kraje (Moravskoslezský, Zlínský, Olomoucký). Do jaké míry jsou tyto údaje ovlivněny odlišným způsobem života nelze objektivně zhodnotit.

8. Zdroj nákazy

V minulosti byly zdůrazňovány dvě hlavní možnosti nákazy člověka: nákaza oocystou při kontaktu s kočkou nebo kontaminovanou zeminou a nákaza tkáňovými cystami požitím nedostatečně tepelně zpracovaného masa nebo orgánů mezihostitele.

Ze souboru 286 lidí uvádí 125 jako pravděpodobný zdroj nákazy kontakt s kočkou, ale u všech se zároveň objevuje práce na zahrádce, kontakt s hlínou. Pouze 41 lidí toto popírá a s největší pravděpodobností uvádí konzumaci nedostatečně tepelně upraveného masa. Bohužel u velkého počtu osob (120) není uvedena ani jedna z možností.

U dětí údaje o kontaktu se zvířetem nebo hlínou převažují jasně nad údaji o rizikové stravě. Tomuto anamnestickému údaji odpovídá i nárůst séropozitivity ve věkové skupině 5-9 let. Převažuje i u ženské populace, u které se dříve uváděla vysoká pravděpodobnost nákazy ochutnáváním polotovarů při přípravě jídla.

Konzumaci nedostatečně tepelně upraveného masa uvádí v našem souboru 19,2 % žen.

Srovnáme-li výsledky s prací Benedy v 60. letech minulého století, tento zvyk potvrzovalo 70 % dotazovaných žen. U žen ochutnávajících maso byly protilátky detekovány u 36,4 %, u žen bez tohoto zvyku u 34,8 %. Žádná závislost nebyla tehdy objektivně prokázána.

Hovoříme-li o možnosti nákazy nedostatečně tepelně upraveným masem, zajímavý je pohled na přítomnost protilátek proti toxoplazmóze u zvířat, která slouží člověku jako potrava. Několik studií bylo zpracováno v minulosti i v bývalé ČSSR.

U skotu byly získány výsledky velice rozdílné od výsledků zcela negativních (vyšetřeno okolo 4 000 kusů skotu) až po 40% pozitivitu (38).

U prasat byla zjištěna pozitivita u 40,1 % kusů. Nižší pozitivita byla odhalena u jateční drůbeže. Je třeba ale podotknout, že výsledky jsou většinou velmi variabilní a podobně jako u promořenosti lidské populace vázané na určité oblasti. I u volně žijící lovné zvěře jsou nálezy protilátek velice četné. I když asi poměr zvěřiny k produktům z jatečních zvířat na našich stolech je stále menší než v minulosti.

Nezodpověditelnou otázkou také je, kolik procent lidí se touto cestou infikuje, aniž si to uvědomí, a to pak samozřejmě v hlášení není uvedeno.

Nákaza produkty jatečních zvířat (mléko, vejce) je velmi málo pravděpodobná.

Tato možnost nákazy je aktuální pro masožravce a všežravce.

Vysoké procento promořenosti u býložravců ale dokazuje, že opravdu kontaminace prostředí a potravy hraje v epidemiologii toxoplazmózy nemalou úlohu.

To se týká i člověka. Je to další možnost orální nákazy bez zprostředkování potravou. Zanesením infekčního agens znečištěnou rukou do úst přichází v úvahu hlavně u malých dětí, zemědělců, lidí pracujících v zahradnictví a na zahrádkách a u lidí bez základních hygienických návyků. Také tento možný zdroj nákazy si člověk těžko uvědomuje a nemá-li jinou domněnku o možnosti nákazy, objeví se ve skupině s neuvedeným zdrojem.

Další možností je kontakt se zvířetem. Vždy se v první řadě uvažovalo o kočce, jako nejzávažnějším „kontaktním“ zvířeti. Ale jak studie Benedy (115), tak i Jíry (1) prokazují větší vliv kontaktů se zvířaty jinými. Největší roli hraje pes, na druhém místě jsou v domácnosti chovaná jateční zvířata a až na třetím místě kočka. Pak následuje drůbež a poslední jsou králíci.

Velkou roli může hrát určitě i profesionální zaměření osob. Zatímco Jíra potvrzuje jasnou závislost profesionálního rizika např. zaměstnanců jatek, veterinářů, chovatelů, prodejců masa atd. - u všech těchto skupin byla pozitivita zřetelně vyšší, Beneda došel k závěru opačnému. U žen s patologickým těhotenstvím i u žen zdravých nedosahovala pozitivita u exponovaných povolání (kuchařky, prodavačky masa, pracovnice v živočišné výrobě nebo masném průmyslu atd.) hodnot jako u povolání ostatních (115). Bohužel v naší skupině se žádná výrazná profesní skupina nevyčlenila.

Domníváme se, že bez cílené prospektivní studie s jasně definovanými rizikovými faktory nelze údaje získané při rutinní činnosti verifikovat. Svoji negativní roli zde hraje i v současnosti daleko menší zájem o tuto závažnou infekci.

9. Formy onemocnění

Distribuce jednotlivých klinických forem onemocnění doplňuje údaje o celkové nemocnosti, má ale spíše význam klinický než epidemiologický.

S postupným poklesem nemocnosti dochází také pravděpodobně k určitým změnám v zastoupení jednotlivých forem. I naše lokální, časově omezené zkušenosti, naznačují výrazný úbytek závažnějších klinických forem onemocnění.

Přes velmi rozmanité možnosti, které se nám nabízejí, byly vybrány pouze nejčastěji se vyskytující: uzlinová, latentní, gynekologická, oční a jiná. Formy „jiné“ nebyly blíže specifikovány, ale v nabídce EPIDATu se v celorepublikových hlášeních objevují jako „jiné“ např. akutní chřipková, chřipkovitá, potíže GIT, vyrážka, únava atd. Vesměs jde o velmi diskutabilní zařazení, které spíše připomíná klinické hodnocení „za každou cenu“.

V našem souboru se tyto „jiné“ objevují pouze ve 13 případech.

Jasnou převahu má forma uzlinová (194), kdy samozřejmě zduření mízních uzlin je jeden z nejtypičtějších příznaků toxoplazmózy. Typickou, dobře zařaditelnou, je i forma oční, která byla vykázána 3x.

V tomto souboru se dále objevily formy latentní (63x) a gynekologická (13x). Tyto dvě se nejčastěji vykazují při prenatalním skríninku a i v našem souboru se objevují pouze u žen. Latentní je naprosto správně, protože se jedná o ženy bez klinických příznaků. Hlášení formy gynekologická je velký omyl a reliktnost. Buď pacient příznaky má a má být zařazen podle převažujících symptomů a nebo je nemá a pak patří k formám latentním. Také patrně z rozpaků při zařazení k formám v těhotenství se nejvíce „jiných“ forem objevuje u gravidních žen.

U mužů a dětí je řazení jednoznačné a jasně převládá forma uzlinová (47 u mužů a 56 u dětí).

10. Sezónnost záchyťů

Rozdělíme-li si roční období na letní (duben – září) a zimní (říjen – březen), více případů bylo diagnostikováno v zimním období (168) než v letním (118 případů). U všech sledovaných skupin vidíme vysoké počty hlášených onemocnění v lednu a únoru (u mužů pouze v lednu). U žen a dětí sledujeme vzestup také v srpnu a září.

Uvědomíme-li si, že se jedná o nepřímou diagnostiku a detekce protilátek má určité zpoždění po ataku organismu, můžeme usuzovat, že k infekci dochází zpravidla

předešlý měsíc. Lednový vzestup by pak do určité míry mohl souviset se zvýšenou konzumací různých pochutin v období Vánoc.

Vzestup počtu případů v září (u mužů v listopadu) může být důsledkem častějšího pobytu lidí v přírodě v letních a podzimních měsících. V tomto období se možná projevuje i zvýšené pracovní úsilí na zahrádkách před zimou.

11. Počet vyšetřovaných v jednotlivých věkových skupinách

Všímáme-li si počtů vyšetřovaných v jednotlivých věkových skupinách, vidíme u obou pohlaví převahu požadavků v prvních letech života (kategorie 0-4). Patrně se jedná o děti narozené ženám s pozitivitou protilátek proti toxoplazmóze v těhotenství nebo narozené s nějakým defektem. V dalších věkových kategoriích se u mužů počet vyrovnává a klesá až u nejstarší skupiny 60 a více letých. Pozitivita je u nejmladší věkové kategorie nejvyšší, poté se zvyšuje a je prakticky stálá.

U žen jsou výsledky obdobné. Vysoký počet vyšetřených v prvních čtyřech letech života, který v další věkové kategorii klesá. Markantní vzestup požadavků na vyšetření přichází s fertlním věkem v kategorii 15-19 let. Tyto počty se zvyšují až do kategorie 40-49 let. Pak se opět ustálí.

Do roku 1999 byl maximální počet vyšetření ve věkové skupině 20-24 let. Po tomto roce dochází k posunu do kategorie 25-30 let. Patrně to souvisí s celospolečenským jevem - zakládání rodiny až v pozdějším věku než jsme byli svědky v minulosti.

Srovnáme-li počty vyšetření s počtem onemocnění v Západočeském kraji ve sledovaném období, dochází u obou pohlaví k vzestupu počtu případů ve věku 5-9 let. U mužů od 25 let onemocnění ubývá. Vrcholu dosahuje toto číslo u 15-19 letých.

U žen se počet případů kontinuálně zvyšuje, vrcholu dosahuje u 25-29 letých a postupně klesá.

15 Závěry

1. Při zjišťování prevalence protilátek v populaci lze využít KFR nebo detekci imunoglobulinů IgG. K laboratornímu stanovení diagnózy je i v rutinních laboratořích nutno spektrum rozšířit o detekci specifických imunoglobulinů IgM a IgA. Diagnostické sety musí projít schvalovacím řízením a doporučením NRL.
2. Interpretaci sérologického nálezu musí provádět odborník v této problematice.
3. Toxoplazmová infekce je nejrozšířenějším protozoárním onemocněním v České republice. Výskyt protilátek v populaci je vyšší u žen.
4. Od roku 2000 dochází k postupnému snižování počtu případů onemocnění i snižování vysokých titrů protilátek
5. Musí být věnována větší pozornost při pojmenovávání jednotlivých forem onemocnění.
6. Nebyl prokázán významný rozdíl v přítomnosti protilátek u městské a venkovské populace
7. Onemocnění vykazuje určitou sezónnost s vyšším výskytem v prvních měsících roku. U žen dochází k druhému sezónnímu vrcholu také v podzimních měsících.
8. Nebyla potvrzena teorie, že v současnosti dochází častěji k nákaze z nedostatečně tepelně upraveného masa. Kontakt se zvířetem a hlinou převažuje. Bohužel velké množství pacientů neuvádí žádný z uvedených zdrojů.
9. Pro odhalení hlavních zdrojů infekce pro člověka a z toho plynoucí Preventivní opatření jsou nutné cílené studie. Otázkou je, jsou-li v současném zdravotnictví realizovatelné.
10. Vzhledem k velkému počtu latentních forem onemocnění je nutno věnovat více pozornosti toxoplazmóze v těhotenství a předcházet tak poškození plodu.

Literatura

1. Jíra, J., Rosický, B. Imunodiagnostika a epidemiologie toxoplasmózy. Praha: Academia, 1983. 262 s.
2. Janků, J. Patogeneza a patologická anatomie tak nazvaného vrozeného kolobomu žluté skvrny v oku normálně velikém, mikrophtalmickém s nálezem parazitů v sítnici. Čas. Lék. Čes., 1923, 16, 479.
3. Hutchison, W. M., Work, K. Observations on the fecal transmission of *Toxoplasma gondii*. Acta. path.microbiol.scand., 1969, 77, 2, 275-282.
4. Hutchinson, W. M., Dunachie, J. F., Siim, J. et. al. Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. Brit. med. J., 1970, 272,1, 142-144.
5. Frenkel, J. K., Dubey, J. P., Miller, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. Science, 1970, 167, 893-896.
6. Naot, Y., Remington, J. S. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: Use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. J. Infect. Dis., 1980, 142, 5, 757-766.
7. Arcavi, M., Orfus, G., Griemberg, L. Diagnosis of toxoplasmosis by joint detection of imunoglobulin A and imunoglobulin G. J. Clin. Microbiol., 1997, 35, 6, 1450-1453.
8. Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G. et. al. A newly revised classification of the protozoa. J. Protozool., 1980, 27, 37.
9. Cavalier-Smith, T. Eukaryote kingdoms: seven or nine? BioSystems, 1981, 14, 461.
10. Cavalier-Smith, T. Kingdom protozoa and its 18 phyla. Microbiol. Rev., 1993, 953.
11. Cavalier-Smith, T. A revised six-kingdom system of life. Biol. Rev., 1996, 73, 203.
12. Cavalier-Smith, T. Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. J. Euk. Microbiol., 1999, 46, 347.
13. Hausmann, K., Hulsmann, N. Protozoologie. Praha: Academia, 2003, 347 s. 14. Cavalier-Smith, T. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. Int. J. Syst. Evol. Microbiology, 2002, 52, 297-354.
15. Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Speer, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin. Microbiol. Rev., 1998, 11, 267-299.
16. Ngo, H. M., Hoppe, H. C., Kliner, K. A. Differential sorting and post-secretory

- targeting of proteins in parasitic invasion. Trends Cell Biol., 2000, 10, 67-72.
17. Cornelissen, A. W., Overdulve, J. P., van der Plody, M. Determination of nuclear DNA of five eucoccidian parasites, *Isospora (Toxoplasma) gondii*, *Sarcocystis cruzi*, *Eimeria tenella*, *E.acervulina* and *Plasmodium berghei*, with special reference to gamontogenesis and meiosis in *I. (T.) gondii*. Parasitology, 1984, 88, 531 - 553.
 18. Kong, J. T., Grigg, M. E., Uyetake, L. et. al. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. J. Infect. Dis., 2003, 187, 1484-1495.
 19. Sibley, L. D., Boothroyd, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. Nature, 1992, 359, 82-85.
 20. Howe, D. K., Sibley, L. D. *Toxoplasma gondii* three clonal lineages comprises: correlation of parasite genotype with human disease. J. Infect. Dis., 1995, 172, 1561- 1566.
 21. Ajzenberg, D., Cogne, N., Paris, L., et. al. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. J. Infect. Dis., 2002, 186, 684-689.
 22. Grigg, M. E., Bonnefoy, S., Hehl, A. B. et. al. Success and virulence in *Toxoplasma gondii* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. Science, 2001, 294, 161-165.
 23. Black, M. W., Boothroyd, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2000, 64, 607-623.
 24. Hutchinson, W. M., Dunachie, J. F., Work, K. et. al. The life cycle of the coccidian parasite *Toxoplasma gondii* in the domestic cat. Trop. Med. Hyg., 1971, 65, 3, 380-399.
 25. Dubey, J. P., Frenkel, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. J. Protozool., 1972, 19, 155-157.
 26. Dubey, J. P., Frenkel, J. K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of toxoplasma cysts. J. Protozool., 1976, 23, 537-546.
 27. Freyere, A., Dubey, J. P., Smith, D. D. et. al. Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. J. Parasitol., 1979, 75, 750-755.
 28. Dubey, J. P. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. J. Parasitol., 1996, 82, 957-960.
 29. Dubey, J. P., Graham, D. H., Blackston, C. R. Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*)

- from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings. *Int. J. Parasitol.*, 2002, 32, 99-105.
30. Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Speer, C. A. Structure of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites, and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1998, 11, 267-299.
31. Smith, J. E. A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, 1995, 25, 1301-1309.
32. Radke, J. R., White, M. W. A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the Herpes simplex virus thymidine kinase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1998, 94, 237-247.
33. Dobrowolski, J. M., Sibley, L. D. Toxoplasma invasion of mammalian cell is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell.*, 1996, 84, 933-939.
34. Gazzinelli, R. T., Eltoun, I., Wynn, T. A. et al. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. *J. Immunol.*, 1993, 151, 3672-3681.
35. Gross, U., Pohl, F. Influence of antimicrobial agents on replication and stage conversion of *Toxoplasma gondii*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996, 219, 235-245.
36. Materiály CDC
37. Montoya, J. G., Liesenfeld, O. Toxoplasmosis. *The Lancet*, 2004, 363, 1965-1976.
38. Kouba, K., Jíra, J., Hübner, J. Praha: Avicenum, 1974. 306 s.
39. Gascard, E. Acquired toxoplasmosis in adults. *Mars. Med.*, 1968, 105, 5, 405-414.
40. Siim, J. C. Acquired toxoplasmosis. *Internist.*, 1971, 12, 8, 312-318.
41. Silverstein, A. M. Changing trends in the etiologic diagnosis of uveitis. *Doc. Ophthalmol. Clin.*, 1997, 35, 15-29.
42. Reese, R. E., Betts, R. F. A practical approach to infectious diseases. 3rd edition. Boston: Little, Brown and Co., 1991, 1043 s.
43. Wong, S. Y., Remington, J. S. Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS*, 1993, 7, 299-316.
44. Luft, B., Remington, J. S. AIDS commentary: toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.*, 1992, 15, 211-222.
45. Thalhammer, O. Congenital toxoplasmosis. *Lancet*, 1962, 278, 23-24. 46. Larsen, J. W. jr. Congenital toxoplasmosis. *Teratology.*, 1977, 15, 2, 213-217.
47. Iygiste, A. K. et al. Etiology and treatment of fetal toxoplasmosis. *Sov. Med.*, 1976, 11, 91-94.

48. McNicholl, B. Acquired toxoplasmosis in children. Arch. Dis. Child., 1978, 53, 5, 414-416.
49. Havlík, J. et al. Infekční nemoci. Praha: Galén, 1998, 221 s.
50. Fayer, R. Toxoplasmosis update and public health implications. Rev. Veter. Can., 1981, 22, 344-352.
51. Bowie, W. R., King, A. S., Werner, D. H., et al. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. Lancet, 1997, 350, 173-177.
52. Burnett, A. J., Shortt, S. G., Issac-Renton, J., et al. Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. Ophthalmology, 1998, 105, 1032-1037.
53. Bahia-Oliveira, L. M., Jones, J. L., Azevedo-Silva, J. et al. Highly endemic waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state. Brazil. Emerg. Infect. Dis., 2003, 9, 55-62.
54. Brooks, R. G., Remington, J. S. Transplant-related infection. In: Bennett, J. V., Brachman, P. S. Hospital infections, 2nd edition. Boston. Little, Brown and Co., 1986, 581-586.
55. Israelski, D. M., Remington, J. S. Toxoplasmosis in the non-AIDS immunocompromised host. In: Remington, J., Swartz, M. Current clinical topics in infectious diseases. London. Blackwell Scientific publications, 1993, 322-356.
56. Raisanen, S. A. The importance of trophozoites in transmission of toxoplasmosis: survival and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* trophozoites in liquid media. Med. Hypotheses, 1978, 4, 367-375.
57. Siegel, S. E., Lunde, M. N., Gelderman, A. H., et al. Transmission of toxoplasmosis by leukocyte transfusion. Blood, 1971, 37, 388-394.
58. Flamm, H., Aspöck, H. Die Toxoplasmose – Überwachung der Schwangerschaft in Österreich – Ergebnisse und Probleme. Paediatr. Grenzgeb., 1981, 20, 27-34.
59. Foulon, W., Naessens, A., Volkaert, M. L. Congenital Toxoplasmosis: a prospective study in Brussels. Br. J. Obstet. Gynaecol., 1984, 91, 419-423
60. Ruoss, C., F., Bourne, G., L. Toxoplasmosis in Pregnancy. Br. J. Obstet. Gynaecol., 1972, 79, 1115-1118.
61. Broadbent, E., J., Ross, R., Hurley, R. Screening for Toxoplasmosis in pregnancy. J. Clin. Pathol., 1981, 34, 659-664.
62. Williams, K., A., B., Scott, J., M., MacFarlane, D., E. et al. Congenital Toxoplasmosis a prospective study in the West of Scotland. J. Infect., 1981, 3, 219-229.

63. Desmonts, G., Couvreur, J. Toxoplasmosis in Pregnancy and its transmission to the fetus. Bull.N.Y. Acad. Med., 1974, 50, 146-159.
64. Jones, J. L., Lopez, A., Wilson, M. et. al. Congenital toxoplasmosis:a review. Obstet. Gyneacol. Surv., 2001, 56, 296-305.
65. Jírovec,O. Parazitologie pro lékaře.Praha.Avicenum, 1977, 798 s.
66. Dubey, J. P. Feline toxoplasmosis and coccidiosis: a survey of domiciled and stray cats. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1973, 162, 873-877.
67. DeFeo, M. L., Dubey, J. P., Mather, T. et.al. Epidemiologic investigation of seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cats and rodents. Am. J. Vet. Res., 2002, 63, 1714-1717.
68. Claus, G. E., Christie, E., Dubey, J. P. Prevalence of *Toxoplasma* antibody in feline sera. J. Parasitol., 1977, 63, 266.
69. Janitschke, K.,Kühn, D. Toxoplasma-oozysten in Kot natürlich infizierter Katzen. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr., 1972, 85, 46-47.
70. Varga, I. Adatok a *Toxoplasma gondii* oocistáinak budapesti macskák bélsarában és cisztáinak vágóhídy sertésekben észlelt gyakoriságához.Magyar Allatorvosok Lapja., 1982, 37, 733-736.
71. Pampiglione,S., Poglayen, G., Arnone,B., et.al. *Toxoplasma gondii* oocysts in the faeces of naturally infected cat. Br. Med. J., 1973, 2, 306.
72. Rifaat, M. A., Arafa, M. S., Sadek, M. S. M., et.al. Toxoplasma infection of stray cats in Egypt. J. Trop. Med. Hyg., 1976, 79, 67-70.
73. Zástěra, M., Pokorný, J., Frühbauer, Z. et. al. Antigenní analyza *Toxoplasma gondii*. Závěrečná zpráva IHE. Praha, 1980, 35 s.
74. Svobodová, V., Svoboda, M. Výskyt oocyst *Toxoplasma gondii* v trusu koček. Vet. Med., 1986, 10, 621-627.
75. Beneš,Č.Hlášení infekčních onemocnění v České republice.EPIDAT.
76. Matyáš, Z. Aplikace systému HACCP do prevence alimentární i nealimentární nákazy prvokem *Toxoplasma gondii*.Hygiena, 1995, 40, 110-121.
77. Dubey, J. P., Kotula, A. W., Sharah, A. et. al. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. J. Parasitol., 1990, 76, 201-204.
78. Kotula, A. W., Dubey, J. P., Sharah, A. K. et.al. Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. J. Food Protect., 1991, 54, 687-690.

79. Sherma, S. P., Dubey, J. P. Quantitative Survival of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites and Bradyzoites in Pepsin and Trypsin Solutions. *Am. J. Vet. Res.*, 1981, 42, 128-130.
80. Smith, J. L. Documented Outbreaks of Toxoplasmosis: Transmissions of *Toxoplasma gondii* to Humans. *J. Food Protection*, 1993, 7, 630-639.
81. Krahenbuhl, J. L., Remington, J. S. The immunology of toxoplasma and toxoplasmosis. In Cohen, S., Warren, K. S. *Immunology of Parasitic Infections*. Second edition. London. Blackwell Scientific Publications, 1982. 848 s. ISBN 0-632-00852-0.
82. Cutchins, E. C., Warren, J. Immunity patterns in the guinea pig following toxoplasma infection and vaccination with killed *Toxoplasma*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1956, 5, 197.
83. Krahenbuhl, J. L., Ruskin, J., Remington, J. S. The use of killed vaccines in immunization against an intracellular parasite: *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*, 1972, 108, 425.
84. Araujo, F. G., Remington, J. S. Protection against *Toxoplasma gondii* in mice immunized with toxoplasma cell fraction, RNA and synthetic polyribonucleotides. *Immunology*, 1974, 27, 711.
85. Kierszenbaum, F. *Parasitic Infections and the Immune System*. London: Academic Press, 1994. 254 s. ISBN 0-12-406575-9.
86. Eisenhauer, P., Mack, D. G., McLeod, R. Prevention of peroral and congenital acquisition of *Toxoplasma gondii* by antibody and activated macrophages. *Infect. Immun.*, 1988, 56, 83-87.
87. Sayles, P. C., Gibbon, G. W., Johnson, L. L. B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.*, 2000, 68, 1026-1033.
88. Sher, A., Oswald, I. P., Hieny, S., et al. *Toxoplasma gondii* induced a T-independent INF-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alfa. *J. Immunol.*, 1993, 150, 3982-3989.
89. Gazzinelli, R. T., Hieny, S., Winn, T. A. et al. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell deficient hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 6115-6119.

90. Denkers, E. Y., Sher, A., Gazzinelli, R. T. T cell interactions with *Toxoplasma gondii*: implications for processing of antigen for class I-restricted recognition. Res. Immunol., 1993, 14, 51-57.
91. Gazzinelli, R. T., Hakim, F. T., Hieny, S. et. al. Synergistic role of CD4+ and CD8+ lymphocytes in INF-gama production and protective imunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. J. Immunol., 1991, 146, 286-292.
92. Gazzinelli, R. T., Amichay, D., Scharon-Kersten,T. et. al. Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell mediated imunity to *Toxoplasma gondii*. Curr. Top .Microbiol. Immunol., 1996, 219, 127-140.
93. Konishi, E. Naturally occurring antibodies that react with protozoan parasites. Immunol. Today, 1993, 9, 361.
94. Charde, T. I., Bourguin, M. N., Mevelec, J. F. et.al. Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestina secretions and milk from orally infected mice and characterization of target antigens. Infect. Immun., 1990, 58, 1240-1246.
95. Mineo, J. R., McLeod, R., Mack, D. et. al. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. J. Immunol., 1993, 150, 3951-3964.
96. Montoya, J. G., Lowe, K. E., Clayberger, C. et.al. Human CD4+ and CD8+ T lymphocytes are both cytotoxic to *Toxoplasma gondii*-infected cells. Infect. Immun., 1996, 64, 176-181.
97. Prigione, I., Facchetti, P., Ghiotto, F. et.al. *Toxoplasma gondii* – specific CD4+ T cells from healthy, infected humans display a Th0 profile of cytokine secretion. Eur. J. Immunol., 1995, 25, 1298-1305.
98. Turner, M. B., Berens, R. L., Nash, P. B. et.al. CD4-mediated and CD8-mediated cytotoxic and proliferative immune response to *Toxoplasma gondii* in seropositive humans. Infect. Immun., 1996, 64, 4330-4338.
99. Gratzl,R., Hayde, M., Kohlhauser,C. et.al. Follow-up of Infants with Congenital Toxoplasmosis Detected by Polymerase Chain Reaction Analysis of Amniotic Fluid. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1998, 17, 853-858.
100. Guy, C. E., Pelloux, H., Lappalainen, M. et.al. Interlaboratory Comparison of Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Toxoplasma gondii* DNA Addet to Samples of Amniotic Fluid. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1996, 15, 836-839.

101. Pujol-Riqué, M., Derouin, F., García-Quintanilla, A. et.al. Design of a one-tube hemi-nested PCR for detection of *Toxoplasma gondii* and comparison of three DNA purification methods. J. Med. Microbiol., 1999, 48, 857-862.
102. Sabin, A. B., Feldman, H. A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (toxoplasma). Science, 1948, 108, 660-663.
103. Naot, Y., Remington, J. S. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: Use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. J. Infect. Dis., 1980, 142, 5, 757-766.
104. Valkoun, A., Štefánik, M., Nádvorník, V. et.al. Diagnostika získané toxoplasmózy pomocí simultánního stanovení specifických imunoglobulinů třídy M,A a E. Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 1995, 44, 107-110.
105. Lappalainen, M., Koskela, P., Koskiniemi, M., et.al. Toxoplasmosis acquired during pregnancy: Improved serodiagnosis based on avidity of IgG. J. Infect. Dis., 1993, 167, 691-697.
106. Kodým,P.,Tolarová,V. Triplet IgG-avidity test for diagnosis of toxoplasmosis. Abstract VIII. European Multicolloquium of parazitology. Acta Parasitologica, 2000, 45, 3, 136.
107. Chumpitazi, F. F., Boussaid, A., Pelloux, H. et.al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by immunoblotting and relationship with other methods. J. Clin. Microbiol., 1995, 33, 6, 1479-1485.
108. Voller, A., Bartlett, A., Bidwell, D. E. Enzyme Immunoassays for Parasitic Diseases. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1976, 70, 98-106.
109. Voller, A., Bidwell, D. E., Bartlett, A. et.al. Microplate Enzyme Immunoassay for Toxoplasma Antibody. J. Clin. Path. 1976, 29, 150-153.
110. Kodým,P.,Tolarová,V. Návrh standardních diagnostických metodik: schéma postupů vyšetřování na toxoplasmózu. Zprávy CEM, 1997, 6, 9, 27-28.
111. Kodým, P., Tolarová, V. Vyšetřování na toxoplasmózu a interpretace výsledků:komentář k návrhu standardních metodik.Zprávy CEM, 1997, 6, 10, 26-29.
112. Zástěra, M., Pokorný, J., Jíra, J., et.al. Standardní metodiky laboratorní diagnostiky toxoplasmózy. Act. Hyg. Microbiol., 1979, 25, 4577-5815.
113. Pokorný, J., Fruhbauer, Z., Tomášková, V., et.al. Stanovení antitoxoplazmických protilátek IgM metodou ELISA. Čs. Epidem., 1990, 39, 57-62.
114. Zástěra, M., Pokorný, J., Švandová, E. Imunologický přehled toxoplasmózy ČSR –

1985. Act. Hyg. Microbiol. 1987, 7, 80-92.

115. Beneda, S. Sérologické reakce na toxoplasmózu u žen s patologickým těhotenstvím. 1973. 70 s. Rigorózní práce na Přírodovědecké fakultě UK v Praze. Vedoucí rigorózní práce prof.RNDr.Jaroslav Kramář,DrSc.