

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Jiří Navrátil

**Pohlavní přenos *Toxoplasma gondii* ze samců na samice: experimentální ověření
na laboratorních zvířatech**

Sexual transmission of *Toxoplasma gondii* from males to females: experimental
verification using laboratory animal model

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Petr Kodym, CSc.

Školitel specialista: doc. RNDr. Daniel Frynta, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14.8.2017

.....

Jiří Navrátil

Poděkování:

Za cennou pomoc a vstřícný přístup při psaní této práce chci poděkovat svému školiteli RNDr. Petru Kodymovi, CSc., konzultantovi práce doc. RNDr. Danielu Fryntovi, Ph.D., Mgr. Dagmar Berenové, paní Blance Širocké a RNDr. Marku Malému, CSc. Mé díky patří i mým nejbližším, kteří mne podporovali při studiu, a dalším kolegům a kolegyním z Oddělení zoonóz s přírodní ohniskovostí Státního zdravotního ústavu, mezi nimiž jsem našel příjemné a podnětné pracovní prostředí.

Abstrakt

Toxoplasma gondii je kosmopolitně rozšířeným parazitem, jehož prevalence mezi lidmi celosvětově dosahuje až několika desítek procent. Ve svém životním cyklu může využívat jakéhokoliv teplokrevného obratlovce jako mezihostitele, definitivním hostitelem, kde se parazit množí sexuálně, jsou pak kočkovité šelmy čeledi *Felidae*. Akutní fáze onemocnění je medicínsky významná u imunokompromitovaných pacientů a také rizikem kongenitálního přenosu u těhotných žen, které se dosud s infekcí nesetkaly. V obou případech může mít infekce závažné, vzácně i smrtelné následky.

Tato práce je zaměřena na experimentální ověření teorie pohlavního přenosu toxoplasmózy ze samců na samice na laboratorních myších. Možný přenos byl testován ve fázi akutní i latentní infekce, v obou případech s negativním výsledkem.

Kromě toho jsme u myších samců sledovali i afinitu parazita k tkáním určitých orgánů pomocí techniky PCR. Zejména nás zajímaly orgány pohlavní soustavy a jejich srovnání s orgány ostatních soustav. Bylo zjištěno, že v akutní fázi infekce jsou primárně zasaženy plíce a slezina. Toxoplasmy se vyskytovaly i v pohlavních orgánech (zejména v nadvarleti), ale oproti jiným soustavám nijak častěji. Naopak v akutní i latentní fázi byly statisticky signifikantně zasaženy více nepohlavní orgány než pohlavní.

Naše výsledky nepotvrdily hypotézu o sexuálním přenosu toxoplasmózy ze samců na samice. I když na jejich základě nelze jednoznačně prokázat, že tento způsob přenosu infekce je zcela vyloučený, nemůžeme potvrdit, že by byl natolik častý, aby mohl hrát roli v epidemiologii a epizootologii toxoplasmózy.

Klíčová slova

Toxoplasma gondii, pohlavní přenos, myš, pohlavní orgány, orgánová afinita, real-time PCR

Abstract

Toxoplasma gondii is cosmopolitly living parasite which prevalence in human extends to tens of percent. In its life cycle it uses any homiothermic vertebrate as an intermediate host. The definitive host are felines from *Felidae* family. The acute phase of infection is medically important in immunocompromised patients and by its risk of congenital toxoplasmosis in pregnant women who never suffered from this illness before. Infection could have serious and rarely even lethal consequences in both cases.

This thesis focuses on experimental verification of theory of sexual transmission of toxoplasmosis from male to female on laboratory mice. Possible transmission was tested in acute phase and latent phase of infection. The result was negative in both cases.

Moreover, we observed the parasite's affinity to tissue of organs in male mice by PCR technique. Particularly, our interest was in comparing genital organs with others. It was discovered that lungs and spleen are the most infected organs in acute phase of infection. *Toxoplasma* was also present in genital organs (especially in *epididymis*) but not more frequently than in others. We observed statistically significant difference between sexual and non-sexual organs in acute and latent toxoplasmosis – non-sexual organs were more infected in both phases.

Our results did not confirm hypothesis of sexual transmission of toxoplasmosis from males to females. Although it can not be proven on the base of our results that sexual transmission is entirely impossible, we can not confirm that it is so frequent to be important in epidemiology and epizootiology of toxoplasmosis.

Key words

Toxoplasma gondii, sexual transmission, mouse, genital organs, organ affinity, real-time PCR

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární přehled	3
2.1. <i>Toxoplasma gondii</i> , její životní cyklus a životní formy.....	3
2.2. <i>Toxoplasmóza člověka a její projevy</i>	5
2.2.1. Akutní toxoplasmóza.....	5
2.2.2. Latentní toxoplasmóza.....	6
2.2.3. Kongenitální toxoplasmóza.....	8
2.2.4. Oční toxoplasmóza.....	10
2.3. <i>Diagnostika a terapie toxoplasmózy</i>	11
2.3.1. Diagnostika toxoplasmózy.....	11
2.3.2. Terapie toxoplasmózy.....	12
2.4. <i>Hypotéza sexuální přenosu Toxoplasma gondii</i>	14
2.4.1. Důkazy přímé.....	14
2.4.2. Důkazy nepřímé.....	15
2.5. <i>Manipulační hypotéza</i>	17
2.6. <i>Lokalizace v hostiteli – afinita k tkáním</i>	18
3. Metodika	20
3.1. <i>Modelový organismus</i>	20
3.1.1. Hostitel.....	20
3.1.2. Parazit.....	20
3.2. <i>Schéma pokusů</i>	21
3.2.1. Pokus V - virulentní kmen <i>Toxoplasma gondii</i>	21
3.2.2. Pokus C – cystický avirulentní kmen <i>Toxoplasma gondii</i>	22

3.3. Experimentální infekce.....	23
3.3.1. Pokusné skupiny myši.....	23
3.3.2. Příprava infekční dávky.....	23
3.3.3. Infekční dávka a její podání.....	24
3.3.4. Připouštění myši.....	25
3.4. Zpracování materiálu.....	26
3.4.1. Odběr krve myším.....	26
3.4.2. Komplement fixační reakce.....	26
3.4.3. Usmrcení a pitva.....	28
3.4.4. Izolace DNA.....	28
3.4.5. Real-time PCR.....	28
3.4.6. Přečištění a koncentrace DNA.....	30
3.4.7. Sekvence DNA.....	30
3.5. Statistické vyhodnocení výsledků.....	30
4. Výsledky.....	31
4.1. Real-time PCR.....	31
4.2. Monitorování klinického stavu myši.....	32
4.3. Pokus V – pohlavní přenos od samců v akutní fázi toxoplasmózy.....	34
4.4. Pokus V – lokalizace v hostiteli, afinita k tkáním při akutní toxoplasmóze.....	34
4.4.1. Procentuální zastoupení pozitivních orgánů při akutní toxoplasmóze.....	34
4.4.2. Porovnání množství DNA <i>T. gondii</i> v hostitelských orgánech při akutní toxoplasmóze..	35
4.5. Pokus C – pohlavní přenos od samců v latentní fázi toxoplasmózy.....	40
4.6. Pokus C – lokalizace v hostiteli, afinita k tkáním při latentní toxoplasmóze.....	40
4.6.1. Procentuální zastoupení pozitivních orgánů při latentní toxoplasmóze.....	40
4.6.2. Porovnání množství DNA <i>T. gondii</i> v hostitelských orgánech při latentní toxoplasmóze.	41

5. Diskuse	44
6. Závěr	53
7. Seznam použité literatury	54

1. Úvod

Toxoplasma gondii patří mezi kosmopolitně rozšířené parazity a celosvětová prevalence mezi lidmi dosahuje až několika desítek procent. Lidská infekce probíhá ve většině případů asymptomaticky, v určitých případech ale může mít toxoplasmóza pro napadený organismus až fatální důsledky. Platí to zejména pro kongenitální toxoplasmózu a infekci imunokompromitovaných pacientů, kde může dojít až k abortu, resp. smrti.

Parazit navíc v těle člověka dokáže přetrvávat po dlouhá desetiletí ve stádiu tkáňových cyst, na něž není dostupná žádná terapie. Tato latentní fáze, která byla dlouhou dobu považována za neškodnou, je v posledních letech podrobována stále většímu zájmu ze strany výzkumných týmů, a ukazuje se, že i zdánlivě neškodní bradyzoiti v tkáňových cystách dokážou ovlivňovat svého hostitele. Práce z nového tisíciletí tak hovoří o možnosti zpomalení reakčního času hostitele, což u lidí může vést k vyšší pravděpodobnosti dopravní nehody, o změně jeho osobnosti nebo o souvislosti s rozvojem a průběhem onemocnění schizofrenií.

S rostoucím poznáním o možných závažných důsledcích infekce logicky roste i snaha zjistit více o parazitu samotném. V posledních letech často diskutovaným tématem je otázka sexuálního přenosu toxoplasmy z nakaženého samce na samici. První zmínky o této možnosti sice pochází už z 20. století, až v posledních letech je ale tato hypotéza více zkoumána a častěji testována. Bylo vydáno několik prací, které potvrdily nalezení tachyzoitů ve spermatu i jejich přenos na samice pomocí umělého oplodnění. Stejně tak ale existují i práce, ve kterých se sexuální přenos toxoplasmy nepotvrdil.

Tato práce si klade za úkol otestovat možný pohlavní přenos ze samců na samice na myších, a to na dvou kmenech *T. gondii*. Zajímalo nás, jestli by se infekce mohla přenést při akutní fázi onemocnění způsobené virulentním kmenem nebo v latentní fázi toxoplasmózy způsobené avirulentním cystickým kmenem.

Kromě toho se práce zabývá i lokalizací toxoplasmy v těle hostitele. Pokud by hypotéza o pohlavním přenosu byla pravdivá, pak se dá očekávat zvýšený výskyt a koncentrace parazita v samčích pohlavních orgánech. Parazit by byl evolučně uzpůsoben k tomuto přenosu a počítal by s ním. Studií na téma afinity toxoplasmy ke tkáni samčích pohlavních orgánů zatím

není mnoho, a tak by výsledky této práce mohly napovědět, nakolik je pohlavní přenos možný i z tohoto pohledu.

Závěrečným cílem práce pak bylo na základě získaných výsledků a informací z literatury diskutovat pravděpodobnost pohlavního přenosu *Toxoplasma gondii* u laboratorní myši i u člověka.

Cíle práce:

- 1) **Otestovat na myších možnost pohlavního přenosu *Toxoplasma gondii* ze samců na samice v akutní i v latentní fázi onemocnění**
- 2) **Otestovat u myši afinitu *Toxoplasma gondii* k samčím pohlavním orgánům v porovnání s jinými orgány těla v akutní i latentní fázi onemocnění pomocí semikvantitativní real-time PCR vyvinuté a optimalizované k tomuto účelu**
- 3) **Na základě získaných dat a dostupné literatury diskutovat možnost pohlavního přenosu *Toxoplasma gondii* u laboratorních myší i u člověka**

2. Literární přehled

2.1. *Toxoplasma gondii*, její životní cyklus a životní formy

Toxoplasma gondii patřící do kmene *Apicomplexa*, třídy *Coccidea*, řádu *Eimeriida* a čeledi *Sarcocystidae* (Arisue et Hashimoto, 2014) je jedním z nejrozšířenějších parazitů světa. Séroprevalence ve světě se pohybuje od 10 do 90 % (Pappas et al., 2009), přičemž na tato čísla odkazuje i Světová zdravotnická organizace (Torgerson et Mastroiacovo, 2013). Celková průměrná promořenost obyvatelstva toxoplasmózou ve světě se pak odhaduje na jednu třetinu. U nás se prevalence toxoplasmózy pohybuje okolo 25 % u mužů a 30 % u žen (Kodym et al., 2001).

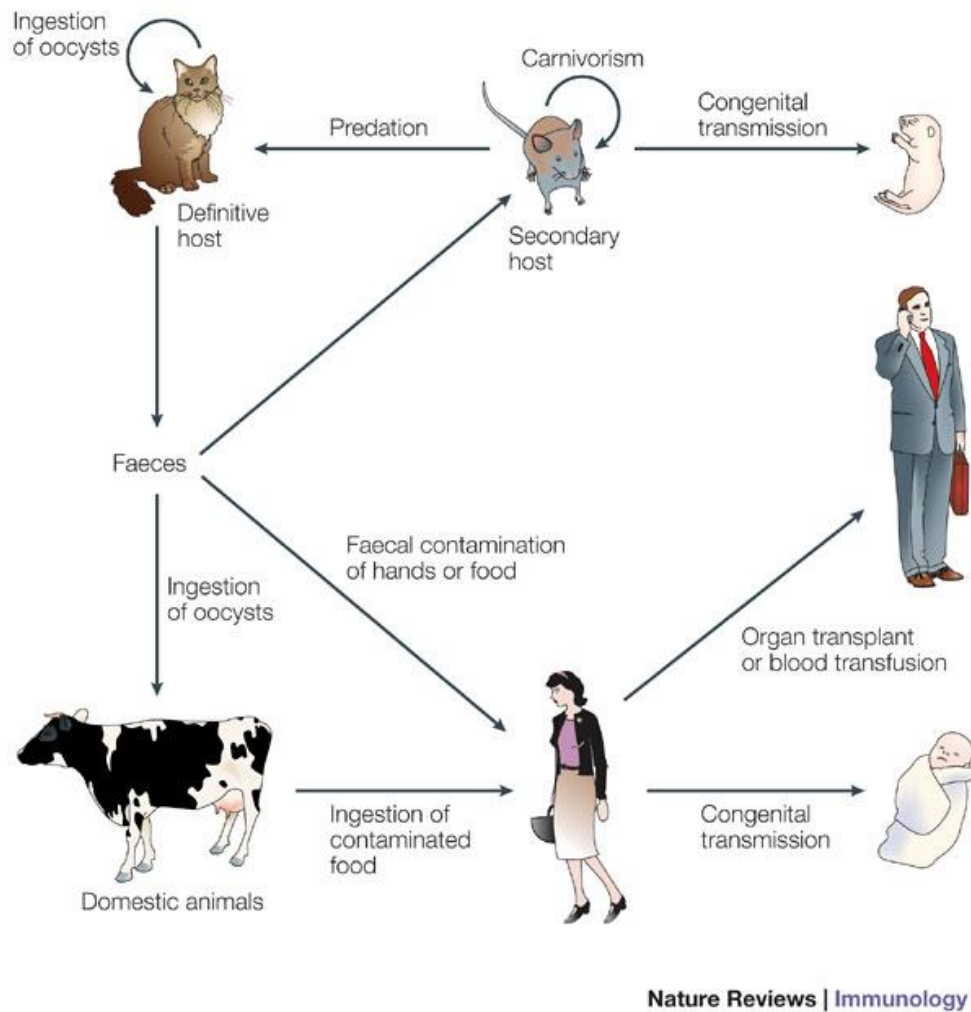
Ve svém hostiteli *T. gondii* žije intracelulárně a má fakultativně heteroxenní životní cyklus. Definitivním hostitelem jsou kočkovité šelmy čeledi *Felidae*, mezihostitelem může být jakýkoliv teplokrevný obratlovec včetně člověka. Životní cyklus je komplikovaný. *Toxoplasma* tvoří tři vývojová stádia – tachyzoity (volně pohyblivé), bradyzoity (ve tkáňové cystě) a sporozoity (ve vysporulované oocystě). Všechna stádia jsou infekční jak pro definitivního hostitele, tak pro mezihostitele.

V definitivním hostiteli, tedy kočkovité šelmě, dochází v epitelu tenkého střeva k sexuálnímu rozmnožování toxoplasmy. Tvoří se nevysporulovaná oocysta, která je uvolněna do lumen střeva a následně je s výkaly vyloučena do prostředí. Infikované kočkovité šelmy vylučují oocysty v mladém věku ve velkých počtech po dobu 1-2 týdnů. Poté, co oocysta opouští tělo hostitele, dochází ve vnějším prostředí ke sporogonii, která trvá 1-5 dnů a jejímž výsledkem je infekční vysporulovaná oocysta. Ta obsahuje dvě sporocysty, přičemž v každé z nich jsou čtyři sporozoiti (Dubey et al., 1998).

K nákaze dalšího hostitele či mezihostitele dochází alimentární cestou – pozřením vysporulované oocysty kontaminující vnější prostředí. Během zaživacího procesu se z oocysty uvolní sporozoiti. Ti se mění v tachyzoity, kteří napadají hostitelské buňky, v nichž se rychle množí, následně je při opuštění ničí a dále zaplavují napadený organismus. Pro vnímavého hostitele může být taková infekce smrtelná. S nástupem imunitní odpovědi u rezistentnějších hostitelů dochází po několika dnech k výrazné redukci počtu tachyzoitů v organismu. Ti se následně mění v pomalu se množící stadium bradyzoitů, kteří již

hostitelské buňky ničí mnohem méně. Místo toho v orgánech tvoří tkáňové cysty, v nichž se pomalu množí endodygonií. Privilegovanými orgány jsou kosterní a srdeční svalovina, centrální nervová soustava a oko, viz kapitola 2.6. Lokalizace v hostiteli – afinita k tkáním. Tkáňové cysty plné bradyzoitů jsou pak při pozření infekční jak pro definitivního hostitele, (čímž se cyklus uzavírá), tak i pro případné další mezihostitele (Tenter et al., 2000).

Další možnou cestou infekce je i transplacentární přenos (Jungersen et al., 2001). Takto získaná infekce může mít pro plod v krajní variantě až fatální následky, viz kapitola 2.2.3. Kongenitální toxoplasmóza. Z hlediska epidemiologického jde ale o méně významnou cestu přenosu (Dubey et Hoover, 1977). U lidí se pak toxoplasmóza může šířit i pomocí transplantace orgánů či krevní transfuze (Khurana et Batra, 2016). Vztahy mezi hostiteli a cesty přenosu přehledně sumarizuje níže přiložený **obr. 1**.



Obr. 1. Životní cyklus *Toxoplasma gondii* a možné cesty přenosu v přehledné grafické úpravě (převzato dle Aliberti, 2005).

2.2. Toxoplasmóza člověka a její projevy

Toxoplasmóza probíhá ve dvou po sobě jdoucích fázích, které se naprosto liší převládajícími stadii *Toxoplasma gondii*, klinickými příznaky i imunitní odpovědí.

2.2.1. Akutní toxoplasmóza

Akutní fáze toxoplasmózy, která propuká po uplynutí infekční doby – tedy 5-18 dnech po infekci (Kean et al., 1969) – je zapříčiněna množícími se tachyzoity, kteří ničí hostitelské buňky a zaplavují organismus. U imunokompetentních osob probíhá ve více než 95 % případů asymptomaticky buď zcela inaparentně, nebo jsou příznaky natolik nevýrazné, že jim není věnována pozornost. Pokud jsou zaznamenány, bývají udávány mírné nespecificky chřipkovité příznaky, jako je lymfadenopatie, horečky spojené s myalgií a únava. Tyto symptomy mohou přetrvávat i déle než měsíc, zpravidla jsou ale samoúdravné a akutní infekce přechází v celoživotní latentní formu. Závažný průběh akutní toxoplasmózy s těžkými příznaky přetrvávajícími po řadu měsíců je spíše ojedinělý, život ohrožující toxoplasmové pneumonie se u imunokompetentních osob ve střední Evropě nevyskytují.

Jiná je situace u imunosuprimovaných osob, u nichž může akutní toxoplasmóza probíhat komplikovaně a může být až smrtelná. V takových vzácných případech se infekce projevuje nejčastěji jako toxoplasmová encefalitida či pneumonie, případně i jako hepatitida, myokarditida nebo polyradikuloneuritida. Nemusí jít navíc jen o nově nakažené jedince, ale v důsledku imunosuprese může dojít k reaktivaci akutní fáze u osob s latentní toxoplasmózou, kdy dochází k prasknutí tkáňových cyst a přeměně klidového stadia bradyzoitů na invazivní a rychle se množící tachyzoity. Kritickou hranicí pro reaktivaci akutní toxoplasmózy je u lidí s AIDS počet CD4+ T-lymfocytů nižší než 100 nebo spíše 50 buněk na mikrolitr krve. V dobách před zavedením efektivní antiretrovirové terapie docházelo až u 40 % HIV-pozitivních pacientů ve stadiu AIDS v důsledku infekce *T. gondii* k rozvoji těžké encefalidity, 10-30 % těchto lidí pak na toxoplasmózu umíralo (Luft et al., 1984; Luft et Remington, 1992).

2.2.2. Latentní toxoplasmóza

Latentní fáze infekce, kdy v těle člověka dlouhodobě přežívají bradyzoiti v tkáňových cystách, je neléčitelná a dlouhou dobu byla považována za asymptomatickou (s výjimkou možnosti vzniku oční formy toxoplasmózy) a za zcela neškodnou. Některé nové výzkumy ale ukazují, že *T. gondii* může ovlivňovat svého hostitele, zvláště při přítomnosti cyst v centrální nervové soustavě, mechanicky (stimulace imunitní odpovědi) či chemicky (změna sekrece neurotransmiterů) i v této zdánlivě spící formě.

Zajímavou hypotézou je vliv latentní toxoplasmózy na vznik a průběh onemocnění schizofrenií. V posledních desetiletích jde o hojně studované téma a vzniklo několik komparativních studií uvádějících zvýšenou séropozitivitu protilátek IgG proti *T. gondii* u pacientů se schizofrenií oproti běžné populaci.

Práce z Turecka uvádí statisticky signifikantní rozdíl ($P < 0,001$) na vzorku 88 lidí v každé skupině. Zatímco IgG toxopozitivních jedinců mezi schizofreniky bylo 47,7 %, v kontrolní skupině jich bylo jen 20,4 % (Dogruman-Al et al., 2009). Obdobná studie případů a kontrol byla provedena i v Íránu na vzorku 62 lidí v každé skupině. Mezi schizofreniky mělo IgG protilátky proti *T. gondii* 67,7 % jedinců, mezi kontrolami pak jen 37,1 %. I tento výsledek je statisticky signifikantní ($P < 0,01$) (Alipour et al., 2011). Tyto počty osob jsou pro vyvozování jakýchkoliv závěrů naprosto nedostatečné.

Obdobných prací s podobnými výsledky byla ve 20. století vypracována celá řada (Fuller Torrey et Yolken, 2003). Existují ale také práce, které rozdíl mezi oběma skupinami nenašly (Emelia et al., 2012). Je tak třeba brát v potaz i publikační bias, což je tendence zveřejňovat především pozitivní výsledky a ty negativní minimalizovat.

V metaanalýze Sutterlanda a kolektivu byly dány dohromady studie případů a kontrol dávající do souvislosti přítomnost IgG protilátek proti *T. gondii* a vznikem různých psychiatrických onemocnění. Statisticky významná pozitivní korelace byla nalezena u výše diskutované schizofrenie (OR 1,81, $P < 0,00001$), dále u bipolární poruchy (OR 1,52, $P = 0,02$) a obsedantně kompulzivní poruchy (OR 3,4, $P < 0,001$). Stejná souvislost byla zjištěna i u vzniku závislosti (OR 1,91, $P < 0,00001$). Naopak statisticky významná souvislost mezi latentní toxoplasmózou a depresí pozorována nebyla (OR 1,21, $P = 0,28$) (Sutterland et al., 2015).

Nejčastěji uváděným argumentem pro „toxoplasmový původ“ schizofrenie je údajně vysoká prevalence toxoplasmózy u psychiatrických pacientů. Výsledky různých studií, zpravidla provedených na menších počtech osob, se různí. Klíčový význam však zde má práce Jírovceva (1971) provedená intradermálním testem na 1 638 pacientech (z toho 954 schizofreniků) čtyř československých psychiatrických ústavů s tímto závěrem: „Jsme proto toho názoru, že toxoplasmóza při etiologii různých psychických onemocnění nehraje prakticky žádnou roli. U jednotlivých onemocnění jsme našli přibližně stejná nebo velmi podobná čísla pozitivita odpovídající normě promořenosti našeho obyvatelstva“

Latentní toxoplasmóza je dávána do souvislosti nejen se vznikem schizofrenie, ale i se závažností jejího průběhu. Pacienti se schizofrenií mající zároveň latentní toxoplasmózu údajně mají těžší poškození kognitivních schopností než schizofrenici, kteří toxoplasmou nakaženi nejsou (Boronow et al., 2002). V jiné studii je u schizofreniků s latentní toxoplasmózou udáván úbytek šedé kůry v určitých oblastech mozku, zatímco u toxo-negativních pacientů a toxo-pozitivních lidí bez schizofrenie k tomuto úbytku nedochází (Horáček et al., 2010).

Uvažovaným mechanismem, kterým by cysty toxoplasmy v mozku ovlivňovaly vznik a průběh onemocnění schizofrenií, je indukování zvýšené koncentrace dopaminu, které je potvrzené u myši (Flegr et al., 2003). Přímý průkaz ale stále chybí.

Asociace mezi schizofrenií (či dalšími psychiatrickými onemocněními) a latentní toxoplasmózou se tak dle některých výsledků zdá být možná, za potvrzenou ji však dosud nelze považovat.

V kapitole 2.5. Manipulační hypotéza jsou zmíněny práce spojující latentní toxoplasmózu se zpomalenými reakčními časy, které vedou ke zvýšené pravděpodobnosti dopravních nehod (Havlíček et al., 2001), a se změnami osobnosti (Lindová et al., 2012).

2.2.3. Kongenitální toxoplasmóza

Přenos *T. gondii* z matky na plod je možný pouze během akutní fáze infekce, kdy tachyzoiti mohou proniknout skrze placentu (Robert-Gangneux et al., 2011). Po prodělané akutní toxoplasmóze lidé zpravidla získávají doživotní imunitu (s výjimkou imunosuprese) proti této fázi infekce. Pokud se tedy matka nakazí 4-6 měsíců před otěhotněním či dříve, nebezpečí přenosu infekce na plod nehrozí.

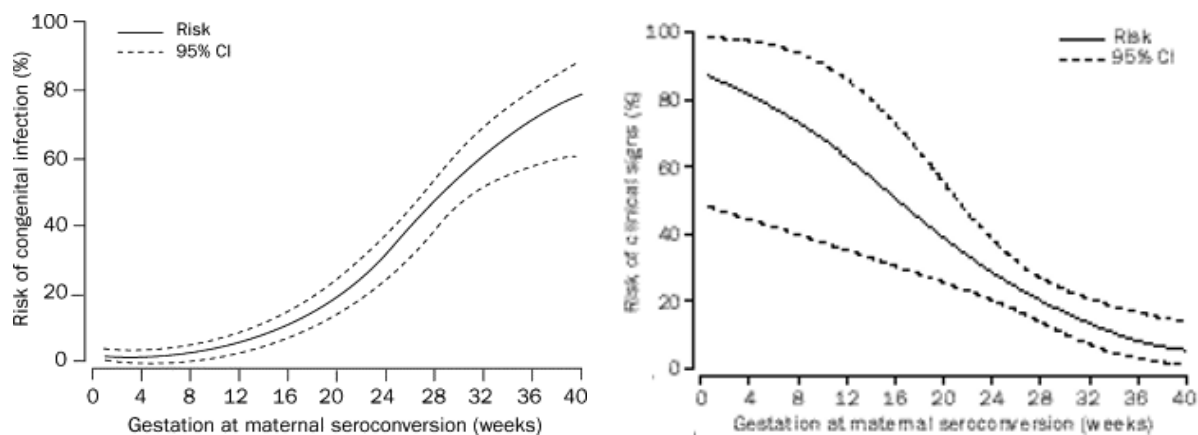
Když se však matka poprvé nakazí a prochází akutní fází toxoplasmózy během těhotenství (primoinfekce v graviditě), tak může dojít k přenosu infekce na plod. Existují i případy, kdy se matka nakazila až 2 měsíce před početím potomka a infekce se přesto přenesla na plod, nicméně jde o naprosto ojedinělou událost (Vogel et al., 1996).

Pravděpodobnost přenosu a důsledky infekce plodu při primoinfekci v graviditě jsou pak přímo závislé zejména na fázi těhotenství a věku fétu, viz **obrázky 2 a 3**. Vliv ale má pochopitelně i stav imunity matky, virulence kmene toxoplasmy a nasazení prenatální terapie. Udává se, že průměrně je pravděpodobnost infekce plodu při primoinfekci matky nižší než 50 %. V čase otěhotnění je riziko pod 5 %, ve 13. týdnu těhotenství 15 % a postupně narůstá na 44 % ve 26. týdnu a 71 % ve 36. týdnu (Thiébaud et al., 2007).

Incidence kongenitální toxoplasmózy se stanovuje obtížně. Odhady hovoří v závislosti na místě narození o 1-120 případech na 10 000 novorozenců. Pravděpodobnost, že matka onemocní během gravidity akutní toxoplasmózou je pak odhadována na 1-310 případů na 10 000 těhotenství. Pokud vezmeme do úvahy jen matky, které dosud akutní toxoplasmózu neprodělaly, tak pravděpodobnost stoupne na 6-410 případů na 10 000 těhotenství (Tenter et al., 2000). Podle jediného údaje pocházejícího z České republiky je pravděpodobnost primoinfekce v graviditě 0,29 %. a riziko infekce plodu 0,12 % (Palička et al., 1998).

Zatímco s postupující dobou gravidity stoupá pravděpodobnost přenosu infekce na plod, tak závažnost příznaků a důsledků kongenitální toxoplasmózy s časem těhotenství klesá. V prvním trimestru se udává 14% riziko přenosu infekce, ve třetím již 59% (Dunn et al., 1999). U 67-80 % prenatálně infikovaných novorozenců probíhá infekce subklinicky a lze ji diagnostikovat jen na základě laboratorních diagnostických metod. Jde zejména o děti matek, které byly nakaženy až ve třetím trimestru. Klinické symptomy infekce se ale mohou objevit v pozdějším věku. Nejčastěji se jedná o problémy se zrakem, sluchem či o psychomotorické a

neurologické obtíže. Uvádí se, že až u třetiny prenatálně infikovaných dětí se vyvine poškození zraku (Tenter et al., 2000).



Obr. 2. (nalevo) Procentuálně vyjádřené riziko kongenitálního přenosu infekce v závislosti na týdnu gravidity matky při její sérokonverzi. Přerušovanými čarami je znázorněn 95% interval spolehlivosti (převzato dle Dunn et al., 1999).

Obr. 3. (napravo) Procentuálně vyjádřené riziko rozvoje klinických symptomů kongenitální toxoplasmózy v závislosti na týdnu gravidity matky při její sérokonverzi. Přerušovanými čarami je znázorněn 95% interval spolehlivosti (převzato dle Dunn et al., 1999).

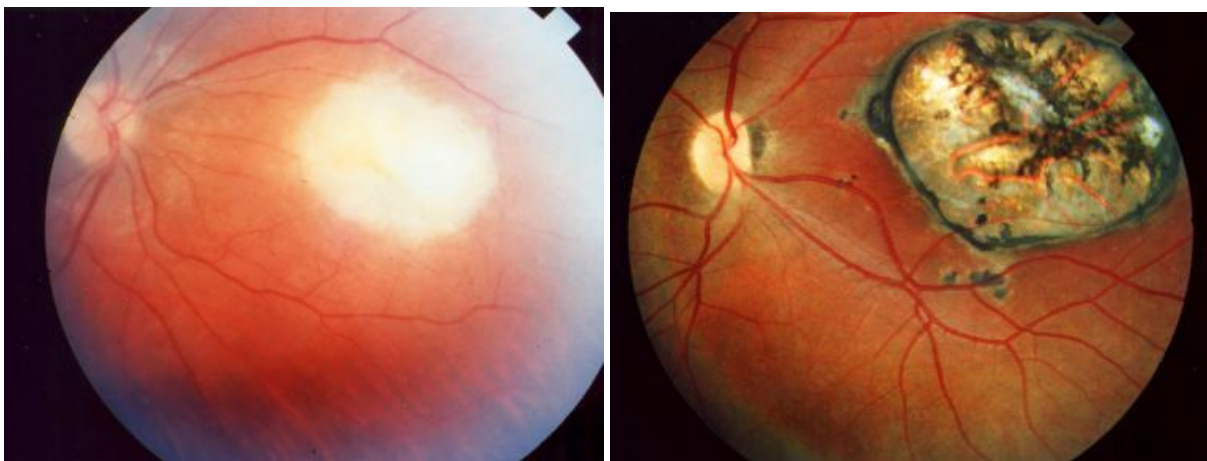
Nejzávažnějším průběhem se vyznačují infekce zasahující centrální nervovou soustavu, jako je encefalomyelitida, hydrocefalus či intrakraniální kalcifikace mozku. Klinické symptomy prodělané kongenitální toxoplasmózy má 10-23 % novorozenců. Jen u desetiny nalezneme projevy jako chorioretinitida, hydrocefalus či intrakraniální kalcifikace mozku, což jsou dlouho známé příznaky prodělané kongenitální toxoplasmózy. Ostatní symptomy mohou být velmi různorodé od lymfadenopatie, přes splenomegalii či hepatomegalii až po poruchy centrálního nervového systému (Koskiniemi et al., 1989; Tenter et al., 2000).

Pro českou medicínu je pak významné, že první publikování toxoplasmózy jako lidského onemocnění učinil český oftalmolog dr. Janků v roce 1923 na případu novorozence s kongenitální toxoplasmózou (Janků, 1923).

2.2.4. Oční toxoplasmóza

Jde o závažnou formu onemocnění, která může významně poškodit zrak. Většinou se jedná o pozdní manifestaci prenatalně získané nákazy, ale oční forma toxoplasmózy se může výjimečně rozvinout i u postnatálních nákaz (Perkins, 1973). V každém případě se však poškození oka projeví až delší dobu po infekci; na rozdíl od ostatních forem nesouvisí oční toxoplasmóza bezprostředně s toxoplasmózou akutní. Rozhodujícím stadiem *Toxoplasma gondii* zde také není tachyzoit, ale bradyzoit.

Oční toxoplasmóza se projevuje ve formě chorioretinitidy, což je zánětlivé postižení sítnice (Wilder, 1952; Montoya et Remington, 1996). Zvláště závažné následky pro zrak mohou mít léze v oblasti makuly, viz **obrázky 4 a 5**. Zánět ale může zasáhnout i další části oka jako např. sklivce, čímž se sníží jeho průzračnost (Brejchová et al., 2002).



Obr. 4. (nalevo) Akutní makulární retinitida zapříčiněná toxoplasmovou primoinfekcí. Vyžaduje okamžitý terapeutický zásah (převzato dle Wu et García, 2015).

Obr. 5. (napravo) Zhojená jizva po oční toxoplasmóze. Má závažné konsekvence pro zrak – ostrost vidění pacienta 20/400 (převzato dle Wu et García, 2015).

2.3. Diagnostika a terapie toxoplasmózy

2.3.1. Diagnostika toxoplasmózy

Těžištěm diagnostiky akutní toxoplasmózy u dospělých osob jsou sérologická vyšetření. Protilátky se objevují 2. týden po infekci, maximální titry dosahují typicky po 3-6 měsících a v nízkém titru pak přetrvávají po dlouhá desetiletí až po zbytek života (Machala et al., 2005).

V České republice se ke stanovení celkových antitoxoplasmických protilátek využívá nejčastěji komplement-fixační reakce (KFR), která má vysokou senzitivitu (Ondriska et al., 2003), nebo nepřímá fluorescence (Zástěra et al., 1987). Tyto klasické metody poskytují spolehlivý výsledek po kvalitativní i semikvantitativní (titr protilátek) stránce (Kodym et Gelenecky, 2012). KFR lze použít ke stanovení titrů antitoxoplasmických protilátek jak u lidí, tak u zvířat.

U některých pacientů ale přetrvávají vyšší titry delší dobu, a tak se tímto testem těžko odlišují nově získané infekce od odeznívajících. Pro akutní toxoplasmózu svědčí vzestup hladin antitoxoplasmických protilátek či vysoké hodnoty specifických IgM (případně IgA a IgE). V tomto případě je třeba vyšetření doplnit o detekci specifických protilátek jednotlivých tříd. Nejčastěji se k tomuto účelu využívá testu ELISA. Použít se dá i opakované kvantitativní stanovení pro sledování dynamiky protilátek v čase (Kodym et Gelenecky, 2012). Nevýhodou testů na IgM, IgA a IgE je poměrně časté dlouhodobé přetrvávání pozitivních výsledků a také možnost vyšší nespecifické reaktivity v důsledku faktorů (antinukleární protilátky, rheumatoidní faktor atd.), jež mohou být přítomny ve vyšetřovaném séru, ale s toxoplasmózou nemají souvislost (Fuccillo et al., 1987). Předpovědní hodnota pozitivního testu tak může být výrazně snížena. Pokud není závěr jasný, je třeba vyšetření zopakovat a sledovat dynamiku protilátek, případně je doplnit o další testy.

K vyšetřování těhotných žen se často používá stanovení avidity antitoxoplasmických protilátek třídy IgG. Avidita udává pevnost vazby protilátek na jejich příslušné antigeny. Avidita antitoxoplasmických IgG je zpočátku nízká, přičemž v průběhu prvních čtyř měsíců toxoplasmózy stoupá. Test tak slouží k určení stáří infekce (Kodym et Gelenecky, 2012).

Nízká avidita IgG protilátek, jež přetrvává maximálně 4 měsíce po infekci (Machala et al., 2005), je považována za marker akutní toxoplasmózy.

V případě oční toxoplasmózy diagnostika spočívá zejména v nálezů na očním pozadí. Vyšetření protilátek v nitrooční tekutině se příliš nevyužívá kvůli riziku zavlečení sekundární infekce. Titry sérových protilátek, které dokazují, že pacient je toxoplasmózou infikován a tudíž oftalmologický nález může mít toxoplasmovou etiologii, jsou pak spíše nízké, maximálně dosahují středních hodnot (Machala et al., 2005).

Při posouzení, zda došlo k infekci plodu, se dá využít jak sérologie, tak i moderní metody molekulární biologie. Komparativní Western blot porovná profil protilátek ze séra matky s profilem z plodové vody a krve pupečníkové nebo novorozenecké. Pomocí PCR se provádí detekce toxoplasmové DNA. Materiálem je plodová voda, v níž průkaz toxoplasmem potvrzuje infekci plodu na více než 90 %, a krev novorozence, ve které je nalezení toxoplasmové DNA absolutním důkazem kongenitální toxoplasmózy (Kodym et Geleneky, 2012). Průkazu pomocí PCR se dá využít i při diagnostice toxoplasmových neuroinfekcí u dospělých osob. Testovaným materiálem je v tomto případě mozkomíšni mok (Machala et al., 2005).

2.3.2. Terapie toxoplasmózy

U imunokompetentních jedinců není u asymptomatické a uzlinové formy specifická léčba potřeba. Akutní forma posléze přechází v celoživotní latentní toxoplasmózu. Léčba je indikována v případě těhotných žen, dětí s vrozenou infekcí, dětí do 5 let věku, imunodeficientních osob a oční toxoplasmózy. Terapie je účinná pouze na tachyzoity. Infekci neeradikuje, ale vede k přechodu na latentní formu a redukuje rozsah poškození hostitelské tkáně. Nejčastěji se podává kombinace pyrimetaminu a sulfadiazinu (Machala et al., 2005). Obě látky jsou inhibitory metabolismu kyseliny folinové, která se obvykle při léčbě užívá jako její doplněk, aby došlo k eliminaci možných nežádoucích vedlejších účinků (myelosuprese).

V těhotenství se do 15. týdne podává pouze makrolid spiramycin. Ten nepřestupuje přes placentu, ale koncentruje se v ní v daleko větších hladinách než v séru, čímž působí preventivně proti přestupu tachyzoitů k plodu. Je dobře tolerován a má minimum nežádoucích účinků. Využívat se dá po celou dobu gravidity (Kodym et Geleneky, 2012).

Od 16. týdne je možné využívat kombinaci pyrimetaminu a sulfadiazinu. Oba preparáty prostupují placentou a měly by být použity jen při potvrzené nebo vysoce pravděpodobné infekci plodu. Při léčbě samotným spiramycinem klesá riziko přenosu infekce na plod o 60 %, při podávání kombinace pyrimetamin + sulfadiazin o 90 %. Není důvod k interrupci, pokud se neprokáže vážné poškození plodu pomocí sonografie či pokud se nepotvrdí riziková infekce plodu (obzvláště ta v 1. trimestru) pomocí PCR (Machala et al., 2005).

V případě kongenitální toxoplasmózy se po porodu přechází k postnatální terapii, která působí jako prevence pozdní manifestace symptomů u novorozenců. Postnatální terapie by měla být zahájena co nejdříve po narození a opět se využívá kombinace pyrimetaminu se sulfadiazinem s doplněním kyseliny folinové (Kodym et Geleneky, 2012).

U imunodeficientních osob se při poklesu CD4+ T-lymfocytů pod hranici 250 buněk na mikrolitr krve začíná s primární profylaxí, kupříkladu kotrimoxazolem. U reaktivovaných forem toxoplasmózy se u těchto pacientů podává vyšší dávka stejné kombinace pyrimetamin + sulfadiazin. Po prodělané reaktivaci se zahajuje sekundární profylaxe opět kombinací pyrimetamin + sulfadiazin, tentokrát však v nižší dávce než ve výše uvedeném případě. Kotrimoxazol není pro sekundární profylaxi dostatečně účinný. Pokud se nepodaří zvýšit počet CD4+ T-lymfocytů, tak je léčba podávána doživotně (Machala et al., 2005).

V případě nesnášenlivosti sulfonamidů může být v kombinaci s pyrimetaminem použit clindamycin, azitromycin, clarithromycin nebo atovaquon (Dunay et al., 2004). U lehčích forem oční toxoplasmózy se může podávat pouze clindamycin (Machala et al., 2005).

2.4. Hypotéza sexuálního přenosu *Toxoplasma gondii*

Relativně až v nedávné době více testovanou hypotetickou cestou přenosu toxoplasmové infekce je přenos pohlavním stykem ze samce na samici. Jelikož je tato diplomová práce na toto téma zaměřena, bude možnému sexuálnímu přenosu *T. gondii* věnována i následující kapitola literárního přehledu.

2.4.1. Důkazy přímé

Bylo publikováno několik prací, které přinášejí důkazy o možnosti přenosu infekce *T. gondii* při pohlavním styku z nakaženého samce na samici. U experimentálně nakažených psů byla ověřena přítomnost toxoplasem ve spermatu. Infekci se povedlo přenést i na samice pomocí umělé inseminace, posléze byl potvrzen i vertikální přenos na štěňata (Arantes et al., 2009). Obdobné studie potvrdily přítomnost toxoplasem ve spermatu králíka (Liu et al., 2006), prasete (Moura et al., 2007), skotu (Scarpelli et al., 2009), ovce (Lopes et al., 2009), myši (Asgari et al., 2015) i spermatu a samčích pohlavních orgánech kozy (Santana et al., 2010).

Existuje i studie, která potvrzuje výskyt toxoplasem ve spermatu a v pohlavních orgánech potkanů (*Rattus norvegicus*) a následný pohlavní přenos na nenakažené samice. Nicméně primárním zaměřením této práce bylo studium manipulační hypotézy, přičemž potvrzení sexuálního přenosu coby možné cesty infekce je pouze zmíněno ve výsledcích bez bližší metodiky, což nepůsobí příliš důvěryhodně (Dass et al., 2011).

Sexuální přenos toxoplasmy byl nově testován i na laboratorních myších. 10 samců Balb/C bylo intraperitoneálně infikováno tachyzoity virulentního RH kmene. Po 48 hodinách jim byly odebrány vzorky spermatu z nadvarlete. Všechny byly pozitivní na toxoplasmu jak při barvení giemsou a následné mikroskopii, tak při použití PCR metod. Následně se infikovaní samci připustili k páření se samicemi. Pozorován nebyl žádný přenos infekce na samice ani na její plod. Autoři z tohoto výsledku usuzují, že se *T. gondii* na myších sexuálně nepřenáší (Asgari et al., 2015).

Studie sledovala i výběr samic při páření. Mírně upřednostněni byli nenakažení samci, ale nešlo o statisticky významný rozdíl. Ten byl naopak pozorován u počtu těhotenství. Zatímco po páření s nakaženými samci otěhotněly jen 4 z 20 samic, tak při páření s nenakaženými

samci to bylo 17 z 20 samic ($P = 0,0001$). Tento rozdíl je vysvětlován ztrátou energie a horším zdravotním stavem nakažených samců vzhledem k probíhající infekci (Asgari et al., 2015).

Velice zajímavá je i studie mapující výskyt toxoplasem ve spermatu, varlatech a nadvarlatech primoinfikovaných koček. K infekci byly použity dva kmeny *T. gondii*, a sice kmeny P a RH. Výsledky, získané pomocí nested PCR, histopatologie a imunohistochemické analýzy, přicházejí s následujícím závěrem: *Toxoplasma* nebyla nalezena ani ve spermatu, ani v žádné z tkání vyšetřovaných pohlavních orgánů (Teixeira et al., 2017).

Co se týče sexuálního přenosu toxoplasmózy u lidí, tak existuje studie, v níž byla zjištěna přítomnost *T. gondii* v ejakulátu několika mužů (Disko et al., 1971). Jde však o studii starou, neopakovanou a jen lokálně publikovanou v německém jazyce. Hypotetickou možnost sexuálního přenosu u lidí zmiňují ve své knize i Dubey a Beattie, avšak dodávají, že by šlo o vzácný a epidemiologicky nedůležitý fenomén (Dubey et Beattie, 1988). *Toxoplasma* byla u lidí nalezena i ve tkáni varlat, nicméně šlo o oportunní infekci u pacientů s AIDS (De Paepe et al., 1990).

2.4.2. Důkazy nepřímé

Kromě přímých důkazů existují i důkazy nepřímé, jež podporují sexuální přenos *T. gondii* u člověka. Většinu z nich shrnul ve své práci Jaroslav Flegr do několika argumentů (Flegr et al., 2014).

První říká, že až dvě třetiny infekcí toxoplasmou u těhotných žen nemůže být vysvětleno známými rizikovými faktory. To je podpořeno prací, která uvádí, že u 52 % žen, jimž se narodily toxoplasmou infikované děti, nelze najít žádný rizikový faktor, jemuž by byly během těhotenství vystaveny (Boyer et al., 2005).

Druhý argument uvádí, že prevalence toxoplasmózy u žen v plodném věku koreluje s výskytem sexuálně přenosných chorob. Společným rizikovým faktorem by byl nechráněný pohlavní styk.

Třetím argumentem je zvýšená incidence toxoplasmózy u žen – nikoliv však u mužů – ve věkové skupině od 25 do 35 let. Ta by mohla souviset s nechráněným pohlavním stykem po uzavření manželství.

Čtvrtým argumentem je, že u predisponovaných jedinců propuká schizofrenie o 3 roky později u toxoplasma-pozitivních žen než u toxoplasma-pozitivních mužů. To by mohlo souviset s třetím argumentem, který zmiňuje druhý vrchol incidence u žen, který u mužů chybí. U toxoplasmou nenakažených schizofreniků rozdíl v propuknutí onemocnění u žen a mužů není. Více byla tato problematika rozebrána v části podkapitoly 2.2.2. Latentní toxoplasmóza.

Pátý argument udává, že ve vyspělých zemích se za posledních 20 let snižuje prevalence toxoplasmózy, což autor dává do souvislosti se snížením promiskuity a bezpečným sexem v důsledku preventivních opatření v boji s pandemií AIDS.

Šestým argumentem je pozitivní korelace mezi pravděpodobností nákazy toxoplasmózou a počtem nechráněných pohlavních styků s otcem dítěte před otěhotněním.

Za další nepřímý důkaz lze považovat i údajnou zvýšenou prevalenci toxoplasmózy u lidí se zvýšenou promiskuitou. Tomuto tématu se věnoval Alvarado-Esquivel a kolektiv ve svých pracích z roku 2006 a 2015. V první zmíněné studii provedené na pacientech psychiatrické léčebny byla v multivariační analýze nalezena souvislost mezi infekcí *T. gondii* a mírou promiskuity (Alvarado-Esquivel et al., 2006). V nové práci pak hledal autorský kolektiv stejnou souvislost u skupiny sexuálních pracovníků pomocí studie případů a kontrol. Zatímco u pokusné skupiny (136 případů) byly nalezeny protilátky proti *T. gondii* v 15,4 % případů, u kontrolní skupiny (272 kontrol) mělo tyto protilátky jen 3,7 % žen, což je statisticky významný rozdíl (OR = 4,05; P = 0,0001). Byla zaznamenána i statisticky významná spojitost mezi séropozitivitou na *T. gondii* a utrpenými zraněnými prostitutek při pohlavním styku (OR = 6,30; P = 0,03) (Alvarado-Esquivel et al., 2015).

Posledním nepřímým důkazem je práce udávající zvýšenou séropozitivitu na protilátky proti *T. gondii* u otců dětí s kongenitální toxoplasmózou. Séropozitivita těchto otců byla 36 % oproti 9,8 % (P < 0,001), což je průměr v běžné populaci odpovídající pokusné skupině a místu studie (Contopoulos-Ioannidis et al., 2015).

2.5. Manipulační hypotéza

Toxoplasma gondii je i významným studovaným parazitem z hlediska tzv. manipulační hypotézy, podle které dovedou určití parazité účelně manipulovat chování svého hostitele tak, aby zvýšili pravděpodobnost svého přenosu do dalšího hostitele (Webster et McConkey, 2010). Testy na myších prokázaly, že *T. gondii* prodlužuje jejich reakční dobu a mění jejich aktivitu a ostražitost tak, že místo přirozeného strachu je pach kočičí moči naopak přitahuje (Berdoy et al., 2000).

Prací na toto téma je celá řada a týkají se i lidí. Infekce člověka jsou v současné době pro toxoplasmu sice zpravidla slepou uličkou, ale ta i tak zřejmě dokáže ovlivňovat jejich reakce a osobnost. Stejně jako u myší infekce toxoplasmou zpomaluje reakční časy člověka (Havlíček et al., 2001), což je dáváno do souvislosti s následným rizikem dopravní nehody (Flegr, 2013). Diskutovány jsou i osobnostní změny infikovaného člověka (Lindová et al., 2012), ty ale přesahují rámec literární rešerše vztahující se k mým pokusům v rámci diplomové práce a detailněji se jimi zabývat nebudu.

Z pohledu mé práce je zajímavější studie, která udává, že *T. gondii* zvyšuje atraktivitu nakažených samců pro samice u potkana (Dass et al., 2011), což by podporovalo hypotézu o sexuálním přenosu. Zmíněná práce také uvádí, že infekce negativně neovlivnila reprodukční parametry nakažených samců, tedy že jejich sexuální chování i fertilita byla srovnatelná s neinfikovanými jedinci.

Opačné výsledky ale byly prezentovány v obdobné práci na myších. V práci Asgariho a kolektivu samice mírně preferovaly nenakažené samce, byť rozdíl nebyl statisticky významný. Naopak byl pozorován statisticky významný rozdíl v neprospěch nakažených samců myši v počtu březích samic po páření s nakaženými a nenakaženými samci (Asgari et al., 2015). Výsledky této studie byly detailněji rozebírány v předchozí kapitole.

2.6. Lokalizace v hostiteli – afinita k tkáním

Zdá se, že lokalizace *T. gondii* v těle hostitele není náhodná a tkáň některých orgánů je ze strany parazita preferovanější. Starší pokusy u prasat prokázaly častou přítomnost tkáňových cyst s bradyzoity *T. gondii* zejména v mozku (cysty v mozku nalezeny u 12 ze 16 experimentálně nakažených prasat) a pak i v kyslíkem bohatě zásobených svalech, konkrétně v srdci (11 ze 16 prasat), jazyku (10 ze 16) a bránici (6 ze 16). Méně často pak byly cysty nalezeny i v různé svalovině určené ke komerčnímu prodeji v potravinářství (u 1-5 nakažených prasat z 16). Výjimečně byly tkáňové cysty nalezeny i v játrech a ledvinách (1 z 16) (Dubey, 1988).

Podobná recentní studie se zabývala orgánovou predilekcí *T. gondii* na prasatech v České republice. Dle výsledků získaných pomocí kvantitativní real-time PCR byl zdaleka nejvíce zasažen mozek, v němž se počty parazitů pohybovaly od 121,9 až do 3857,7 (medián 553,7) kusů na gram tkáně. *Toxoplasma* byla nalezena i ve tkáních plic (počty parazitů na gram tkáně 0,02-61,3; medián 0,3), srdce (0,37-7,34; medián 2,6) a v zádových svalech (0,31-2,81; medián 0,6). Velmi málo pak byla parazity zasažena tkáň jater, ledvin a dalšího kosterního svalstva (u všech medián $\leq 0,2$). Žádná DNA toxoplasmy pak nebyla detekována ve slezině (Juránková et al., 2014).

Stejná autorka provedla obdobnou studii i na mladých kozách, které byly čerstvě odstaveny od kojení. Ty byly experimentálně nakaženy a rozděleny do dvou skupin. Zvířata z první skupiny byla utracena po 30 dnech od infekce, zvířata ve druhé skupině po 90 dnech od infekce. Výsledky byly opět získány pomocí kvantitativní real-time PCR. Největší koncentrace toxoplasmové DNA byla u obou skupin nalezena v plicích, ale jen u první skupiny šlo o statisticky signifikantní výsledek. Práce nabídla i zajímavé výsledky v porovnání koncentrace parazitů v určité tkáni v závislosti na čase. Zatímco v játrech a v zádovém svalstvu se koncentrace parazitů s uplynulým časem zvedla, tak v srdci se naopak snížila (Juránková et al., 2013).

Ve studii na myších byla jedna část infikována virulentním RH kmenem *T. gondii*, zatímco druhá avirulentním kmenem ME49/PTG. Rozsev toxoplasmy do orgánů infikovaných myší pak byl sledován *in-vivo* pomocí bioluminescenčního zobrazování. Virulentní kmen se množil výrazně rychleji, ale u obou byla patrná afinita k očím, mozku a varlatům, což jsou vše imunoprivilegované orgány (Hitziger et al., 2005).

Afinita toxoplasmy k mozku byla potvrzena i při pokusech na laboratorních potkanech, jejichž mozková tkáň obsahovala toxoplasmu ve 113 ze 138 případů (82 %) po 2 měsících od experimentální infekce (Freyre et al., 2003).

Stejná souvislost byla prokázána i na kuru domácím. Pomocí real-time PCR byla prokázána DNA toxoplasmy u 24 z 26 vzorků z mozku a srdce seropozitivních zvířat. Mezi těmito tkáněmi nebyl pozorován rozdíl ani v kvantitě parazitů, ani v počtu pozitivních vzorků (Aigner et al., 2010). Afinita *T. gondii* k srdci u tohoto zvířecího modelu byla prokázána i v další studii, která kromě toho zachytila toxoplasmu i v mozku a kosterní svalovině (Dubey et al., 2015).

Co se týče samotné lokalizace v mozku, tak byla provedena poměrně rozsáhlá studie mapující lokalizaci tkáňových cyst v mozku potkanů. Pokusná zvířata byla rozdělena do skupin a nakažena 11 kmeny *T. gondii*. Utracena byla 2 měsíce po podání infekční dávky. *Toxoplasma* byla nalezena ve všech regionech mozku, konkrétní počty v určitých částech se ale výrazně lišily jedinec od jedince. Celkově se dá i přes velkou variabilitu říci, že nejvíce zasažen byl colliculus a větší koncentrace tkáňových cyst byla pozorována i v mozečku, mozkové kůře a thalamu. Dva kmeny pak vykazovaly tropismus k colliculu a čichovému laloku. Oční léze byly pozorovány u 23 z 92 zvířat (25 %). Zároveň byly nalezeny tkáňové cysty v očním bělmu jednoho potkana a v optickém nervu dvou potkanů. Z dalších tkání byly cysty nalezeny v jazyku u 20 zvířat, naopak v srdci a ve svalech končetin nalezeny nebyly (Dubey et al., 2016).

Obdobnou studii na myších infikovaných toxoplasmy provedla Berenreiterová et al (2011). Tentokrát se jednalo pouze o nákazu cystickým kmenem HIF. Výsledky ale byly do značné míry obdobné jako u výše citované práce. Cysty byly opět nalezeny po celém mozku a opět byly velké rozdíly mezi jednotlivými zvířaty jak v počtu cyst, tak v jejich lokalizaci. Mezi více nakažené regiony mozku patřil opět čichový lalok a mozková kůra, zvýšená koncentrace cyst byla v průměru nalezena i v hippocampu a amygdale. V kontrastu se studií Dubeyho et al. (2016) pak byla nalezena nižší koncentrace tkáňových cyst v mozečku.

Ohledně buněčné preference tkáňových cyst *T. gondii* v mozku byla provedena práce, která jednoznačně ukazuje na jejich afinitu k neuronům. *In-vitro* sice mohou sloužit jako hostitelské buňky i astrocyty, ale *in-vivo* se tak, zdá se, neděje, ačkoliv astrocyty interagují s tkáňovými cystami v neuronech (Melzer et al., 2010).

3. Metodika

3.1. Modelový organismus

3.1.1. Hostitel

Použitými modelovými hostiteli byly dospělé myši kmene C57Bl/6 samčího pohlaví a dospělé myši kmene BALB/c samičího pohlaví.

3.1.2. Parazit

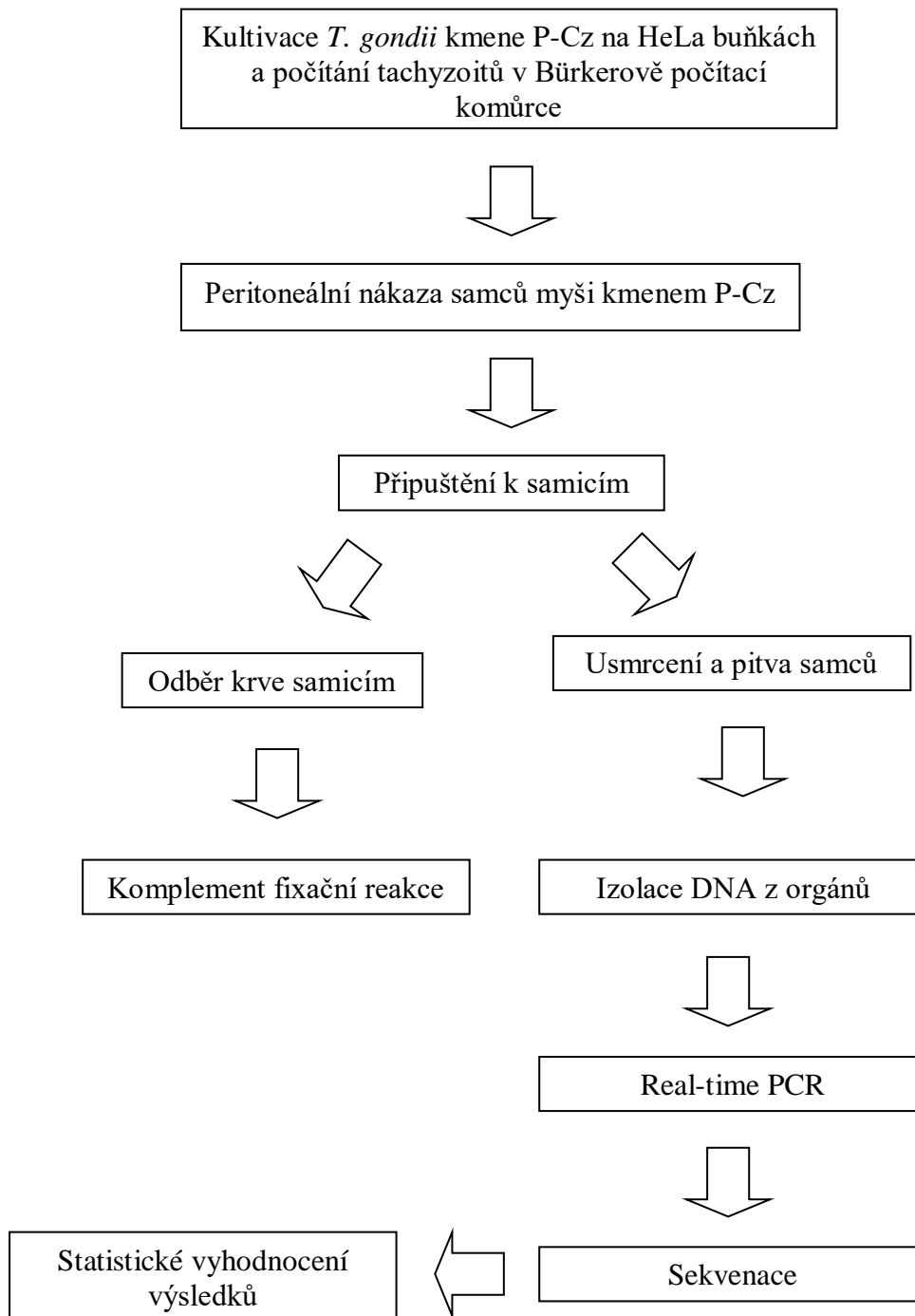
Použitými parazity byli tachyzoiti *Toxoplasma gondii* virulentního kmene P-Cz a tkáňové cysty s bradyzoity *Toxoplasma gondii* cystického avirulentního kmene HIF. Parametry virulence obou kmenů a průběhu patogeneze jsou popsány ve studii Kodyma et al. (2002).

Kmen P-Cz byl izolován v Praze z mozku dvouměsíční dívky, která zemřela na kongenitální toxoplasmózu v lednu 1963 (Kouba et al., 1974). Analýzou chromozomální DNA bylo zjištěno, že patří do linie pro myši virulentních kmenů (podobně jako v literární rešerši zmiňovaný kmen RH) (Literák et al., 1998).

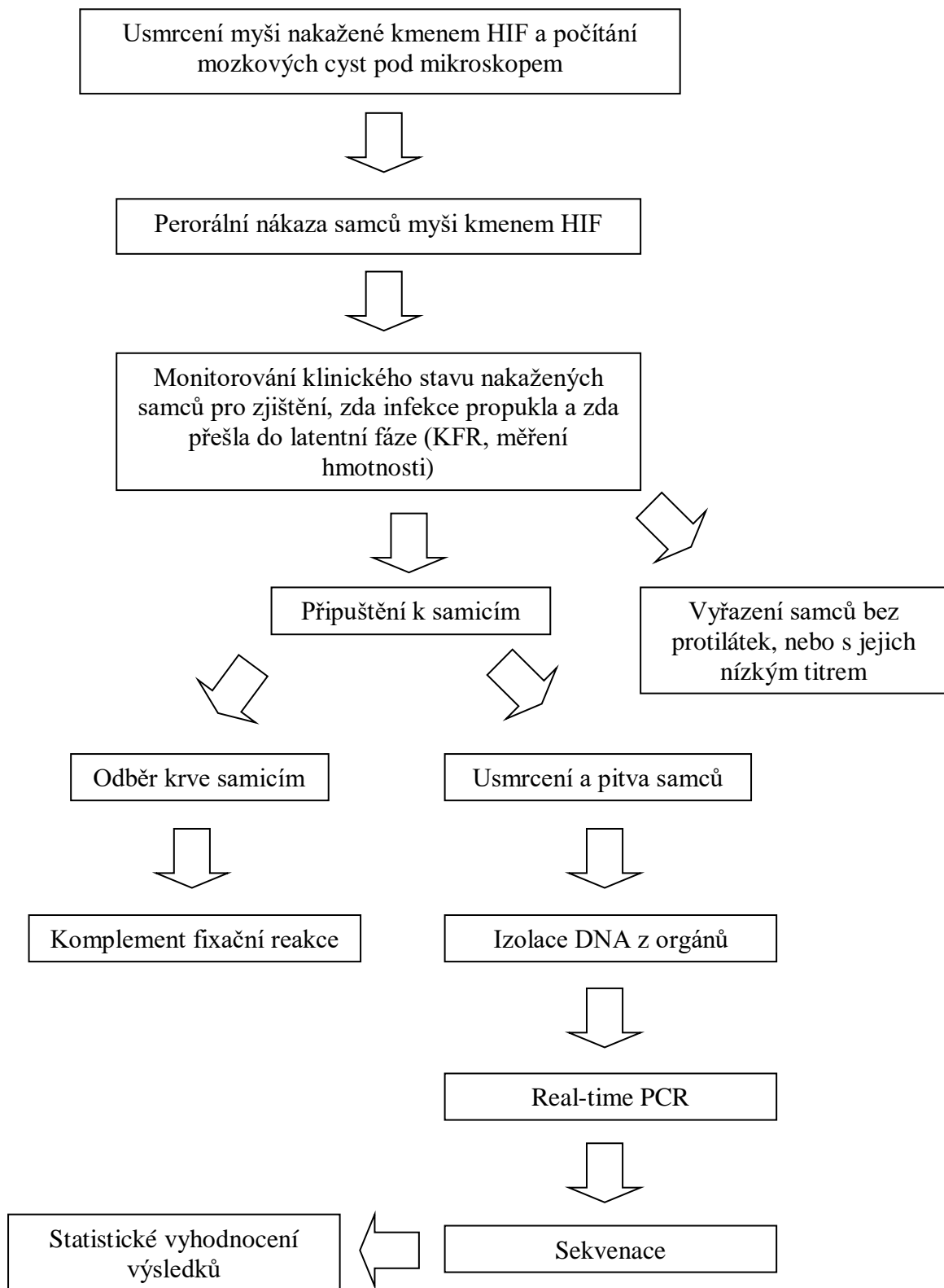
Kmen HIF byl izolován v Praze z mozkomíšního moku 53letého HIV-pozitivního pacienta s asymptomatickou toxoplasmózou (Kodym et al., 2002). Genotypizován byl jako běžný střeoevropský kmen toxoplasmy typu II.

3.2. Schéma pokusů

3.2.1. Pokus V - virulentní kmen *Toxoplasma gondii*



3.2.2. Pokus C – cystický avirulentní kmen *Toxoplasma gondii*



3.3. Experimentální infekce

3.3.1. Pokusné skupiny myší

U infekcí oběma kmeny toxoplasmy byly myši rozděleny do dvou skupin – na nakažené samce a nenakažené samice pro páření s nimi. Mimo páření byli samci ustájeni v klecích každý zvlášť a samice byly ustájeny po třech kusech na jednu klec.

Pokusy V s virulentním kmenem

V♂♂1: Samci myši kmene C57Bl/6 infikovaní toxoplasmou kmenu P-Cz, 5 kusů

V♀♀1: Samice myši kmene BALB/c pro páření se samci ze skupiny 1, 15 kusů

V♂♂2: Samci myši kmene C57Bl/6 infikovaní toxoplasmou kmenu P-Cz, 7 kusů

V♀♀2: Samice myši kmene BALB/c pro páření se samci ze skupiny 1, 21 kusů

Pokus C s cystickým avirulentním kmenem

C♂♂: Samci myši kmene C57Bl/6 infikovaní toxoplasmou kmenu HIF, 14 kusů

C♀♀: Samice myši kmene BALB/c pro páření se samci ze skupiny 1, 15 kusů

3.3.2. Příprava infekční dávky

Pokusy V

Kultivace virulentního kmene toxoplasmy P-Cz na HeLa buňkách byla provedena dle Valkouna (1983).

Nejprve byly připraveny HeLa buňky. Napěstovány byly na tkáňovém RPMI 1640 médiu s přidaným 2% fetálním bovinním sérem. Kultivovány byly v plastových falkonkách při 37°C. Z dobře narostlé kultury HeLa buněk bylo po týdnu slito médium, v tenké vrstvě byla

přidána uchovávaná linie toxoplasmy P-Cz z tekutého dusíku a falkonka byla dána k adsorbci do termostatu na 90 minut při 37°C. Poté bylo slité médium vráceno zpět do falkonky, která se uložila zpět do termostatu. Cca po týdnů bylo možné pozorovat pod mikroskopem cytopatický efekt HeLa buněk, což značilo, že kultura toxoplasem je dostatečně narostlá a připravena k dalšímu použití.

Po kultivaci byla v Bürkerově počítací komůrce spočtena koncentrace tachyzoitů pro určení infekční dávky. Konkrétně bylo médium s tachyzoity nakapáno pipetou na okraj komůrky, kam následně nateklo. Pro určení koncentrace bylo spočteno 10 velkých čtverců. Z výsledného počtu tachyzoitů byl spočítán jejich počet na μl suspenze. Ta byla naředěna fyziologickým roztokem na koncentraci 2000 tachyzoitů/ml.

Pokus C

Cystické kmeny *Toxoplasma gondii* jsou pasážovány na laboratorních myších v SPF podmínkách zvěřince Státního zdravotního ústavu. Pasážování se provádí jednou za cca 6-12 měsíců. Národní referenční laboratoř pro toxoplasmózu chová i myši nakažené kmenem HIF. Jedna takto nakažená myš byla pro potřeby pokusu utracena stržením vazů. Při následné pitvě jí byl vyjmut mozek, který byl poté homogenizován ve fyziologickém roztoku. Známý objem suspenze byl pod krycím sklíčkem mikroskopován pro spočtení tkáňových cyst *T. gondii*. Takto bylo zmikroskopováno 5 sklíček, na základě čehož byla spočtena koncentrace cyst v suspenzi. Ta byla naředěna fyziologickým roztokem na koncentraci 60 cyst/ml.

3.3.3. Infekční dávka a její podání

Pokus V

Samci skupin V♂♂1 a V♂♂2 byl nakažen intraperitoneálně injekční stříkačkou injikováním 0,5 ml suspenze obsahující infekční dávku asi 1000 tachyzoitů *Toxoplasma gondii* kmene P-Cz.

Pokus C

Samci skupiny C♂♂ byli perorálně nakaženi 0,25 ml suspenze obsahující cca 15 tkáňových cyst na 1 myš.

3.3.4. Připouštění myší

Pokus V

Nakažení samci ze skupin V♂♂1 a V♂♂2 byli dva dny ponecháni v normálním režimu pro rozvoj infekce. 3. den započal experiment sledující možný pohlavní přenos *T. gondii*. Ke každému samci byly připuštěny 3 samice ze skupiny V♀♀.

U skupin V♂♂1 a V♀♀1 připuštění trvalo 20 minut za dozoru experimentátorů. Opakovalo se od 3. do 6. dne. Tedy celkem čtyřikrát. Myši V♂♂1 byly poté utraceny a vypitvány.

U skupin V♂♂2 a V♀♀2 byly myši připuštěny na 5 dnů a každý den byly kontrolovány, zda mezi nimi nedošlo ke konfliktům a k případným zraněním, které by mohly vést k jinému přenosu infekci než kopulací. Jakmile se u nich projeví příznaky těžké toxoplasmózy přecházející do naprosté apatie, nejpozději však 7. den po infekci, tak byli samci V♂♂2 utraceni. U samic byl i po oddělení samců sledován jejich klinický stav, především možné příznaky akutní toxoplasmózy a/nebo gravidity. Samicím V♀♀2 byla po měsíci odebrána krev k určení protilátek proti toxoplasmě.

Pokus C

Klinický stav samců C♂♂ byl po podání infekční dávky průběžně monitorován po dobu 40 dnů. Sledované myši byly pravidelně váženy každý 5. den. Byly také sledovány příznaky nástupu a posléze i ústupu akutní toxoplasmózy. 40. den po infekci byla samcům C♂♂ odebrána krev k určení protilátek proti toxoplasmě tak, aby se ověřilo přenesení infekce.

Po 90. dnech od podání infekční dávky byli k samcům C♂♂, u nichž prokazatelně došlo k přenesení infekce (potvrzeno sérologicky), připuštěny samice C♀♀. Ke každému samci byly na dobu 5 dnů připuštěny 3 samice. Myši byly po dobu připuštění každý den kontrolovány, zda mezi nimi nedošlo ke konfliktům a k případným zraněním, které by mohly vést k jinému přenosu infekci než kopulací. Po uplynutí 5 dnů připuštění byli samci odděleni

od samic. Přípuštění samic k samcům se pak ve stejném formátu opakovalo ještě 3x (celkem tedy 4x 5denní přípuštění). Na samicích pak byly sledovány příznaky toxoplasmózy či gravidity. Monitorovány byly také případné porody.

3.4. Zpracování materiálu

3.4.1. Odběr krve myším

V souladu se schváleným projektem pokusu byly myši při odběru krve v narkóze isofluranem. Krev byla odebírána v objemu 100-300 μ l sterilní skleněnou Pasteurovou pipetou z orbitálního sinu. Z pipety byla následně přenesena do Eppendorfových zkumavek, které byly označeny pro další použití.

3.4.2. Komplement fixační reakce

Odebraná krev byla zcentrifugována, aby se oddělily krevní elementy od séra. Sérum poté bylo přepipetováno do čistých Eppendorfových zkumavek a využito na serologické vyšetření. Pro detekci specifických IgG protilátek proti antigenu *T. gondii* v myších sérech byla použita metoda komplement fixační reakce (KFR).

Jde o běžně používanou i dostatečně otestovanou metodu v Národní referenční laboratoři pro toxoplasmózu ve Státním zdravotním ústavu. KFR byla prováděna na mikrotitrační destičce s 96 jamkami. K testovaným vzorkům byla vždy přidána pozitivní a negativní kontrola.

Použité chemikálie: Veronalový pufr (byly jím ředěny všechny používané ingredience, beranní krvinky (2,8 % koncentrace ve veronalovém pufru, stanovena fotometrem), hemolysin, antigen (bylo použito ředění udávané výrobcem), komplement

Postup:

1. den

- Inaktivace séra – sérum bylo inkubováno 45 minut ve vodní lázni o teplotě 56 °C.
- Do všech jamek bylo nakapáno 0,025 ml veronalového pufru. Do 1. jamky bylo přidáno 0,025 ml vyšetřovaného séra a stejný objem byl přenesen na horizontálně vedlejší jamku, ředěno tak bylo dvojkovou řadou od 1:2 po 1:4096

- První jamka 1:2 sloužila jako pomocné ředění. Z následující jamky 1:4 bylo uděláno ředění 1:8 přidáním 0,025 ml veronalového pufru, objem byl promísen a následně bylo odebráno 0,025 ml. Poté bylo přidáno 0,025 ml veronalového pufru místo antigenu, takže tato jamka sloužila jako kontrola antikomplementarity vyšetřovaného séra.

- Do všech jamek od ředění 1:8 bylo přidáno 0,025 ml antigenu v ředění uvedeném výrobcem. Dále bylo přidáno do všech jamek 0,050 ml komplementu. Mikrotitrační destička byla protřepána na třepačce 30 vteřin a byla dána přes noc do lednice do vlhké komůrky.

- Příprava kontrol – do reakce bylo přidáno známé negativní a pozitivní sérum obdobně jako u séra vyšetřovaného. Kromě toho byla přidána kontrola antigenu (KA), komplementu (KC) a hemolytického systému (KHS), a to u každého na 2 jamky.

KA: 0,025 ml veronalového pufru + 0,025 ml antigenu + 0,050 ml komplementu

KC: 0,050 ml veronalového pufru + 0,050 ml komplementu

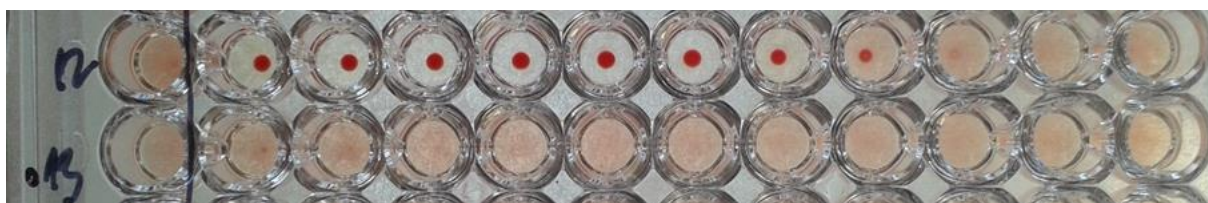
KHS: 0.1 ml veronalového pufru

2. den

- Příprava hemolytického systému – hemolytický systém byl připraven smícháním 2,8% suspenze krvinek a příslušného ředění hemolysinu stejným dílem. Vždy byl přidán hemolysin do krvinek, ne naopak. Dále byla směs dána k senzibilizaci – inkubace 30 minut ve vodní lázni o teplotě 37°C. Každých 10 minut byla směs lehce promíchána.

- Hemolytický systém byl nakapán do všech jamek včetně kontrol po 0,025 ml, výsledný objem byl protřepán cca minutu na třepačce a vložen do vlhké komůrky termostatu, kde se inkuboval 30 minut při teplotě 37°C. Poté byla destička znovu asi 30 vteřin protřepána na třepačce a byla znovu inkubována 30 minut při 37°C. Po skončení inkubace byla reakce zastavena přendáním destičky do vlhké komůrky v lednici. Výsledky byl odečten za 2 hodiny.

- Krvinky usazené na dně jamky značily pozitivní výsledek. Pokud došlo k lyzi krvinek, tak bylo sérum negativní. Nejvyšší ředění vzorku, ve kterém dává ještě pozitivní výsledek, se udává jako výsledný titr. Viz **obr. 6**.



Obr. 6. Komplement fixační reakce. Nahoře reakce číslo 12 s pozitivním výsledkem (titr 1:256), dole reakce číslo 13 s negativním výsledkem.

3.4.3. Usmrcení a pitva

Dle schváleného projektu pokusu byli po ukončení experimentů samci skupin V♂♂1, V♂♂2 a C♂♂ utraceni stržením vazů. Mrtvá myš byla poté připevněna k podložce připínáčky na všech končetinách ventrální stranou těla vzhůru. Pitva a další zpracování vzorků bylo provedeno na myších skupin V♂♂1 a C♂♂.

Pitva začala otevřením břišní dutiny. Rozstřižená kůže byla připevněna připínáčky k podložce. Rozstřižena byla posléze i pobříšnice, čímž se otevřel přístup k orgánům. Vzorky z nich byly vyjmuty v následujícím pořadí: slezina, játra, ledvina, semenné vāčky (*vesiculae seminales*), *cauda epididymis*, nadvarle a varle. Posléze byla odstraněna část žeber a vyjmut vzorek plic. Závěrem pitvy byla provedena dekapitace, otevření lebky a vyjmutí vzorku mozku.

Pokud to bylo možné, tak byly z každého orgánu odebrány 2 vzorky. Zvláštní důraz byl kladen na pohlavní orgány – z každé části pohlavního systému byly u každé z myší odebrány, pokud to bylo možné, 4 vzorky (po 2 z každé strany).

Vzorky odebrané z jednotlivých orgánů byly umístěny do označených Eppendorfových zkumavek a zváženy na analytických vahách. Při pitvě byly mezi odběrem jednotlivých orgánů použity sterilní nástroje.

3.4.4. Izolace DNA

Z tkání orgánů z pitvy byl odebrán vzorek o požadované hmotnosti – slezina do 15 mg, ostatní tkáň do 30 mg. Mezi jednotlivými vzorky byly nástroje vždy sterilizovány omytím v 96% etanolu a opálením v plameni kahanu.

Vzorky byly zváženy a následně z nich byla vyizolována DNA pomocí DNeasy Blood & Tissue Kitu (QIAGEN, kat. číslo 69506). Postup izolace probíhal dle protokolu výrobce. DNA byla finálně eluována do objemu 200 μ l.

3.4.5. Real-time PCR

Pro detekci DNA *T. gondii* bylo použito kvantitativní real-time PCR SAG1 genu dle Yu et al. (2013). Pro amplifikaci byl použit kit LightCycler Fast Start DNA Master SYBR GREEN I

(ROCHE, kat. číslo 03 003 230 001). Sekvence použitých primerů byla 5'CTGATGTCGTTCTTGCGATGTGGC3' a 5'GTGAAGTGGTTCTCCGTCGGTGT3'. Použity byly pro amplifikaci 128 bp dlouhého fragmentu SAG1 genu. Testováním byla zjištěna optimální koncentrace primerů i MgCl₂. Finální složení amplifikační směsi pro 1 reakci bylo následující:

SYBR GREEN	2 µl
Primer Forward (10 mM)	1,2 µl
Primer Reverse (10 mM)	1,2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 µl
H ₂ O	11,4 µl
Templát	3 µl
Celkem	20 µl

Používán byl přístroj LightCycler 1.5 (ROCHE). Program byl zvolen dle dostupných protokolů následujícím způsobem:

- **Preinkubace:** 95 °C, 10 minut

- **Amplifikace:**

- Denaturace: 95 °C, 5 vteřin
- Annealing: 60 °C, 10 vteřin
- Syntéza DNA: 72 °C, 10 vteřin

Výše uvedený cyklus amplifikace se opakoval celkově 40x.

- **Melting:** 60-95 °C, 6 minut

Počítačový program lightcycleru po skončení amplifikace uvedl data o pozitivitě/negativitě vzorku. V případě pozitivních vzorků uvedl software přístroje i údaj o počtu kopií genu na µl. Ve výsledcích je uveden počet kopií genu na mg vyšetřované tkáně, který byl z výše uvedeného údaje vypočten dle následujícího vzorce:

$$\text{počet kopií genu/mg} = \frac{\text{počet kopií genu/}\mu\text{l} \times 200}{\text{hmotnost vzorku (mg)}}$$

Jako pozitivní kontrola byl používán zaklonovaný linearizovaný qPCR standard o sekvenci CTGATGTCGTTCTTGCGATGTGGCGTTATGGCATCGGATCCCCCTCTTGTTGCCAA TCAAGTTGTCACCTGCCAGATAAAAAATCGACAGCCGCGGTCATTCTCACACCG ACGGAGAACCACTTCAC o původní koncentraci 10^7 kopií genu/ μ l.

3.4.6. Přečištění a koncentrace DNA

K přečištění PCR produktů byl použit High Pure PCR Product Purification Kit (ROCHE, kat. číslo 11732668001). Postupováno bylo dle přiloženého protokolu výrobce. Koncentrace DNA byla změřena na přístroji NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

3.4.7. Sekvenace DNA

Přečištěné PCR produkty byly sekvenovány Sangerovou metodou v sekvenační laboratoři Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Objem reakce na sekvenaci byl 8 μ l. Reakce obsahovala 5-10 ng PCR produktu na 100 bp jeho délky a 5 μ l 1 μ M primerů. Zbytek objemu byl doplněn vodou PCR kvality. Sekvence byla porovnána v BLASTU (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.5. Statistické vyhodnocení výsledků

Data byla statisticky analyzována v programu Stata 14.1 (StataCorp LP, College Station, TX). Použita byla metoda lineární regrese s náhodnými efekty s následným srovnáním orgánů po dvojicích. Tato metoda umožňuje srovnat náhodnou variabilitu i na jiných úrovních než pro jednotlivá pozorování a je vhodná k analýze dat, ve kterých nejsou jednotlivá pozorování úplně nezávislá (různé orgány z totožné myši). Ke korekci mnohonásobného srovnávání byla použita Šidákova metoda.

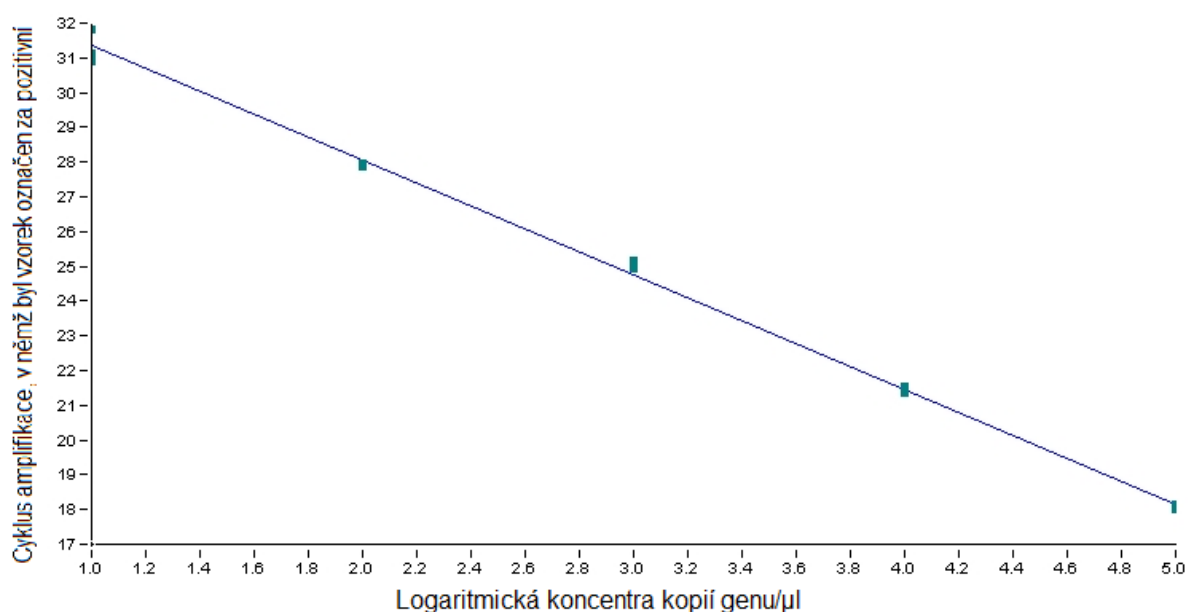
Za statisticky významné byly při mnohonásobném srovnávání považovány hodnoty $P \leq 0,05$. Spojitá data jsou prezentována ve formě geometrických průměrů (u negativních výsledků byla použita hodnota 1 místo 0), kategoriální data jsou prezentována ve formě počtů a procent.

4. Výsledky

4.1. Real-time PCR

V rámci práce bylo v laboratoři zavedeno a otestováno nové real-time PCR. Specifita výsledných produktů byla otestována sekvenací. Kalibrační křivka – viz **graf 1** – byla sestavena pro vzorky pozitivního standardu v původní koncentraci 10^5 a následných ředěních 10^4 , 10^3 , 10^2 a 10^1 . Dostatečnou sensitivitu metody dokumentuje fakt, že žádný z pozitivně testovaných vzorků nepřekonal hranici positivity později než ve 29. cyklu.

Graf č. 1. Kalibrační křivka real-time PCR. Udává přesnost měření závislosti cyklu amplifikace, v němž byl vzorek označen za pozitivní, na logaritmické koncentraci kopií genu/ μ l ve vzorku.



4.2. Monitorování klinického stavu myší

Pokus V

Infekce se na samcích skupiny V♂♂2 postupně projevila od 3. - 4. dne po infekci (dále jen p. i.) naježením srsti a nahrbením. Od 5. - 6. dne p. i. navíc výrazně klesala pohyblivost a narůstala apatie. 7. den p. i. byli samci utraceni.

Při připuštění samic nedošlo ke konfliktům, které by měly za následek krvavé zranění, jež by mohlo zapříčinit jiný přenos toxoplazmy než při kopulaci. Zaznamenána byla i pohlavní aktivita. Po skončení připuštění byly samice sledovány a pravidelně jim byla měřena hmotnost pro zachycení známek počínající toxoplasmózy nebo začínající gravidity. Ani jedno z toho nebylo pozorováno.

Pokus C

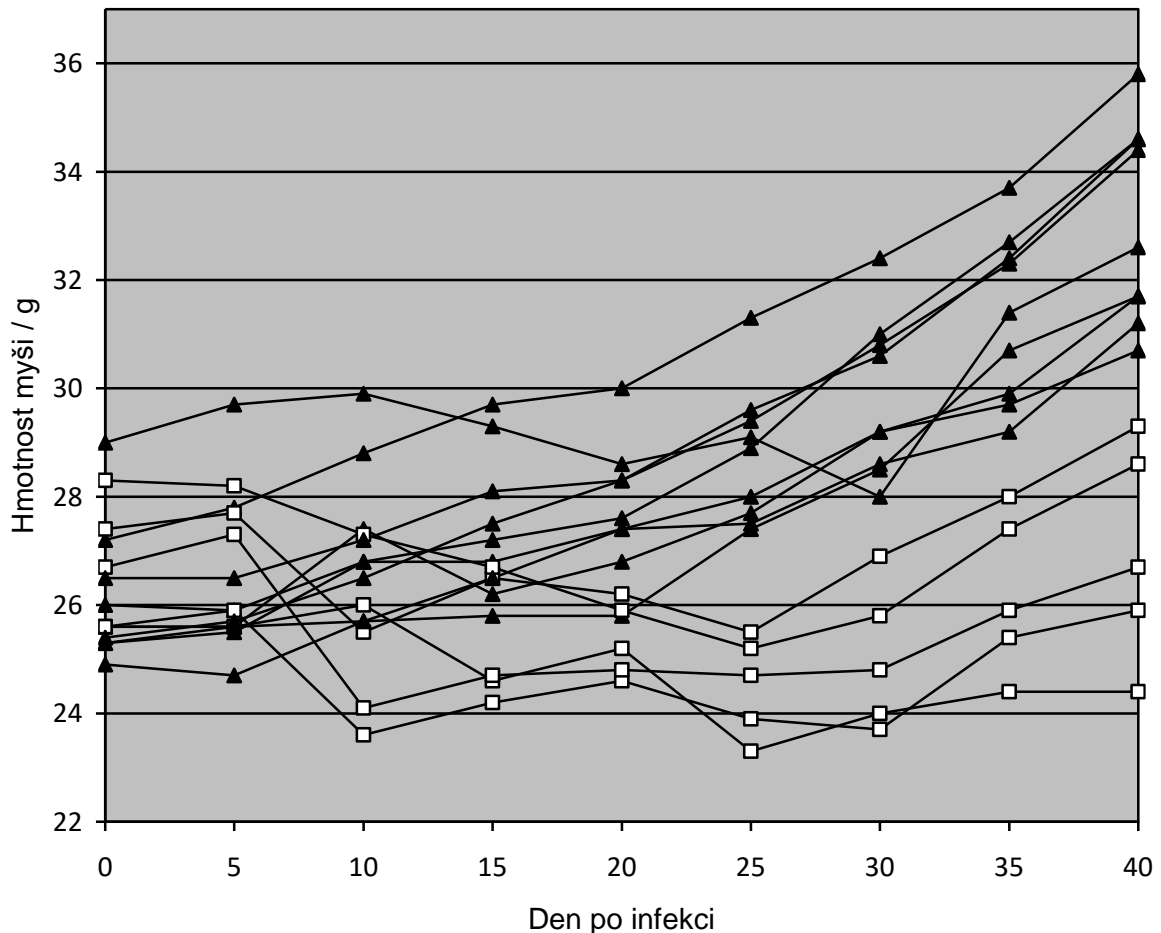
Od konce 2. týdne p. i. se na 5 samcích skupiny C♂♂ objevovaly příznaky akutní toxoplasmózy – především naježení srsti a nahrbení. Po 4. týdnu p. i. tyto příznaky vymizely.

40. den p. i. byla samcům C♂♂ odebrána krev, která byla vyšetřena na antitoxoplasmické protilátky pomocí KFR. K dalším experimentům bylo vybráno celkem 5 samců, u kterých byl titer protilátek roven nebo vyšší než 1:256. Ostatní myši z této skupiny byly z dalších pokusů vyřazeny.

Samcům skupiny C♂♂ byla pravidelně měřena hmotnost, která je markerem pro fázi infekce. Zatímco v akutní fázi onemocnění klesá, tak po přechodu do latentní fáze zase stoupá, i když u některých zvířat zůstává nižší než u neinfikovaných jedinců.

V souladu s výše uvedenými poznatky, samci s titry antitoxoplasmických protilátek 1:256 a vyššími ztratili v důsledku akutní toxoplasmózy na hmotnosti. Po překonání akutní fáze onemocnění začala s přechodem do latentní fáze hmotnost těchto samců zase narůstat. U samců bez titrů antitoxoplasmických protilátek či s titry nižšími než 1:256 byl sledován nižší, nebo žádný úbytek na hmotnosti. Výsledky také dokládají, že samci, u nichž se infekce rozvinula, byli připuštěni až po překonání akutní fáze, viz **graf 2**.

Graf č. 2. Vývoj hmotnosti samců myši skupiny C♂♂ v čase ode dne podání infekční dávky. Bílým čtvercem je označena hmotnost jedinců s titrem antitoxoplasmických protilátek 1:256 a vyšším, černým trojúhelníkem je označena hmotnost jedinců bez protilátek proti toxopasmě, nebo s titrem antitoxoplasmických protilátek nižším než 1:256.



Pravidelné kontroly nezjistily žádný případ zranění, jež by mohlo zapříčinit jiný přenos toxoplasmy než při kopulaci. Zaznamenána byla i pohlavní aktivita. Samicím byla po připuštění pravidelně měřena hmotnost. U některých byl zaznamenán její nárůst v důsledku gravidity. Celkově zabřezly 4 samice, které celkem vrhly 24 mláďat. Gravidita samic potvrzuje sexuální kontakt s nakaženými samci.

Při připuštění samic nedošlo ke konfliktům, které by měly za následek krvavé zranění, jež by mohlo zapříčinit jiný přenos toxoplasmy než při kopulaci.

4.3. Pokus V – pohlavní přenos od samců v akutní fázi toxoplasmózy

Při připuštění myší skupin V♂♂1 a V♀♀1 byla v krátkém intervalu sledování zaznamenána pohlavní aktivita samců, kvůli nezájmu samic se však pokusy o páření nezdařily. Při pozměněné metodice na skupinách V♂♂2 a V♀♀2 probíhaly případné pohlavní aktivity mimo zraky experimentátorů.

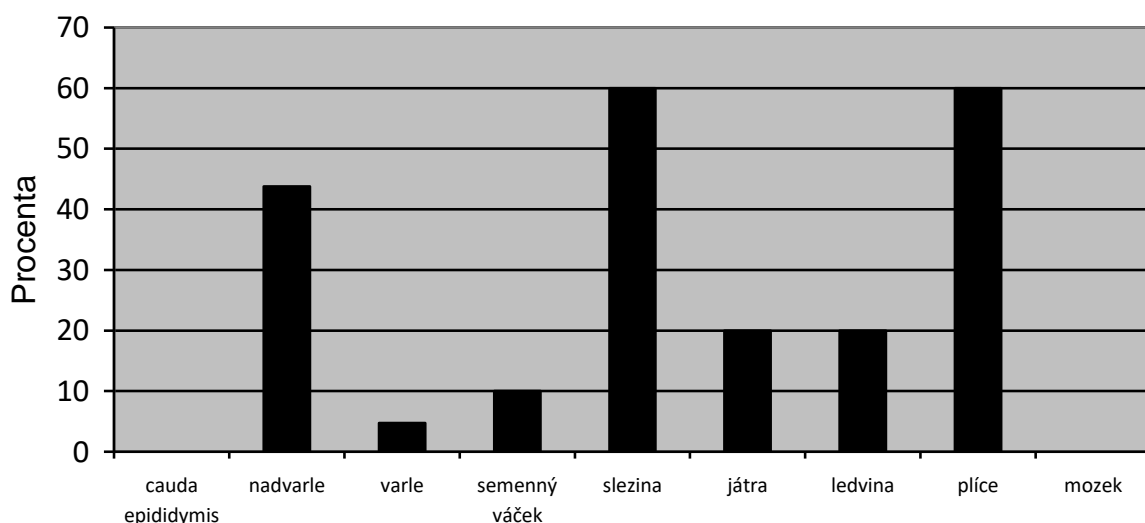
Žádná ze samic V♀♀1 ani V♀♀2 nejevila po připouštění infikovaného samce známky infekce toxoplasmou (naježení srsti, nahrbení, snížení pohyblivosti, postupující apatie). Samicím byla po měsíci od ukončení páření odebrána krev pro vyšetření na antitoxoplasmické protilátky pomocí KFR. Krev všech samic byla negativní.

4.4. Pokus V – lokalizace v hostiteli, afinita k tkáním při akutní toxoplasmóze

4.4.1. Procentuální zastoupení pozitivních orgánů při akutní toxoplasmóze

Co se týče souhrnných dat, tak se DNA *T. gondii* našla ve 26 ze 126 vyšetřovaných vzorků orgánů myších samců V♂♂1. To činí 20,6 % pozitivních vzorků. U každé z testovaných myší byl nalezen alespoň 1 pozitivní vzorek. U pohlavních orgánů bylo pozitivních 10 ze 76 vzorků, což činí 13,2 %. U nepohlavních orgánů bylo pozitivních 16 z 50 vzorků, což činí 32 %. Srovnání procentuálního zastoupení pozitivních vzorků u jednotlivých orgánů je vidět na následujícím grafu.

Graf č. 3. Srovnání procentuálního zastoupení pozitivních vzorků u jednotlivých orgánů myší V♂♂1.



4.4.2. Porovnání množství DNA *T. gondii* v hostitelských orgánech při akutní toxoplasmóze

Geometrický průměr

V **tabulce 1** a **grafu 4** je zaznamenán geometrický průměr počtu kopií sledovaného genu na mg tkáně u odebraných orgánů jednotlivých myši skupiny V♂♂1. Geometrický průměr byl zvolen jako vhodnější v důsledku asymetrického rozložení hodnot dat. Kvůli použití geometrického průměru, který nepracuje s nulou, byla u negativních vzorků použita cifra 1.

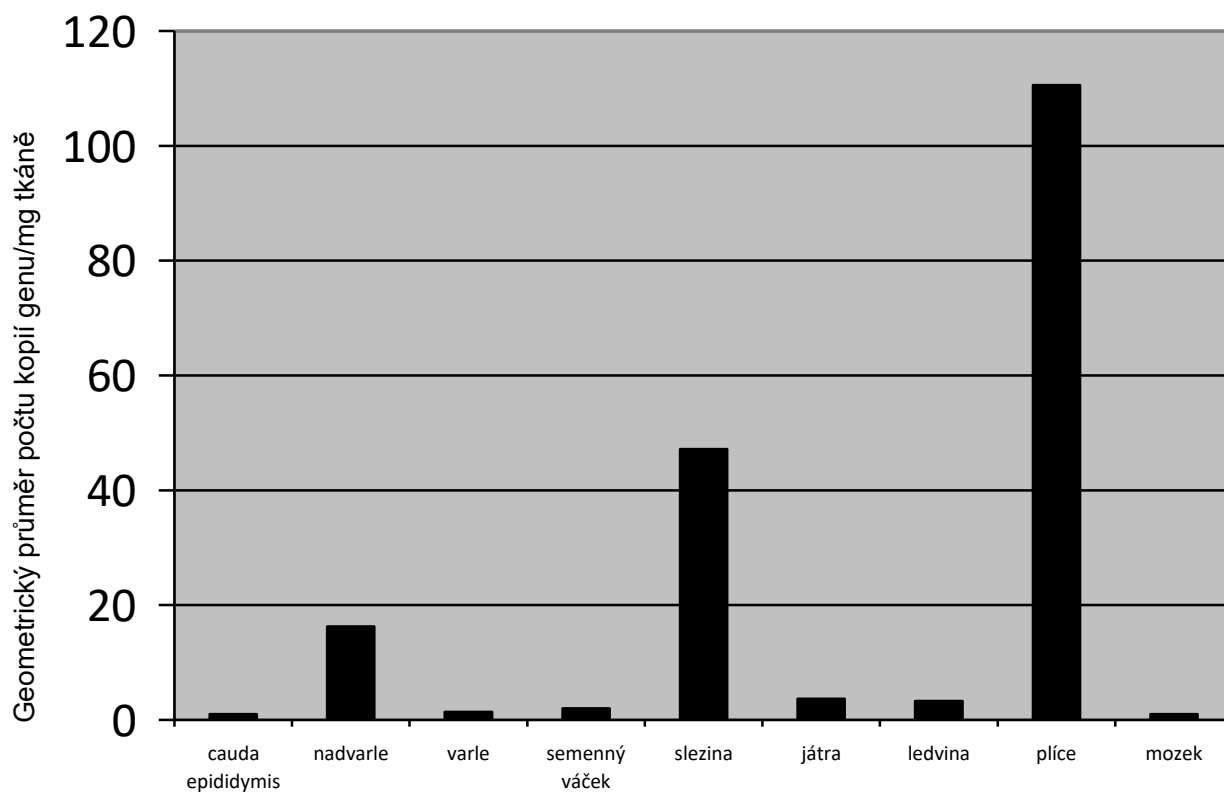
Počty odebraných orgánů se u některých jedinců mírně liší. Důvodem je prorůstání tukové tkáně zejména pohlavní soustavou. Pokud jsme si nebyli jisti původem odebraného orgánu, tak jsme vzorek neodebírali.

Tabulka č. 1. Geometrický průměr počtu kopií genu na mg tkáně u jednotlivých orgánů myši skupiny V♂♂1.

Myš	<i>Cauda epididymis</i> (4 vzorky/myš)	Nadvarle (4 vzorky/myš)	Varle (4 vzorky/myš)	Semenný váček (4 vzorky/myš)	Slezina (2 vzorky/myš)	Játra (2 vzorky/myš)	Ledvina (2 vzorky/myš)	Plíce (2 vzorky/myš)	Mozek (2 vzorky/myš)
1	1,0	152,6**	1,0	1,0	597,9	691,4	12,9	966,4	1,0
2	1,0*	109,7	1,0***	29,3	557,7	1,0	29,1	6654,1	1,0
3	1,0	51,5	5,7	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
4	1,0	1,0**	1,0	1,0	33,2	1,0	1,0	1,0	1,0
5	1,0	1,0	1,0	1,0	21,2	1,0	1,0	2576,0	1,0
Celkový geometrický průměr	1,0	16,3	1,4	2,0	47,2	3,7	3,3	110,6	1,0

* 3 vzorky, ** 2 vzorky, *** 5 vzorků

Graf č. 4. Celkový geometrický průměr počtu kopií genu na mg tkáně u jednotlivých orgánů myši skupiny V♂♂1.



Statistické srovnání geometrických průměrů všech orgánů mezi sebou

Celkové geometrické průměry počtu kopií genu na mg tkáně všech orgánů byly o dvojicích porovnány, zda mezi nimi jsou statisticky signifikantní rozdíly. Pro korekci vícenásobného porovnávání byla použita Šidákova metoda. Výsledky jsou uvedeny v následující **tabulce 2**.

Tabulka č. 2. *Vzájemné porovnání celkových geometrických průměrů počtu kopií genu na mg tkáně u jednotlivých orgánů myši skupiny V^{♂♂}1. Uvedeným číslem je hodnota p. Statisticky významné výsledky jsou zvýrazněny tučně.*

	<i>cauda epididymis</i>	nadvarle	varle	semenný váček	slezina	játra	ledvina	plíce	mozek
<i>cauda epididymis</i>		0,018	1,000	1,000	0,001	0,998	1,000	<0,001	1,000
nadvarle	0,018		0,040	0,214	1,000	0,987	0,963	0,751	0,075
varle	1,000	0,040		1,000	0,002	1,000	1,000	<0,001	1,000
semenný váček	1,000	0,214	1,000		0,013	1,000	1,000	<0,001	1,000
slezina	0,001	1,000	0,002	0,013		0,384	0,292	1,000	0,005
játra	0,998	0,987	1,000	1,000	0,384		1,000	0,034	0,999
ledvina	1,000	0,963	1,000	1,000	0,292	1,000		0,022	1,000
plíce	<0,001	0,751	<0,001	<0,001	1,000	0,034	0,022		<0,001
mozek	1,000	0,075	1,000	1,000	0,005	0,999	1,000	<0,001	

Statisticky se od ostatních odlišují zejména plíce a poté slezina, v některých případech i nadvarle. Statistický program rozdělil orgány do čtyř skupin, které si jsou z hlediska výsledků blízké. Orgán na pomezí dvou sousedních skupin je zařazen do obou. Pro zpřehlednění jsou podtrženy orgány pohlavní soustavy.

SKUPINA A (nejméně nakažené): cauda epididymis, varle, semenný váček, játra, ledvina, mozek

SKUPINA B (méně nakažené): játra, ledvina, nadvarle

SKUPINA C (více nakažené): nadvarle, slezina

SKUPINA D (nejvíce nakažené): slezina, plíce

Statistické srovnání geometrických průměrů skupiny pohlavních orgánů se skupinou orgánů nepohlavních

Na základě celkových geometrických průměrů pro jednotlivé typy orgánů bylo také provedeno srovnání souhrnné skupiny pohlavních orgánů se skupinou orgánů nepohlavních v akutní fázi infekce. Nepohlavní orgány byly promořeny infekcí více, výsledek byl statisticky významný ($P = 0,005$).

Statistické srovnání geometrických průměrů pohlavních orgánů mezi sebou

Stejným způsobem jako v předcházejícím případě byly mezi sebou po dvojicích porovnány geometrické průměry počtu kopií genu na mg tkáně všech myší V♂♂1, ale tentokrát jen u pohlavních orgánů, aby korekce pro mnohonásobné testování nebyla tak výrazná a neztratil se v ní slabší efekt. Výsledky jsou zaznamenány v následující **tabulce č. 3**.

Tabulka č. 3. *Vzájemné porovnání celkových geometrických průměrů počtu kopií genu na mg tkáně u jednotlivých pohlavních orgánů myší skupiny V♂♂1. Uvedeným číslem je hodnota p. Statisticky významné výsledky jsou zvýrazněny tučně.*

	<i>cauda epididymis</i>	nadvarle	varle	semenný váček
<i>cauda epididymis</i>		<0,001	0,999	0,895
nadvarle	<0,001		0,001	0,012
varle	0,999	0,001		0,991
semenný váček	0,895	0,012	0,991	

Je zřejmé, že od zbylých tří pohlavních orgánů se v tomto případě statisticky signifikantně odlišuje celkový geometrický průměr nadvarlete, což potvrdil i software v rozdělení orgánů do skupin dle stupně nakažení:

SKUPINA A (méně nakažené): *cauda epididymis*, varle, semenný váček

SKUPINA B (více nakažené): nadvarle

4.5. Pokus C – pohlavní přenos

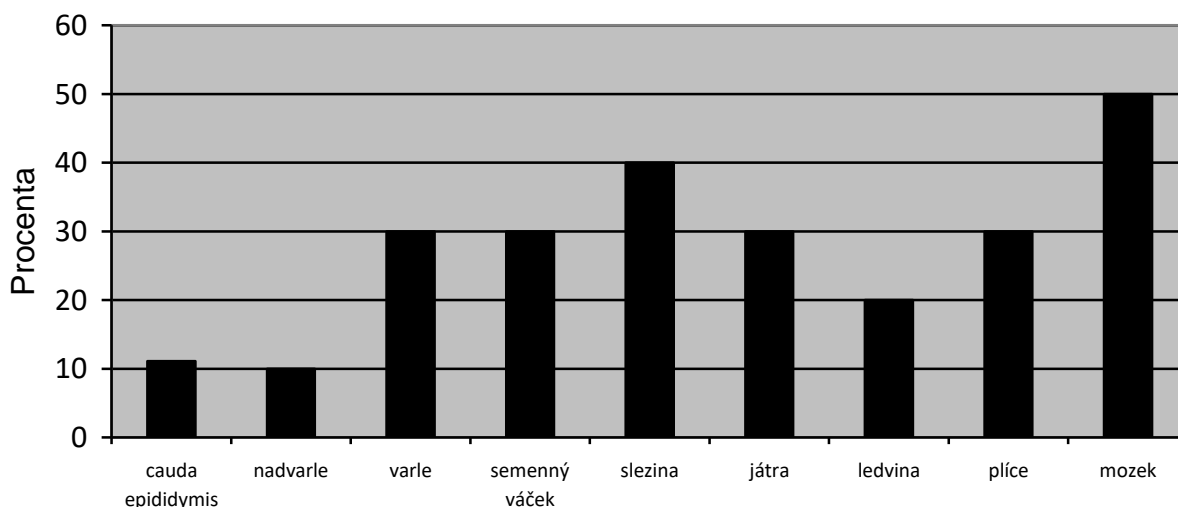
Žádná ze samic nejevila po žádném ze čtyř cyklů pětidenního páření známky infekce toxoplasmou (naježení srsti, nahrbení, snížení pohyblivosti, postupující apatie). Samicím byla po měsíci od ukončení posledního páření odebrána krev pro vyšetření na antitoxoplasmické protilátky pomocí KFR. Krev všech samic byla negativní.

4.6. Pokus C – lokalizace v hostiteli, afinita k tkáním

4.6.1. Procentuální zastoupení pozitivních orgánů při latentní toxoplasmóze

DNA *T. gondii* byla nalezena ve 26 z 98 vyšetřovaných vzorků orgánů myších samců. To činí 26,5 % pozitivních vzorků. Počty pozitivních vzorků se mezi jednotlivými jedinci výrazně lišily. U 2 myši nebyly dokonce nalezeny žádné pozitivní vzorky. U pohlavních orgánů bylo pozitivních 9 ze 48 vzorků, což činí 18,8 %. U nepohlavních orgánů bylo pozitivních 17 z 50 vzorků, což činí 34 %. Srovnání procentuálního zastoupení pozitivních vzorků u jednotlivých orgánů je vidět na následujícím **grafu 5**.

Graf č. 5. Srovnání procentuálního zastoupení pozitivních vzorků u jednotlivých orgánů myši C♂♂.



4.6.2. Porovnání množství DNA *T. gondii* v hostitelských orgánech při latentní toxoplasmóze

Geometrický průměr

V **tabulce 4** a **grafu 6** je zaznamenán geometrický průměr počtu kopií sledovaného genu na mg tkáně u odebraných orgánů jednotlivých myší skupiny C♂♂. Geometrický průměr byl zvolen jako vhodnější v důsledku asymetrického rozložení dat hodnot kopie fragmentu sledovaného genu na mg tkáně. Kvůli použití geometrického průměru, který nepracuje s nulou, byla u negativních vzorků použita cifra 1.

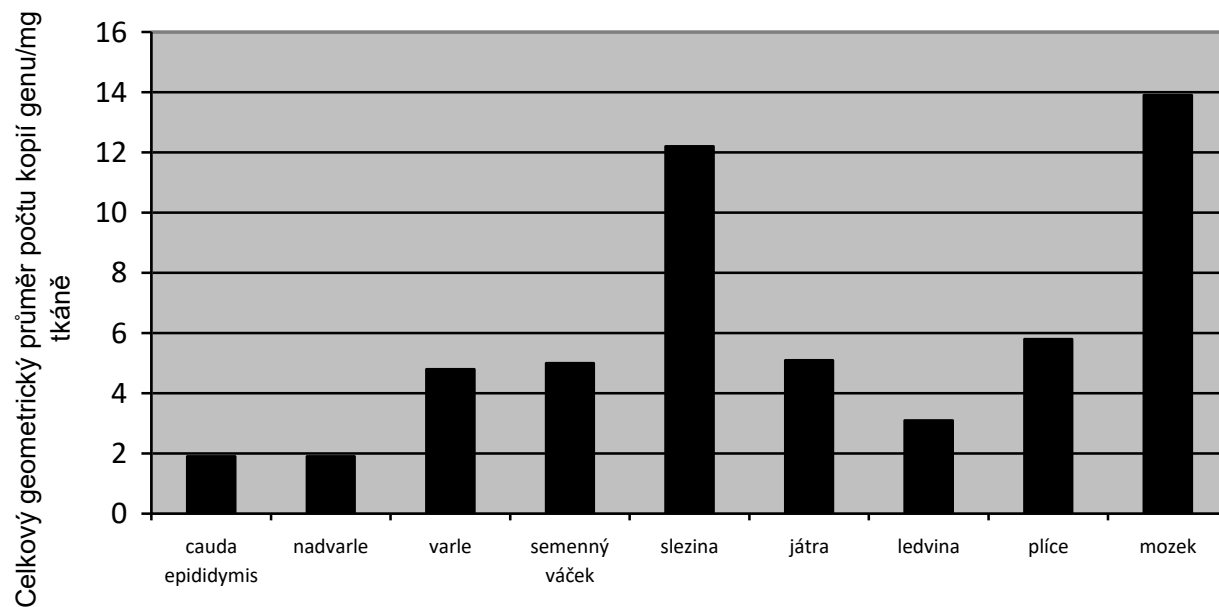
Počty odebraných orgánů se u některých jedinců mírně liší. Důvodem je prorůstání tukové tkáně zejména pohlavní soustavou. Pokud jsme si nebyli jisti původem odebraného orgánu, tak jsme vzorek neodebírali.

Tabulka č. 4. Geometrický průměr počtu kopií genu na mg tkáně u jednotlivých orgánů myší skupiny C♂♂.

Myš	<i>Cauda epididymis</i> (4 vzorky/myš)	Nadvarle (2 vzorky/myš)	Varle (2 vzorky/myš)	Semenný váček (2 vzorky/myš)	Slezina (2 vzorky/myš)	Játra (2 vzorky/myš)	Ledvina (2 vzorky/myš)	Plíce (2 vzorky/myš)	Mozek (2 vzorky/myš)
1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2	1,0	1,0*	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3	1,0	1,0	10,6	11,3	1,0	1,0	1,0	27,4	186,1
4	21,8	13,0	236,4	271,9	677,1	234,6	16,5	236,5	135,3
5	1,0	1,0*	1,0	1,0	392,8	14,1	17,5	1,0	20,8
Celkový geometrický průměr	1,9	1,9	4,8	5,0	12,2	5,1	3,1	5,8	13,9

* 1 vzorek

Graf č. 6. Celkový geometrický průměr počtu kopií genu na mg tkáně u jednotlivých orgánů myši skupiny C♂♂.



Statistické srovnání geometrických průměrů všech orgánů mezi sebou

Celkové geometrické průměry počtu kopií genu na mg tkáně všech orgánů byly porovnány ve dvojicích, zda mezi nimi jsou statisticky signifikantní rozdíly. Pro korekci vícenásobného porovnávání byla použita Šidákova metoda. Jak je vidět z výsledků uvedených v následující **tabulce 5**, tak mezi orgány nebyla zaznamenána statisticky významná odlišnost. V důsledku statisticky nevýznamných odlišností software zařadil všechny orgány do jedné skupiny z hlediska promořenosti infekcí. Statisticky významné rozdíly nebyly ani tehdy, když se porovnání provedlo jen pro pohlavní orgány.

Tabulka č. 5. *Vzájemné porovnání celkových geometrických průměrů počtu kopií genu na mg tkáně u jednotlivých orgánů myši skupiny C♂♂. Uvedeným číslem je hodnota P.*

	<i>cauda epididymis</i>	nadvarle	varle	semenný váček	slezina	játra	ledvina	plíce	mozek
<i>cauda epididymis</i>		1,000	0,999	0,998	0,255	0,998	1,000	0,985	0,152
nadvarle	1,000		1,000	1,000	0,727	1,000	1,000	1,000	0,582
varle	0,999	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
semenný váček	0,998	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
slezina	0,255	0,727	1,000	1,000		1,000	0,974	1,000	1,000
játra	0,998	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000
ledvina	1,000	1,000	1,000	1,000	0,974	1,000		1,000	0,920
plíce	0,985	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000
mozek	0,152	0,582	1,000	1,000	1,000	1,000	0,920	1,000	

Statistické srovnání geometrických průměrů skupiny pohlavních orgánů se skupinou orgánů nepohlavních

Na základě celkových geometrických průměrů pro jednotlivé typy orgánů bylo také provedeno srovnání souhrnné skupiny pohlavních orgánů se skupinou orgánů nepohlavních v latentní fázi infekce. Nepohlavní orgány byly promořeny infekcí více, výsledek byl statisticky významný (P = 0,016).

5. Diskuse

Možný sexuální přenos *Toxoplasma gondii* je v posledních letech až desetiletích hojně rozebírán v odborné literatuře, často i s protichůdnými argumenty. Na tuto dosud ne zcela uspokojivě objasněnou otázku se zaměřila tato práce se snahou přinést další data a informace.

S hypotetickým přenosem toxoplasmové infekce ze samce na samice se pojí celá řada otázek. První z nich je, zdali, podobně jako při kongenitální toxoplasmóze, by se mohl podařit pouze tehdy, probíhá-li v době páření u samce akutní toxoplasmóza, nebo jestli je možný přenos i při toxoplasmóze latentní. Experiment byl rozdělen na dvě linie – na přímý pokus testující pohlavní přenos parazita ze samců na samice a na podpůrný pokus hledající upřednostňovanou lokalizaci v těle hostitele. Obě linie experimentů byly navíc provedeny v obou fázích infekce – při akutní i latentní toxoplasmóze.

K experimentům byly zvoleny myši jakožto běžný laboratorní model, který je praktický svým snadným chovem. Konkrétně šlo o samce kmene C57Bl/6 a samice kmene BALB/c, na nichž byl minulosti prokázán kongenitální přenos toxoplasem. Ačkoliv jsou k infekci *Toxoplasma gondii* vnímavé všechny kmeny myší (Dubey, 2010), tak kmen C57Bl/6 je považován za zvláště citlivý. Počty toxoplasem v orgánech jsou relativně vysoké a doba jejich přetrvávání delší (Liesenfeld, 2002; Szabo et Finney, 2017). Lze tedy předpokládat, že myši samec tohoto kmene by mohl infekci snadněji přenést na samici.

Pro sledování akutní infekce byl použit virulentní kmen P-Cz. Infekční dávka tachyzoitů z kultury byla podána intraperitoneálně. Při infekci virulentním kmenem *Toxoplasma gondii* (genotyp I) i při naprosto minimální infekční dávce propukne během několika hodin akutní toxoplasmóza, které každá myš nejpozději do 7-10 dnů po infekci podlehne. Proto byla infekční dávka stanovena tak, aby byl nakažený samec schopen páření. Kdyby byla příliš velká, hrozilo by riziko, že by se vážné příznaky rozvinuly příliš brzy, samec by byl apatický, nejevil by o páření zájem a musel by být utracen. Samci by pak neměli tolik času k připuštění a teoretické zachycení možného sexuálního přenosu by bylo s menším počtem sexuálních styků nižší. Při příliš nízké dávce by nebyla záruka, že do každé myši bude vpraven alespoň

jeden tachyzoit, který si přes všechny manipulace se suspenzí zachoval životaschopnost, a že tak budou všechny myši infikovány.

Sexuální přenos v akutní fázi se zdá být teoreticky pravděpodobnější, my jsme však v naší práci pohlavní přenos během akutní toxoplasmózy nezaznamenali. Tyto výsledky jsou ve shodě s jedinou obdobnou prací Asgariho et al. (2015). Kolektiv autorů šírázské univerzity testoval možnost pohlavního přenosu jen s virulentním RH kmenem toxoplasmy. Hostitelským modelem byly myši vůči toxoplasmám rezistentnějšího kmene BALB/c, naše teoretická šance na případný pohlavní přenos s citlivějším kmenem C57/Bl/6 vyšší. Asgari et al. pak pokus se sexuálním přenosem prováděli na 4 nakažených samcích, kteří byli připuštěni k celkem 20 samicím po dobu 48 hodin. Počet zvířat v experimentu je srovnatelný s naší prací. Rozdílná je doba připouštění, která byla v našem případě více než dvojnásobná, což opět zvýšilo teoretickou možnost pohlavního přenosu.

Pro sledování možného přenosu toxoplasmózy v průběhu latentní fáze byli myši samci infikováni cystickým nevirulentním kmenem HIF (Kodym etl al., 2002). Byli nakaženi perorálně, což odpovídá přirozenému přenosu nákazy z prostředí kontaminovaného oocystami. Dávka byla stanovena na 15 cyst/myš. Důvodem byl omezený zdroj infekčního materiálu a obava, aby nebyla infekce u zvláště citlivých myších kmene C57/Bl/6 příliš silná a aby pokusní jedinci nezahynuli již v akutní fázi onemocnění. Zpětně se zdá, že infekční dávka mohla být v tomto případě vyšší. Dostatečně vysoké titry KFR, které zaručovaly, že daný jedinec se skutečně infikoval, mělo jen 5 jedinců. Zbylých 9 jedinců, kteří nebyli pro žádné nebo nízké titry antitoxoplasmických protilátek zařazeni do dalších experimentů, posloužilo alespoň pro kontrolu měření hmotnosti coby markeru infekce. Výsledky tohoto měření byly ve shodě s daty získanými pomocí KFR – u těchto myší toxoplasmóza nepropukla vůbec, nebo jen ve velmi lehké formě.

Připouštění samců bylo vícedenní a opakované, takže se zčásti eliminovaly potíže s načasováním estru samic a byly zaznamenány sexuální aktivity, což potvrdily i 4 porody. Přesto k přenosu infekce ze samce s latentní toxoplasmózou na samici nedošlo. I z literárních údajů se zdá, (i když fáze infekce kupodivu nebyla v centru zájmu všech autorů a některé

studie nejsou v tomto smyslu jednoznačné), že žádná ze zpráv o pohlavním přenosu toxoplasmózy se netýká latentní infekce. Možná jediné studie Dasse et al. (2011), která uvádí pozorování sexuálního přenosu toxoplasmy u laboratorních potkanů ve 4 ze 4 případů, se primárně zabývá behaviorální tematikou manipulační hypotézy a zmiňovaný sexuální přenos udává bez bližších podrobností a dostatečné metodiky. Tento údaj tak lze považovat za dosud ojedinělý a poněkud méně spolehlivý.

Teorie pohlavního přenosu *Toxoplasma gondii* ze samců na samice tak do dnešního dne stojí především na nálezů parazita ve spermatu (Liu et al., 2006; Moura et al., 2007; Scarpelli et al., 2009; Lopes et al., 2009; Santana et al., 2010; Asgari et al., 2015), přenosu při umělé inseminaci (Arantes et al., 2009) a nepřímých důkazech.

Samotná přítomnost toxoplasmy ve spermatu a potvrzení přenosu při umělé inseminaci ještě není důkazem přirozeného pohlavního přenosu. Záleží na tom, v jakém se zde parazit nachází stádiu, a zejména na jeho koncentraci ve spermatu. Lze se také domnívat, že objem uvolněného spermatu při pohlavním styku nemusí odpovídat množství tekutiny použité při umělé inseminaci. Otázkou je také schopnost parazita přežít a úspěšně kolonizovat pohlavní soustavu samice. U člověka se o přítomnosti toxoplasmy ve spermatu neví téměř nic. Existuje jen jediná studie, která je více než 45 let stará a byla publikovaná jen lokálně v německém jazyce (Disko et al., 1971).

Pokud by byla *Toxoplasma gondii* evolučně adaptována k pohlavnímu přenosu, tak by se dalo čekat její přednostní stahování do pohlavních orgánů a namnožování se v nich, aby se infekce mohla snáze vertikálně šířit v populaci – obdobně jako probíhá sexuální cyklus ve střevě kočky, jehož produktem jsou infekční oocysty (Dubey, 2010).

Abychom mohli případnou afinitu toxoplasem k samčím pohlavním orgánům potvrdit, sledovali jsme, zdali v nich lze toxoplasmy molekulárně-geneticky detekovat a případně i kvantifikovat. Pro srovnání jsme vyšetřili i některé „nepohlavní“ orgány a to jak v akutní, tak i v latentní fázi toxoplasmózy. Pro potřeby práce byla v laboratoři zavedena nová metoda real-time PCR dle Yu et al. (2013), která umožnila otestování požadovaného počtu vzorků s uspokojivou rychlostí i citlivostí. Specifita výsledných produktů pak byla ověřena pomocí

sekvenace. Navíc díky měření nárůstu DNA v reálném čase dokázala tato metoda přinést i výsledky o množství parazita, jenž se ve vyšetřované tkáni nacházel.

Při akutní toxoplasmóze se *Toxoplasma gondii* rozšířila téměř do všech orgánů – pohlavních i ostatních. Statisticky významně byly nejvíce zasaženy plíce a poté slezina. Nejde o překvapivé zjištění. Slezina plní v těle roli krevního filtru a právě s hematogenním rozsevem tachyzoitů je spojena akutní fáze toxoplasmózy. Plicní toxoplasmóza je pak dlouho známá (Pomeroy et Filice, 1992). Ke stejným výsledkům došel v obdobné práci, jako byla ta naše, i Kodym et al. (2002). Naopak v mozku a *cauda epididymis* pak nebyla zaznamenána DNA toxoplasem vůbec.

Vyšetřované orgány pohlavní soustavy (*cauda epididymis*, varle a semenný váček) byly na základě dat statisticky zařazeny do skupiny s nejnižším výskytem toxoplasmy. Výjimkou je jen nadvarle, které bylo statisticky významně více zasažené než ostatní pohlavní orgány. Při srovnání s nepohlavními orgány se ale statisticky významně neodlišovalo a co se týče průměrné promořenosti toxoplasmou, tak zaostalo za výše zmíněnými plícemi a slezinou. Z těchto našich dat lze ale navrhnout domněnku, že v minulosti pozorovaná toxoplasma ve spermatu experimentálně infikovaných zvířat s akutní toxoplasmózou se do semene může dostávat právě v této části pohlavní soustavy.

Naše výsledky potvrdily i často zmiňovanou velkou variabilitu mezi jednotlivými zvířaty při infekci toxoplasmou (Berenreiterová et al., 2011; Dubey et al., 2016). U akutní toxoplasmózy se našel alespoň 1 PCR pozitivní vzorek u každé z myší. Pozitivita vzorků u jednotlivých myší ale kolísala od 4,2 % do 38,5 %.

V latentní fázi infekce byla DNA toxoplasmy nalezena jen v orgánech 3 myší, přestože infekce prokazatelně proběhla u všech jedinců. Pokud jde o kvantitativní výsledky, byly počty kopií SAG-1 genu v orgánech nižší než tomu bylo ve fázi akutní. Při srovnávání jednotlivých orgánů nebyly patrné žádné statisticky významné rozdíly. Ty byly objeveny až při rozdělení orgánů do skupiny pohlavních a nepohlavních soustav. Opět vyšlo statisticky signifikantně, že jsou orgány nepohlavních soustav více zasažené toxoplasmovou infekcí než orgány soustavy pohlavní. Celkově bylo pozitivních 26,5 % vzorků. Znovu byla zaznamenána velká variabilita

mezi vzorky z jednotlivých zvířat. Pozitivita vzorků u jednotlivých myší tentokrát kolísala od 0 % (u 2 myší) až po 80 %. Navzdory velké variabilitě v pozitivě vzorků byly ale napadené orgány v latentní fázi infekce mnohem méně variabilní ve stupni promořenosti nákazou.

I tak ale bylo zaznamenáno, že se toxoplasma v této fázi onemocnění nejčastěji nacházela v mozku a poté ve slezině (byť výsledek nebyl statisticky významný). U mozkové lokalizace je viditelný rozdíl oproti akutní toxoplasmóze, ve které byly všechny vzorky mozku negativní. *Toxoplasma gondii* je známá svou neurotropní afinitou, v případě infekce virulentním kmenem, který organismus zabije v krátké době, však tachyzoiti zřejmě nestíhají prostoupit přes hematoencefalickou bariéru. *Toxoplasma gondii* byla v této fázi zaznamenána také ve všech orgánech pohlavní soustavy, byť jen ojediněle. Počty byly oproti nákaze nadvarlete v akutní fázi nižší.

Toxoplasma gondii se v latentní fázi nachází v těle v podobě tkáňových cyst s bradyzoity, u nichž se nedá úspěšné přenesení infekce v samičí pohlavní soustavě očekávat. Těžko si lze také u imunokompetentního jedince představit jejich přeměnu na tachyzoity a pomnožení do takového počtu, aby byli ve spermatu ve vyšší koncentraci. Nelze se tak divit, že na téma pohlavního přenosu v latentní fázi toxoplasmózy dosud nebyly provedeny žádné práce, a je logické, že se nejprve zkoumá výrazně nadějnější možnost pohlavního přenosu při akutní toxoplasmóze.

Na druhou stranu, přenos v akutní fázi by byl z epizootologického či epidemiologického hlediska méně závažný, neboť tato fáze trvá jen krátkou dobu (řádově několik týdnů) a postižený může trpět příznaky onemocnění, což může negativně ovlivnit jeho sexuální aktivitu. U latentní fáze je to naopak – pokud by se toxoplasma přenášela v tomto stadiu, tak by to bylo z epizootologického či epidemiologického hlediska jistě závažnější. Nicméně představa takového přenosu se zdá být mnohem méně pravděpodobná a při současných vědomostech o životě a cyklu parazita si ji lze jen těžko představit.

Celkově se dá říci, že námi získané výsledky nepodporují teorii pohlavního přenosu toxoplasmy z myších samců na samice. Při přímém pokusu přenos zaznamenán nebyl a i další podpůrná data hovoří o statisticky významně vyšším počtu toxoplasem v orgánech

nepohlavních soustav v porovnání se soustavou pohlavní. Teorii sexuálního přenosu sice nelze z námi získaných dat vyvrátit, lze ale usuzovat, že minimálně u myši není pohlavní přenos ze samců na samice běžným jevem.

V aktuální argumentaci o hypotetickém pohlavním přenosu toxoplasmózy z infikovaných mužů na ženy, (které vedle získání toxoplasmózy mohou i otěhotnt, čímž se otevře cesta kongenitální infekci), nehrají klíčovou roli výsledky laboratorních sledování, ale „nepřímé důkazy“ vyvozené z epidemiologických dat. Jeden z prvotních argumentů Flegra et al. (2014) hovoří o souvislosti možného pohlavního přenosu toxoplasmy u člověka s neobjasněným rizikovým faktorem u žen, u kterých došlo ke kongenitální toxoplasmóze. Když odhlédneme od faktu, že chybějící rizikový faktor nikterak přímo nesouvisí s možným pohlavním přenosem a může mít úplně jinou příčinu, tak je zajímavé podívat se blíže na kongenitální toxoplasmózu.

Kongenitální přenos *T. gondii* se liší podle země i let, nicméně se vždy pohybuje v promilích a tvoří jen statisticky (ale nikoliv lékařsky!) zanedbatelné množství získaných infekcí. Navzdory tomu je tento způsob přenosu znám dlouhá desetiletí a byl popsán na tisících případech z celého světa. Na základě toho lze vznést otázku, jak je možné, že by možný pohlavní přenos dosud očím odborné veřejnosti po dlouhá desetiletí unikal a že by se neprojevil na epidemiologických údajích a grafech. Možnou odpovědí je, že by se jednalo o zcela vzácný fenomén, který by ani v měřítku celosvětové promořenosti infekcí nehrál roli z epidemiologického hlediska.

Další nepřímý argument Flegra et al. (2014) uvádí korelaci prevalence toxoplasmózy u žen s výskytem sexuálně přenosných chorob. Společným rizikovým faktorem může být nechráněný pohlavní styk, stejně tak jím být ale nemusí a žádné přímé argumenty na podporu této domněnky nejsou. Dají se najít stovky příkladů vzájemných korelací, které spolu přitom ve skutečnosti vůbec nesouvisí. Korelace ještě neimplikuje společnou kauzalitu.

I další nepřímý důkaz vychází z premis, které jsou samy o sobě více než hypotetické: jde o argument s dřívějším propuknutím schizofrenie u predisponovaných jedinců u toxoplasma-positivních mužů než u toxoplasma-positivních žen. Je třeba skepticky podotknout, že přímá

spojitost toxoplasmózy s propuknutím a průběhem onemocnění schizofrenií dosud není uspokojivě prokázána a všobecně přijímána. Práce, které na tuto spojitost poukazují (Dogruman-Al et al., 2009; Alipour et al., 2011), byly provedeny na vzorku jen několika desítek lidí, což je pro dalekosáhlejší závěry zcela nedostatečný počet. Naopak práce Jírovce (1971) provedená intradermálním testem na 954 schizofrenicích a na počtu 1638 psychiatrických pacientů celkem došla k závěru, že toxoplasmóza nehraje při etiologii různých psychiatrických onemocnění prakticky žádnou roli. U pacientů byla zjištěna stejná nebo velmi podobná čísla pozitivivity jako u celkové promořenosti toxoplasmou u tehdejšího obyvatelstva.

Pátý nepřímý argument Flegra et al. (2014) na podporu pohlavního přenosu *T. gondii* ze samců na samice udává, že ve vyspělých zemích se za posledních 20 let snižuje prevalence toxoplasmózy. To je dáno do souvislosti se snížením promiskuity a bezpečným sexem v důsledku preventivních opatření v boji s pandemií AIDS. Otázkou ale je, nakolik jsou zmíněná opatření skutečně dodržována v praxi. Není pravda, že pohlavně přenosných infekcí ubývá, infekce virem HIV roste nejen u nás a poslední roky se dají považovat z hlediska nových případů nakažených za rekordní (Pazdiora, 2014). Opět pak chybí přímý důkaz souvislosti snižující se prevalence toxoplasmózy s preventivními opatřeními v boji s pandemií HIV/AIDS.

Obdobně hypotetickou validitu má argument založený na údajné pozitivní korelaci mezi pravděpodobností nákazy toxoplasmózou a počtem nechráněných pohlavních styků s otcem dítěte před otěhotněním. Znovu lze zopakovat, že korelace neznamena kauzalitu.

Za další nepřímý důkaz lze považovat i zvýšenou séropozitivitu na *T. gondii* u otců dětí s kongenitální toxoplasmózou (Contopoulos-Ioannidis et al., 2015). Výsledkům práce lze vytknout, že vzhledem k relativní vzácnosti kongenitální toxoplasmózy pracovala jen s desítkami případů, což je pro směrodatnější závěry příliš málo. Stejně tak si u tohoto příkladu lze představit i rizikový faktor (např. kontaminované prostředí bydliště), který by byl společný jak pro matky nakažených dětí, tak pro jejich otce, a který by s případným sexuálním stykem nesouvisel.

Když si shrneme výsledky této práce a zařadíme je do kontextu s odbornou literaturou, tak lze usoudit, že pohlavní přenos toxoplasmy u člověka z muže na ženu nelze považovat za příliš pravděpodobný. Stále chybí přímé důkazy byť jen o přítomnosti toxoplasmy v lidském spermatu. V naší práci jsme na laboratorních myších nepozorovali ani pohlavní přenos, ani afinitu *T. gondii* k pohlavním orgánům samčí reprodukční soustavy (naopak byla zaznamenána statisticky významná afinita k nepohlavním orgánům v obou fázích infekce). Přitom myš je vůči infekci toxoplasmou vnímavějším tvorem než člověk a teoretická možnost pohlavního přenosu ze samců na samice se u ní zdá být pravděpodobnější.

Hypoteticky může být pohlavní přenos u myši vzácným jevem, který se nám kvůli nízkému počtu pokusných zvířat nepodařilo prokázat. Pokud by tomu ale tak bylo, tak vztaženo na člověka by se takový přenos v případě akutní toxoplasmózy dal těžko považovat za epidemiologicky závažný. Akutní fáze onemocnění je krátká a u imunokompetentních jedinců trvá řádově několik týdnů, výjimečně několik málo měsíců. Při silnějších nákazách, kdy by teoretická možnost pohlavního přenosu byla vyšší, pak lze vznést pochybnost nad četností sexuálního styku u nemocného jedince s klinickými příznaky toxoplasmózy.

Důvodné pochybnosti pak lze vznést i nad nepřímými argumenty zastánců teorie pohlavního přenosu toxoplasmy. Často jde jen o vyplňování prázdných míst (které se projevují jako dosud neznámé rizikové faktory) sexuálním přenosem. Bližší důvody ke kauzalitě zmiňovaných korelací ale často chybí. Lze se podívat i nad tím, že by uvažovaný pohlavní přenos dosud unikál pohledu epidemiologů a neprojevil by se v jejich grafech a tabulkách. Stejně tak je podivné, že pohlavní přenos dosud nebyl potvrzen, když kongenitální toxoplasmóza, která je vzácná a podílí se jen na promilích nových infekcí, je známá dlouhá desetiletí a existuje u ní nespočet popsanych případů. Z těchto úvah a z výsledků mé práce vyvozují, že možný pohlavní přenos toxoplasmózy u člověka je nepravděpodobný. Pokud by skutečně existoval, tak by pravděpodobně šlo o velice vzácný a epidemiologicky nepřilíš závažný jev v akutní fázi onemocnění.

6. Závěr

Přímé otestování možnosti pohlavního přenosu toxoplasmy ze samců na samice na modelu laboratorních myší bylo provedené na dvou kmenech toxoplasmy – virulentním (P-Cz), při němž byla zvířata v akutní fázi onemocnění, a cystickým avirulentním (HIF) v latentní fázi infekce myší. Přenos tímto způsobem během studie zaznamenán nebyl ani u jednoho z kmenů.

Lokalizace toxoplasem ve tkáních hostitele se svou přítomností a množstvím lišila v jednotlivých fázích infekce. V akutní fázi byla patrná afinita k plicím a poté ke slezině, kde se toxoplasma nacházela ve statisticky signifikantně vyšším množství než v jiných vyšetřovaných orgánech. Naopak v mozku a *cauda epididymis* toxoplasmy nebyly zachyceny. *T. gondii* byla v této fázi infekce nalezena i v samčí pohlavní soustavě, zejména v nadvarleti. Zvláštní afinita k orgánům pohlavní soustavy ale potvrzena nebyla. Naopak byly infekcí statisticky významně více promořené orgány nepohlavních soustav. Předpoklad afinity toxoplasem k samčím pohlavním orgánům se při akutní infekci nepotvrdil.

Při latentní toxoplasmóze byla DNA toxoplasmy nalezena ve všech sledovaných orgánech, i těch pohlavních. Výraznější afinita k nějakému typu tkáně v tomto případě nebyla zaznamenána. Při srovnání skupiny pohlavních a nepohlavních orgánů ale byly opět statisticky významně více zasažené infekcí orgány nepohlavních soustav. Předpoklad afinity toxoplasem k samčím pohlavním orgánům se nepotvrdil ani při latentní infekci.

Výše uvedené výsledky nepodporují teorii pohlavního přenosu toxoplasmy z myších samců na samice. Teorii sexuálního přenosu sice nelze z námi získaných dat vyvrátit, lze ale usuzovat, že minimálně u myší není pohlavní přenos ze samců na samice běžným jevem.

Ve světle výsledků na laboratorním modelu, neexistence alespoň jedné kasuistiky a poměrně vágních nepřímých důkazů se pohlavní přenos toxoplasmózy z muže na ženu jeví jako nepravděpodobný. Pokud by se přeci jen ojedinělé případy vyskytly, rozhodně budou mít zanedbatelnou incidenci a nemohou se projevit v epidemiologických statistikách.

7. Seznam použité literatury

- Aigner, C. P., Silva, A. V., Sandrini, F., de Osório, P. S., Poiares, L., Largura, A. (2010). Real-time PCR-based quantification of *Toxoplasma gondii* in tissue samples of serologically positive outdoor chickens. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*; 105(7): 935-937.
- Arisue, N., Hashimoto, T. (2015). Phylogeny and evolution of apicoplasts and apicomplexan parasites. *Parasitol Int.* 64(3): 254-259.
- Aliberti, J. (2005). Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nature Reviews Immunology* 5: 162-170.
- Alipour, A., Shojaee, S., Mohebbali, M., Tehranidoost, M., Abdi Masoleh, F., Keshavarz, H. (2001). *Toxoplasma* Infection in Schizophrenia Patients: A Comparative Study with Control Group. *Iran J Parasitol.* 2011 Jun; 6(2): 31–37.
- Alvarado-Esquivel, C., Alanis-Quiñones, O. P., Arreola-Valenzuela, M. Á., Rodríguez-Briones, A., Piedra-Nevarez, L. J., Duran-Morales, E. et al. (2006). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in psychiatric inpatients in a northern Mexican city. *BMC Infectious Diseases*, 6(1): 1.
- Alvarado-Esquivel, C., Sánchez-Anguiano, L. F., Hernández-Tinoco, J., Arreola-Cháidez, E., López, J., Salcido-Meraz, K. I. et al. (2015). High seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in female sex workers: A case-control study. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 5(4): 285-292.
- Arantes, T. P., Lopes, W. D. Z., Ferreira, R. M., Pieroni, J. S. P., Pinto, V. M. R., Sakamoto, C. A., Costa, A. J. da. (2009). *Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by semen in dogs. *Experimental Parasitology*, 123(2): 190–194.
- Asgari, Q., Valian, H. K., Rezaeian, M., Shojaee, S., & Mehrabani, D. (2015). *Toxoplasma gondii*: sexual transmission in mice. *Journal of Parasitic Diseases*, 39(2): 253-257.
- Berdoy, M., Webster, J. P., Macdonald, D. W. (2000). Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Proc. R. Soc. Lond., Ser. B. Biol. Sci.*, 267: 1591–1594.
- Berenreiterová, M., Flegr, J., Kuběna, A. A., Němec, P. (2011). The distribution of *toxoplasma gondii* cysts in the brain of a mouse with latent toxoplasmosis: implications for the behavioral manipulation hypothesis. *PLoS ONE* 6(12): e28925.
- Boronow, J., Dickerson, F., Stallings, C., Lee, B., Origoni, A., Yolken, R. (2002) HSV-1, CMV and *Toxoplasma* serology predict cognitive deficits in schizophrenia. *Schizophr Res.* 53: 85.
- Boyer, K. M., Holfels, E., Roizen, N., Swisher, C., Mack, D., Remington, J. et al. (2005). Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: implications for prenatal management and screening. *American journal of obstetrics and gynecology*, 192(2): 564-571.

- Brejchová, H., Špidlenová, A., Fajfrlík, K., et al. (2002) Oční toxoplazmóza. *Prakt. Lék.* 82: 538–540.
- Contopoulos-Ioannidis, D., Wheeler, K. M., Ramirez, R., Press, C., Mui, E., Zhou, Y. et al. (2015). Clustering of *Toxoplasma gondii* Infections Within Families of Congenitally Infected Infants. *Clinical Infectious Diseases*, 61(12): 1815-1824.
- Dass, S. A. H., Vasudevan, A., Dutta, D., Soh, L. J. T., Sapolsky, R. M., Vyas, A. (2011). Protozoan parasite *Toxoplasma gondii* manipulates mate choice in rats by enhancing attractiveness of males. *PloS One*, 6(11).
- De Paepe, M. E., Guerrieri, C., Waxman, M. (1990). Opportunistic infections of the testis in the acquired immunodeficiency syndrome. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*, 57(1): 25-29.
- Disko, R., Braveny, I., Vogel, P. (1971). Untersuchungen zum Vorkommen von *Toxoplasma gondii* im menschlichen Ejakulat. *Z. Tropenmed. Parasitol*, 22, 391. Citováno v: Flegr, J., Klapilová, K., & Kaňková, Š. (2014). Toxoplasmosis can be a sexually transmitted infection with serious clinical consequences. Not all routes of infection are created equal. *Medical hypotheses*, 83(3): 286-289.
- Dogruman-Al, F., Aslan, S., Yalcin, S., Kustimur, S., Turk, S. (2009). A possible relationship between *Toxoplasma gondii* and schizophrenia: A seroprevalence study. *Int J Psychiatry Clin Pract.* 13(1): 82-87.
- Dubey, J. P., Hoover, E. A (1977). Attempted transmission of *Toxoplasma gondii* infection from pregnant cats to their kittens. *J Am Vet Med Assoc.* 170(5): 538-540.
- Dubey, J. P. (1988). Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *Am J Vet Res.* 1988 Jun; 49(6): 910-913.
- Dubey, J. P., & Beattie, C. P. (1988). *Toxoplasmosis of animals and man.* CRC Press, Inc. Citováno z: Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., & Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International journal for parasitology*, 30 (12): 1217-1258.
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev.* 11: 267–299.
- Dubey, J. P. (2010). *Toxoplasmosis of animals and humans.* CRC Press, Boca Raton, 313 pp.
- Dubey, J. P., Lehmann, T., Lautner, F., Kwok, O. C., Gamble, H. R. (2015). Toxoplasmosis in sentinel chickens (*Gallus domesticus*) in New England farms: Seroconversion, distribution of tissue cysts in brain, heart, and skeletal muscle by bioassay in mice and cats. *Vet Parasitol.* 30; 214 (1-2): 55-58.
- Dubey, J. P., Ferreira, L. R., Alsaad, M., Verma, S. K., Alves, D. A., Holland, G. N., McConkey, G. A. (2016). Experimental Toxoplasmosis in Rats Induced Orally with Eleven Strains of *Toxoplasma gondii* of Seven Genotypes: Tissue Tropism, Tissue Cyst

- Size, Neural Lesions, Tissue Cyst Rupture without Reactivation, and Ocular Lesions. *PLoS One*. 26; 11(5): e0156255.
- Dunay, I., Heimesaat, M., Bushrab, F., Müller, R. H., Stocker, H., Arasteh, K., Kurowski, M., Fitzner, R., Borner, K., Liesenfeld, O. (2004). Atovaquone maintenance therapy prevents reactivation of toxoplasmic encephalitis in a murine model of reactivated toxoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 4848–4854.
- Dunn, D., Wallon, M., Peyron, F., Petersen, E., Peckham, C., Gilbert, R. (1999). Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: Risk estimates for clinical counselling. *The Lancet*, 353(9167): 1829–1833.
- Emelia, O., Amal, R. N., Ruzanna, Z. Z., Shahida, H., Azzubair, Z., Tan, K. S., Noor Aadila, S., Siti, N. A., Aisah, M. Y. (2012). Seroprevalence of anti-Toxoplasma gondii IgG antibody in patients with schizophrenia. *Trop Biomed*. 29(1): 151-159.
- Flegr, J., Preiss, M., Klose, J., Havlíček, J., Vitáková, M., Kodym, P. (2003). Decreased level of psychobiological factor novelty seeking and lower intelligence in men latently infected with the protozoan parasite Toxoplasma gondii Dopamine, a missing link between schizophrenia and toxoplasmosis? *Biol Psychol*. 63(3): 253-268.
- Flegr, J. (2013). How and why Toxoplasma makes us crazy. *Trends in parasitology*, 29(4): 156-163.
- Flegr, J., Klapilová, K., Kaňková, Š. (2014). Toxoplasmosis can be a sexually transmitted infection with serious clinical consequences. Not all routes of infection are created equal. *Medical hypotheses*, 83(3): 286-289.
- Freyre, A., Falcón, J., Correa, O., Mendez, J., González, M., Venzal, J. M., Morgades, D. (2003). Cyst burden in the brains of Wistar rats fed Toxoplasma oocysts. *Parasitol Res.*; 89(5): 342-344.
- Fuccillo, D. A., Madden, D. L., Tzan, N., Sever, J. L. (1987). Difficulties associated with serological diagnosis of Toxoplasma gondii infections. *Diagn Clin Immunol.*; 5(1): 8-13.
- Fuller Torrey, E., Yolken, R. H. (2003) Toxoplasma gondii and Schizophrenia. *Emerg Infect Dis*. 9(11): 1375–1380.
- Havlíček, J., Gašová, Z., Smith, A. P., Zvára, K., & Flegr, J. (2001). Decrease of psychomotor performance in subjects with latent ‘asymptomatic’ toxoplasmosis. *Parasitology*, 122(05): 515-520.
- Hitziger, N., Dellacasa, I., Albiger, B., Barragan, A. (2005). Dissemination of Toxoplasma gondii to immunoprivileged organs and role of Toll/interleukin-1 receptor signalling for host resistance assessed by in vivo bioluminescence imaging. *Cell Microbiol*. 7(6): 837-848.
- Horáček, J., Flegr, J., Tintěra, J., Verebová, K., Španiel, F., Novák, T., Brunovský, M., Bubeníková-Valešová, V., Holub, D., Paleníček, T., Höschl C. (2012). Latent

- toxoplasmosis reduces gray matter density in schizophrenia but not in controls: voxel-based-morphometry (VBM) study. *World J Biol Psychiatry*. 13(7): 501-509.
- Janků, J. (1923). Pathogenesa a patologická anatomie tak zvaného vrozeného kolobomu žluté skvrny v oku normálně velkého microphthalmického s nálezem parazitů v sítnici. *Čas. Lék. Čes.* 62: 1021–1043.
- Jírovec, O. (1971). Neue Forschungen über die Toxoplasmose in der Tschechoslowakei. III. Toxoplasminteste bei Patienten in vier psychiatrischen Heilanstalten. In: Kirchoff, H., Langer, H.: *Toxoplasmose. Praktische Fragen und Ergebnisse*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag: 14-16.
- Jungersen, G., Bille-Hansen, V., Jensen, L., Lind, P. (2001). Transplacental transmission of *Toxoplasma gondii* in minipigs infected with strains of different virulence. *J Parasitol.* 87(1): 108-113.
- Juránková, J., Opsteegh, M., Neumayerová, H., Kovařík, K., Frencová, A., Baláž, V., Volf, J., Koudela B. (2013). Quantification of *Toxoplasma gondii* in tissue samples of experimentally infected goats by magnetic capture and real-time PCR. *Vet Parasitol.*; 193(1-3): 95-99.
- Juránková, J., Basso, W., Neumayerová, H., Baláž, V., Jánová, E., Sidler, X., Deplazes, P., Koudela, B. (2014). Brain is the predilection site of *Toxoplasma gondii* in experimentally inoculated pigs as revealed by magnetic capture and real-time PCR. *Food Microbiol.*; 38: 167-170.
- Kean, B. H., Kimball, A. C., Christenson, W. N. (1969). An epidemic of acute toxoplasmosis. *JAMA*. 1969;208(6): 1002-1004.
- Kodym, P., Malý, M., Švandová, E., Lekatková, H., Badoutová, M., Vlková, J. et al. (2000). *Toxoplasma* in the Czech Republic 1923–1999: first case to widespread outbreak. *International Journal for Parasitology*, 31: 125-132.
- Kodym, P., Blažek, K., Malý, M., Hrdá, Š. (2002). Pathogenesis of experimental toxoplasmosis in mice with strains difference in virulence. *Acta Parasitologica*, Vol. 47, No. 3: 239-248.
- Kodym, P., Geleneky, M. (2012). Prevence, diagnostika a léčba toxoplasmózy v graviditě. *Actual Gyn*; 4: 31-38.
- Koskiniemi, M., Lappalainen, M., Hedman, K. (1989). Toxoplasmosis needs evaluation: an overview and proposals. *Am J Dis Child.*, 143: 724–728.
- Kouba, K., Jíra, J., Hübner, J. (1974). *Toxoplasmóza*. Avicenum, Praha.
- Khurana, S. a Batra, N. (2016). Toxoplasmosis in organ transplant recipients: Evaluation, implication, and prevention. *Trop Parasitol.* 6(2): 123–128.

- Levine, N. D. (1988). The protozoan phylum Apicomplexa. Volume 2. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Liesenfeld, O. (2002). Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? *J. Infect. Dis.*, 185: 96–101.
- Lindová, J., Příplatová, L., & Flegr, J. (2012). Higher extraversion and lower conscientiousness in humans infected with *Toxoplasma*. *European Journal of Personality*, 26(3): 285-291.
- Literák, I., Rychlík, I., Svobodová, V., Pospíšil, Z. (1998). Restriction fragment length polymorphism and virulence of czech *Toxoplasma gondii* strains. *International Journal for Parasitology*, 28: 1367-1374.
- Liu, S., Qin, C., Yao, Z., Wang, D. (2006). Study on the transmission of *Toxoplasma gondii* by semen in rabbits. *Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases*, 24(3): 166–170.
- Lopes, W. D. Z., da Costa, A. J., Santana, L. F., dos Santos, R. S., Rossanese, W. M., Lopes, W. C. Z., Costa, G. H. N., Sakamoto, C., Alessandro, U., dos Santos, T. R. (2009). Aspects of *Toxoplasma* infection on the reproductive system of experimentally infected rams (*Ovis aries*). *Journal of Parasitology Research*.
- Luft, B. J., Brooks, R. G., Conley, F. K., McCabe, R. E., Remington, J. S. (1984). Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *J Am Med Assoc.*, 252: 913–917.
- Luft, B. J., Remington, J. S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis.*, 15: 211–222.
- Machala, L., Kodym, P., Černý, R. (2005). Toxoplasmóza. *Interní Med.* 7(3): 120-122.
- Melzer, T. C., Cranston, H. J., Weiss, L. M., Halonen, S. K. (2010). Host Cell Preference of *Toxoplasma gondii* Cysts in Murine Brain: A Confocal Study. *J Neuroparasitology*. 2010;1. pii: N100505.
- Montoya, J. G., Remington, J. S. (1996). Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. *Clin Infect Dis.* 23: 277–282.
- Moura, A. B., Costa, A. J., Jordao Filho, S., Paim, B. B., Pinto, F. R., Di Mauro, D. C. (2007). *Toxoplasma gondii* in semen of experimentally infected swine. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 27(10): 430–434.
- Ondriska, F., Čatár, G., Vozarová, G. (2003). The significance of complement fixation test in clinical diagnosis of toxoplasmosis. *Bratisl Lek Listy*; 104: 189-196.
- Palička, P., Slabá, H., Zítek, K. (1998). Active control of congenital toxoplasmosis in the population. *Centr Eur J Publ Hlth* 6: 265-268.

- Pappas, G., Roussos, N., Falagas, M. E. (2009). Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol*, 39: 1385-1394.
- Pazdiora, P. (2014). Problematika HIV/AIDS stále aktuální! *Zprávy CEM*, 2: 49.
- Perkins, E. S. (1973). Ocular toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol*, 57: 1–17.
- Pomeroy, C. etl Filice, G. A. (1992). Pulmonary toxoplasmosis: a review. *Clin Infect Dis*. 14(4): 863-870.
- Robert-Gangneux, F., Murat, J. B., Fricker-Hidalgo, H., Brenier-Pinchart, M. P., Gangneux, J. P., Pelloux, H. (2011). The placenta: a main role in congenital toxoplasmosis? *Trends in Parasitology*, 27(12): 530–536.
- Roberts, C.W., Alexander, J. (1992). Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in Balb/c mice infected for the first time during pregnancy. *Parasitology*, 104: 19-23.
- Santana, L. F., da Costa, A. J., Pieroni, J., Lopes, W. D. Z., Santos, R. S., de Oliveira, G. P., de Mendonca, R. P., Sakamoto, C. A. M. (2010). Detection of *Toxoplasma gondii* in the reproductive system of male goats. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 19(3): 179–182.
- Scarpelli, L., Lopes, W. D. Z., Migani, M., Bresciani, K. D. S., Costa, A. J. da. (2009). *Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bos taurus* and *Bos indicus* semen and tissues. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29(1): 59–64.
- Sutterland, A. L., Fond, G., Kuin, A., Koeter, M. W., Lutter, R., van Gool, T., Yolken, R., Szoke, A., Leboyer, M., de Haan, L. (2015). Beyond the association. *Toxoplasma gondii* in schizophrenia, bipolar disorder, and addiction: systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand*. 2015 Sep; 132(3): 161-179.
- Szabo, E. K., Finney, C. A. M. (2017). *Toxoplasma gondii*: One organism, multiple models, *Trends in Parasitology*, 33(2): 113-127.
- Teixeira, W. F. P., Tozato, M. E. G., Pierucci, J. C., Vital, G. P., Cruz, A. C., Lopes, W. D. Z., Cursino, M. S., Joaquim, S. F., Soares, V. E., Langoni, H. et al. (2017). Investigation of *Toxoplasma gondii* in semen, testicle and epididymis tissues of primo-infected cats (*Felis catus*). *Vet Parasitol.*; 238: 90-93.
- Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30: 1217–1258.
- Thiébaud, R., Leproust, S., Chêne, G., Gilbert, R. (2007). Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. *Lancet*; 369(9556) :115-122.
- Torgerson, P. R. a Mastroiacovo, P. (2013). The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bulletin of the World Health Organization* 91: 501-508.

- Valkoun, A. (1983). Continual cultivation of *Toxoplasma gondii* on HeLa cells. *Folia Parasitol* 30(4): 289–294.
- Vogel, N., Kirisits, M., Michael, E., Bach, H., Hostetter, M., Boyer, K., Simpson, R., Holfels, E., Hopkins, J., Mack, D., Mets, M. B., Swisher, C. N., Patel, D., Roizen, N., Stein, L., Stein, M., Wither, S., Mui, E., Egwuagu, C., Remington, J., Dorfman, R., McLeod, R. (1996). Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception. *Clinical Infectious Diseases*, 23(5): 1055–1060.
- Webster, J. P. a McConkey, G. A. (2010). *Toxoplasma gondii*-altered host behaviour: clues as to mechanism of action. *Folia Parasitologica*, 57: 95–104.
- Wilder, H. C. (1952). *Toxoplasma chorioretinitis* in adults. *AMA Arch Ophthalmol.* 48: 127–136.
- Wu, L., García, R. A. (2015). Ophthalmologic Manifestations of Toxoplasmosis [online]. *eMedicine, Drugs & Diseases, Ophthalmology* [cit. 23.7.2017]. Dostupné z: <http://emedicine.medscape.com/article/2044905-overview>
- Yu, H., Huang, B., Zhuo, X., Chen, X., Du, A. (2013). Evaluation of a real-time PCR assay based on the single-copy SAG1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol.*; 197(3-4): 670-673.