

Katedra parazitologie

Univerzita Karlova v Praze - Přírodovědecká fakulta



# **Vliv latentní toxoplazmózy matky na postnatální vývoj potomků**

Romana Vavřinová

**Diplomová práce**  
Praha 2006

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jaroslav Flegr, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury.

V Praze 3.5.2006

*Barbora Křížová*

## Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala všem, kteří mi pomáhali během mého studia.

V první řadě chci poděkovat:

- Doc. RNDr. Jaroslavu Flegrovi, CSc. za podnětné připomínky během psaní diplomové práce, za rady a trpělivost během studia a za to, že mi umožnil seznámit se s vědeckou prací a nadchnul mě pro tuto činnost.
- RNDr. Petru Kodymovi, CSc. za povzbuzení a pomoc.

Dále potom chci poděkovat:

- Mgr. Šárce Kaňkové za pomoc při experimentech.
- Sestřičkám Ireně Ripplové a Haně Langerové z ordinací Gest za pomoc při sběru dat.
- A celému kolektivu laboratoře i ostatním z katedry parazitologie.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým rodičům, své sestře Soně, celé rodině a příteli Bohoušovi za podporu a zázemí během studia.

# Vliv latentní toxoplazmózy matky na postnatální vývoj potomků

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>3</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Toxoplazmóza.....</b>	<b>4</b>
2.1.1 Mezihostitel a průběh toxoplazmózy.....	5
2.1.2 Parazit a průběh toxoplazmózy .....	6
2.1.3 Imunitní odpověď a toxoplazmóza.....	6
<b>2.2 Toxoplazmóza a její vliv na člověka .....</b>	<b>9</b>
2.2.1 Akutní a latentní fáze onemocnění .....	9
2.2.2 Kongenitální toxoplazmóza .....	11
<b>2.3 Vliv těhotenství na organismus matky.....</b>	<b>13</b>
2.3.1 Těhotenství.....	13
Vývoj embrya a plodu .....	14
2.3.2 Imunita v těhotenství .....	15
2.3.3 Šestinedělí a kojení .....	16
2.3.4 Reaktivace parazitárního onemocnění během těhotenství .....	17
<b>2.4 Dítě.....</b>	<b>18</b>
2.4.1 Růst a vývoj.....	18
2.4.1.1 Postnatální období .....	18
2.4.1.2 Novorozenec.....	19
2.4.1.3 První rok života .....	19
2.4.1.4 Druhý a třetí rok života .....	20
2.4.2 Neuropsychický vývoj .....	21
2.4.3 Faktory ovlivňující vývoj dítěte a jeho zdravotní stav .....	21
2.4.4 Častá onemocnění dětí do tří let.....	22
<b>3. VLIV LATENTNÍ TOXOPLAZMÓZY NA DĚTI .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Cíl práce.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Materiál a metody .....</b>	<b>25</b>
3.2.1 Soubor matek .....	25
3.2.2 Vyšetření na toxoplazmózu - metoda nepřímé imunofluorescence .....	25
3.2.3 Obsah dotazníku .....	26
3.2.4 Průběh testování .....	30
3.2.5 Statistické zpracování .....	31
<b>3.3 Výsledky.....</b>	<b>32</b>
3.3.1 Základní údaje .....	32
3.3.2 Zdravotní stav matky během těhotenství .....	33
3.3.3 Nálady matky před a během těhotenství.....	36
3.3.4 Průběh těhotenství .....	38
3.3.5 Růst a spánek dítěte .....	40
3.3.6 Psychomotorický vývoj dítěte.....	51

3.3.7 Zdravotní stav dítěte .....	53
3.3.8 Chování dítěte do tří let .....	56
<b>4. VLIV LATENTNÍ TOXOPLAZMÓZY NA POTOMSTVO MYŠÍ.....</b>	<b>57</b>
4.1 Cíl práce.....	57
4.2 Materiál a metody .....	57
4.2.1 Experimentální zvířata.....	57
4.2.2 Příprava inokula .....	58
4.2.3 Hmotnosti mláďat.....	58
4.2.4 Séropozitivita .....	58
4.2.5 Behaviorální testy .....	58
4.2.6 Statistické zpracování dat .....	59
4.3 Výsledky.....	60
4.3.1 Hmotnost mláďat .....	60
4.3.2 Behaviorální pokusy .....	64
<b>5 VLIV ANTITOXOPLASMICKÝCH PROTILÁTEK NA INFEKCI TOXOPLAZMÓZOU .....</b>	<b>66</b>
5.1 Cíl práce.....	66
5.2 Materiál a metody .....	66
5.2.1 Příprava experimentálních zvířat.....	66
5.2.2 Sledování změny hmotnosti .....	66
5.2.3 Stanovení titru protilátek.....	66
5.2.4 Detekce parazita v krvi metodou PCR.....	67
5.2.5 Počet cyst v mozku .....	70
5.2.6 Statistické zpracování dat .....	74
5.3 Výsledky.....	74
5.3.1 Sledování změn hmotnosti .....	74
5.3.2 Titr protilátek .....	76
5.3.3 Detekce parazita v krvi pomocí metody PCR .....	77
5.3.4 Počet cyst v mozku .....	77
<b>6. DISKUZE .....</b>	<b>79</b>
6.1 Vliv latentní toxoplazmózy na děti.....	79
6.2 Vliv latentní toxoplazmózy na potomstvo myší.....	87
6.3 Vliv antitoxoplasmických protilátek na infekci toxoplazmózou.....	89
<b>7. ZÁVĚREČNÉ SHRNUTÍ.....</b>	<b>91</b>
<b>8. SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>93</b>

# 1. Úvod

Toxoplazmóza je nemoc člověka i zvířat způsobená parazitickým prvokem *Toxoplasma gondii*. Definitivním hostitelem je kočkovitá šelma a mezihostitelem se může stát jakýkoliv teplokrevný obratlovec. K přenosu na člověka dochází při kontaktu s oocystami kontaminovanou zemí, pozřením špatně tepelně upraveného masa potencionálních mezihostitelů s životaschopnými bradyzoity nebo kongenitálně. V současné době je v České republice nakaženo asi 30 % lidí. Nemoc je neléčitelná a doživotní. O akutní toxoplazmóze a jejím vlivu na těhotenství a vývoj dítěte bylo napsáno mnoho prací. O latentní toxoplazmóze víme, že ovlivňuje reakční čas postiženého člověka a mění jeho psychiku. Při vzniku imunodeficience může dojít k reaktivaci akutní toxoplazmózy. V minulosti byl vliv latentní toxoplazmózy na průběh těhotenství podceňován a většina autorů ho popírá (Quablan et al., 2002, Giorgino a Mega, 1981). V diplomové práci Šárky Kaňkové byl vliv latentní toxoplazmózy na průběh těhotenství prokázán. V 16. týdnu byl podle ultrazvukového vyšetření zjištěn u *toxoplasma*-pozitivních matek signifikantně menší plod. Matky s latentní toxoplazmózou, u kterých nebyl zaznamenán předčasný porod, měly delší těhotenství. Také bylo zaznamenáno zvýšení pohlavního indexu u dětí *toxoplasma*-pozitivních matek, které korelovalo s titrem specifických protilátek proti *Toxoplasma gondii*.

Moje práce volně navazuje na práci Šárky Kaňkové a bude se týkat latentní toxoplazmózy v těhotenství a především jejímu vlivu na vývoj dítěte. Ke studiu tohoto fenoménu jsem použila též zvířecí model.

## 2. Literární přehled

### 2.1 Toxoplazmóza

Toxoplazmóza je parazitární onemocnění způsobené koccídií *Toxoplasma gondii*. Toto onemocnění je přenosné na člověka kongenitálně nebo postnatálně (infekcí z vnějšího prostředí) a bylo poprvé zaznamenáno u člověka v roce 1923 (Janků, 1923). Je rozlišeno na akutní a latentní fázi. Akutní fáze je většinou provázená mírnými příznaky nemoci a je většinou nerozpoznána nebo mylně diagnostikována jako lehké virové či bakteriální onemocnění. Fáze latentní je potom zpravidla asymptomatická. Největší riziko představuje toxoplazmóza v akutní fázi pro těhotné ženy (viz dále).

*Toxoplasma gondii* popsali poprvé v roce 1908 Nicolle a Manceaux. Její životní cyklus byl popsán o šedesát let později Hutchinsonem v roce 1968. Prevalence toxoplazmózy se u lidí zvyšuje s věkem a liší se v různých geografických a kulturních oblastech. Záleží především na klimatu, hygienických podmínkách, kuchařských zvyklostech, přítomnosti koček atd. V České republice je prevalence kolem 30 % (Kodym et al., 2001).

Životní cyklus je charakterizovaný střídáním pohlavní a nepohlavní fáze a vyžaduje meziphostitele. Pohlavní fáze začíná tvorbou oocyst v intestinálním epitelu definitivního hostitele. Tento hostitel je většinou kočka domácí (*Felis catus*), případně jiná kočkovitá šelma. Oocysty jsou vylučovány ve výkalech (obvykle nejdříve 3-5 dní po infekci tkáňovou cystou) a dostávají se do vnějšího prostředí, nejčastěji do půdy, kde sporulují. Doba sporulace je závislá na teplotě, okysličení a vlhkosti prostředí. V půdě je oocysta infekční po dobu více než jednoho roku a může být zničena teplem (nad 60 °C) (Couvreur & Desmonts, 1988). Vysporulovaná oocysta obsahuje osm sporozoitů. Nepohlavní fáze začíná požitím oocysty teplokrevným živočichem. Oocysty se uvolňují v trávicím traktu na sporozoity, kteří pronikají prostřednictvím krve do buněk různých tkání a orgánů a intenzivně se množí. Přeměňují se přitom na stadium typické pro akutní fázi onemocnění - tachyzoity (také nazývané endozoiti nebo trophozoiti). Ve tkáních se přeměňují na cysty obklopené odolnou membránou, obsahující bradyzoity (také nazývané jako cystozoiti nebo merozoiti), kteří jsou charakterističtí pro latentní formu toxoplazmózy (Jones, 2003). Nejvíce cyst se vyskytuje v mozkové tkáni a ve svalech. Tyto cysty mohou být zničeny teplem (nad 60 °C) nebo mrazem (-9 °C) (Couvreur & Desmonts, 1988). Požitím cysty kočkovitou šelmou se cyklus uzavírá, z cyst se v trávicím traktu kočky uvolňují bradyzoiti, kteří se přeměňují v tachyzoity

a ti pak infikují střevní epitel kočky. Z tachyzoitů zde vznikají gamonti, kteří dozrávají na mikrogametocyty a makrogametocyty a jejichž splynutím vznikají oocysty. Lidé jsou nakaženi buď oocystami od kočky nebo tkáňovými cystami z masa infikovaného zvířete nebo přes placentu vrozenou kongenitální formou toxoplazmózy. Kočky mohou být také infikovány pozřením vysporulovaných oocyst.

### 2.1.1 Mezihostitel a průběh toxoplazmózy

Mezihostitelé parazitického prvoka *Toxoplasma gondii* se svými reakcemi na infekci různí. Relativně rezistentními hostiteli jsou lidé, dospělé krysy, slepice a psi, u kterých dochází k asymptomatickému onemocnění. Naopak velmi vnímavými zvířaty k infekci jsou myši, králíci, morčata a australská vačnatci. U těchto druhů zvířat končí infekce často smrtí (Frenkel, 1988). Americké a australské opice umírají na toxoplazmózu velmi rychle, zatímco opice ze Starého Světa jsou k tomuto onemocnění (stejně jako lidé) rezistentní. U laboratorních myší se odolnost proti infekci liší na úrovni kmenů. Už Araujo (1976) popisuje různé působení parazita *Toxoplasma gondii* na sedm různých kmenů myší. V této práci je rovněž popisována mortalita v závislosti na podané infekční dávce. Při podání  $10^5$  tachyzoitů intraperitoneálně, byla mortalita myší kmene BALB/c 100 %, zatímco u kmene myší C57Bl 87 %. Právě mortalita kmene BALB/c je nejvíc závislá na množství podaného infekčního inokula. Williams et al. (1978) demonstruje důležitost genů H-2 komplexu v určování rezistence kmene vůči toxoplazmóze.

Suzuki (1993) porovnává kmeny myší BALB/c a CBA/Ca co do úmrtnosti při akutní a latentní fázi infekce. Při intraperitoneální inokulaci 20, 40 a 80 cyst je úmrtnost v akutní fázi u kmene BALB/c 12 %, 50 % a 75 %, zatímco u kmene CBA/Ca není žádná. Při infekci 10 cystami je naopak v latentní (zde mylně nazývané chronické) fázi úmrtnost u kmene BALB/c nulová, zatímco u kmene CBA/Ca 53 %.

K rezistentním hostitelům patří také člověk. Pouze asi 20 % lidí má v průběhu akutního stádia nějaké klinické příznaky. Mezi tyto příznaky patří především lymphadenopatie, bolesti hlavy, a dále některé další spíše nespecifické příznaky. U infikovaných osob je nápadně zvýšená hladina CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů (Darcy a Santoro, 1994).



### 2.1.2 Parazit a průběh toxoplazmózy

Jednotlivé kmeny *Toxoplasma gondii* se liší svým genotypem a z toho vyplývající virulencí. Kodým et al. (2002) popisuje rozdíl mezi virulentním kmenem P-CZ, vysoce patogenním cystogenním kmenem 38 a avirulentním cytogenním kmenem HIF. Rozdíly mezi jednotlivými kmeny byly ve stupni orgánového poškození, délce trvání akutní parazitémie, počtu cyst v mozku, mortalitě a úbytcích hmotnosti během akutní fáze infekce.

Různost virulence je pravděpodobně zapříčiněna různým genetickým pozadím. Populace *Toxoplasma gondii* je zřetelně rozdělena na tři různé skupiny kmenů (typy I, II, III), které se dramaticky liší svou virulencí. Ve článku Sibley et al. (2002) je uvedený rozdíl mezi jednotlivými kmeny parazita, a dále virulence, která jednotlivé typy kmenů charakterizuje. Je zde rovněž porovnán genotyp virulentního kmene typu I (GT-1) a avirulentního kmene typu III (CEP). Autoři došli k závěru, že virulence je podmíněna geneticky a výrazně se liší podle toho, ke kterému typu náleží kmen použitý k infekci laboratorních zvířat. Některé kmeny však nelze přesně zařadit do žádného z těchto tří typů, neboť svými vlastnostmi neodpovídají vyloženě jednomu z těchto typů. Výsledek svědčí o multigenovém založení virulence. Bylo doloženo (Howe et al., 1996), že specifická alela na SAG1 lokusu chromozómu VIII *Toxoplasma gondii* koreluje s virulencí jednotlivých typů. SAG1 a jeho produkt se podílí na invazi prvoka do hostitelské buňky.

Míra virulence záleží také na stadiu, kterým je mezihostitel infikován (oocysta, tkáňová cysta, tachyzoit), způsobu infekce (peritoneálně, perorálně nebo žaludeční sondou). Virulence kmene *Toxoplasma gondii* se může také lišit podle toho, zda je kmen držen v laboratoři a udržován pouze nepohlavním rozmnožováním přenosem na myši (Lecomte et al., 1992) nebo zda jsou kultury parazita udržovány za různých podmínek (Dardé et al., 1990).

Na průběh infekce má též vliv infekční dávka. Arujo et al. (1976) popisuje snížení mortality v závislosti na snížení infekční dávky.

### 2.1.3 Imunitní odpověď a toxoplazmóza

Při infekci toxoplazmózou dochází nejprve k akutní fázi, při níž tachyzoiti pronikají do buněk hostitele a intenzivně se množí. Po nějaké době (jejíž trvání závisí na genotypu parazita, druhové příslušnosti hostitele i jeho genotypu a momentálním fyziologickém stavu) se však rozvine imunitní odpověď hostitele a v jejím důsledku dojde k redistribuci parazitů ve tkáních. Rychle se množící stádium tachyzoitů se mění na bradyzoity, kteří jsou rezistentní k protilátkové odpovědi hostitele. Nastává jakýsi rovnovážný stav, ve kterém imunitní systém

hostitele udržuje parazita ve stádiu bradyzoitů ve formě tkáňových cyst. Tato zdánlivá rovnováha může být v některých případech narušena. Dochází k tomu u uměle imunosuprimovaných lidí, osob nakažených virem HIV a u pacientů s maligním nebo systémovým onemocněním.

V obraně před *Toxoplasma gondii* hraje významnou roli jak humorální, tak i buněčná imunita.

### Humorální imunita

Po určité době po infekci se na *Toxoplasma gondii* začnou tvořit specifické protilátky. Z publikace Chardes et al. (1990) vyplývá, že tvorba IgA protilátek u myši začíná kolem 14. dne po infekci. V séru a v mléku jsou IgA protilátky detekovatelné ještě tři týdny po infekci. Začátek produkce protilátek IgG a IgM v séru a v mléku je shodný jako u IgA protilátek – začínají se tvořit 14 dní po infekci. U lidí jsou též dva týdny po infekci přítomné v krvi specifické protilátky IgM, které jsou charakteristické pro akutní fázi. Protilátky třídy IgG se objevují nejpozději do dvou měsíců po infekci. Kodým (1996) ve své disertační práci uvádí, že množství IgG protilátek je nejvyšší 50. den po infekci. Potom hladina IgG protilátek klesá, jejich přítomnost však bývá zpravidla detekovatelná celý život. U člověka se dále diagnostikují specifické protilátky IgA a IgE. Současný výskyt specifických protilátek třídy IgM a IgA dokumentuje akutní fázi onemocnění (Stepick-Biek et al., 1990). U některých pacientů jsou ale protilátky IgM detekovatelné ještě dlouhou dobu po odeznění akutní fáze infekce. V tomto případě se pro určení fáze infekce používá test IgG avidity, neboť tato avidita stoupá s dobou od nákazy (Marcolino et al., 2000). Specifické protilátky IgE se vyskytují u zvířat a lidí (Pinon et al., 1990) brzy po infekci, ještě před výskytem specifických IgA protilátek. Specifické protilátky IgA nikdy nepřetrvávaly déle než čtyři měsíce po infekci. Protilátky třídy IgM a IgA neprocházejí přes placentu a při diagnóze akutní toxoplazmózy v těhotenství mohou svou přítomností v těle dítěte indikovat infekci plodu (Kierszenbaum, 1994). Sekreční protilátky IgA mohou být přítomny v mateřském mléce během akutní fáze toxoplazmózy. Je prokázáno, že inkubace tachyzoitů *Toxoplasma gondii* se sekretovanými protilátkami IgA z mléka nebo s purifikovanými sekrečními protilátkami IgA redukovala o 50-75 % infekci enterocytů v podmínkách *in vitro* (Mack and McLeod, 1992).

## Buněčná imunita

Buněčná imunita, která doprovází infekci toxoplazmózou byla poprvé objevena v souvislosti se studiem hypersensitivity pozdního typu (delayed type hypersensitivity, DTH) (Frenkel, 1948). Tento typ reakce je namířen proti intracelulárním parazitům a je založen na společné migraci  $T_{H1}$  buněk a makrofágů do místa infekce a jejich vzájemné stimulaci. V místě výskytu antigenu  $T_{H1}$  buňky produkují interferon  $\gamma$ , který aktivuje makrofágy a makrofágy produkují lymfokiny, které aktivují T buňky (Hořejší a Bartůňková, 2002).

Role T lymfocytů je velmi výrazná při reakci organismu na napadení prvokem *Toxoplasma gondii*. Frenkel (1967) zaznamenal, že křečci, kteří přijali slezinu a lymfoidní buňky od toxoplazma-positivních dárců, byli chráněni před smrtelnými účinky infekce prvokem *Toxoplasma gondii*.

Suzuki a Remington (1988) zjistili, že  $CD4^+$  T lymfocyty se podílejí na vývoji rezistence a  $CD8^+$  T lymfocyty ovlivňují udržování ochranné imunity a inhibují tvorbu cyst.  $CD4^+$  T lymfocyty fungují jako pomocné buňky při vzniku ochranné imunity a podporují aktivitu  $CD8^+$  T lymfocytů při produkci cytokinů (Kierszenbaum, 1994).

Interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), který je produkován T buňkami je velmi účinnou obranou hostitelského organismu proti parazitovi. INF- $\gamma$  může aktivovat makrofágy a inhibovat růst některých intracelulárních parazitů (Pfeffercorn, 1984). Recentní práce dokazují, že interferon  $\gamma$  je nutný u myši k prevenci toxoplasmické encefalitidy (Wang et al., 2004). U myši, kterým byla podávána protilátka mAb namířená proti INF- $\gamma$ , se vyskytovaly cysty v mozku 5 krát více než u kontrolní skupiny myši.

U lidí s akutní toxoplazmózou hrají významnou roli makrofágy a NK buňky. Podobnou funkci prezentovat antigen u makrofágů mají též neutrofilové a dendritické buňky (Alexander a Hunter, 1998, Hunter et al., 1995, Sher a Sousa, 1998). Makrofágy produkují interleukin 12, který společně s dalšími faktory stimuluje NK buňky k produkci INF- $\gamma$ .

U pacientů s příznaky akutní toxoplazmózy byl zjišťován význam zvýšeného počtu  $CD8^+$  T buněk. Luft et al. (1984) popsal, že parazitem produkovaný antigen by mohl inhibovat lymfocytární proliferaci aktivací  $CD8^+$  T buňky. Potlačená buněčná aktivita a přetrvávající vzrůst  $CD8^+$  T buněk koreluje s klinickými symptomy akutní toxoplazmózy.

## Vakcinace

Ochranou proti toxoplazmózy by mohla být vakcinace pomocí jejích antigenů. V práci Letscher-Bru et al. (2003) je studována problematika vakcinace proti toxoplazmóze a kongenitálnímu přenosu infekce na mláďata. K infekci myši došlo 4 týdny po připuštění. Byl prokázán vliv genotypu použitých myši. U kmene BALB/c je kongenitální přenos u většiny myši potlačen vakcinací, kdežto u kmene myši CBA/J nedošlo pomocí vakcinace k potlačení kongenitálního přenosu. Lze tedy říci, že u myši kmene BALB/c vakcinace SAG1 proteinem redukuje kongenitální přenos o 50 %. Imunitní reakce myši je závislá na druhu antigenů. V článku Vercammen et al. (2000) byly naočkovány myši tří různých kmenů (C57Bl/6, C3H, BALB/c) různými plasmidy kódujícími antigeny *Toxoplasma gondii* (GRA1, GRA7, ROP2) a zkoumala se hladina protilátek, buněčná odpověď a protektivní imunita. Tato DNA vakcinace navodila jak humorální, tak i buněčnou imunitu. Humorální imunita se projevila změnami titrů protilátek. Nejvyšší titry byly u myši kmene C57Bl/57 očkovaných antigenem GRA7, nejnižší titry protilátek byly u myši kmene BALB/c naočkovaných antigenem ROP2. Buněčná imunitní odpověď je dokumentována signifikantně vyšší hladinou interferonu gama ve slezině vakcinovaných myši kmene BALB/c. Protektivní imunita závisela též na kmenu myši, druhu antigenu a infekční dávce. K vakcinaci plasmidy kódujícími antigeny *Toxoplasma gondii* lze použít i další antigeny - např. antigen bradyzoita (BAG1) nebo matrix antigen (MAG1) - uvedené ve článku Nielsen et al. (2006).

## **2.2 Toxoplazmóza a její vliv na člověka**

### **2.2.1 Akutní a latentní fáze onemocnění**

Jak bylo již zmíněno v kapitole 2.1.1 a 2.1.3, toxoplazmóza většinou nepředstavuje pro zdravého člověka zdravotní riziko. Akutní fáze onemocnění je v počátcích charakterizováno nespecifickými příznaky nebo jen lehkými symptomy připomínajícími virózu nebo bakteriální onemocnění. Objevuje se zduření mízních uzlin, mírné bolesti hlavy a další příznaky. Tato akutní fáze, která často není ani zaznamenána lékařem, trvá dva až tři měsíce, vzácně déle. Je dokazatelná zvýšením *toxoplasma* specifických protilátek IgA a IgM (Kodym a Tolarová, 1998). V dalším období nemoc přechází do latentní fáze, která je charakteristická přítomností *toxoplasma* specifických protilátek IgG (Allain, 1998). Latentní fáze mnohdy přetrvává až do smrti. V latentní fázi jsou pozorovány u infikovaných osob některé změny

psychiky a reakčních časů. Popisovány jsou zpomalení psychomotorických reakcí (Havlíček, 2001), nižší verbální inteligence, změna potřeby hledání nového – tzv. novelty seeking (Flegr et al., 2003). Dále byly pozorovány posuny v psychických vlastnostech jako je rezervovanost, sebekontrola a další. Směr a intenzita u těchto vlastností závisí také na pohlaví jedince s latentní toxoplazmózou (Flegr et al., 2000). Toxoplazmóza může pravděpodobně měnit hladinu neurotransmiterů v mozku. Není vyloučeno, že právě tímto mechanismem se zvyšuje riziko schizofrenie (Flegr, 2003).

Někteří autoři rozdělují fáze toxoplazmózy na akutní a chronickou. Chronická toxoplazmóza je onemocnění, u kterého přetrvávají příznaky akutního onemocnění a protilátky akutní fáze v krvi déle než dva až tři měsíce. Ve starších pracích je mylně zaměňovaná latentní fáze za chronickou. Právě autoři hovořící o chronické toxoplazmóze popisují ve svých pracích (Jezyna a Zajac, 1983) negativní vliv chronického onemocnění matky na nenarozené dítě. Ve starších pracích (Kimball et al., 1971) se objevuje souvislost mezi větším počtem potratů a toxoplazmózou. V novějších studiích je toto tvrzení spíše popíráno (Quablan et al., 2002, Giorgino a Mega, 1981).

Dalším projevem toxoplazmózy u člověka je zvýšené riziko schizofrenie. U schizofrenních pacientů jsou vyšší četnosti výskytu protilátek proti *Toxoplasma gondii* než u kontrolní skupiny. Při interpretaci výsledků těchto prací je třeba brát v úvahu typ schizofrenních pacientů. U pacientů dlouhodobě léčených mohou být výsledky zkresleny jejich dlouhodobou hospitalizací nebo dokonce i použitými chemoterapeutiky. Původně byli sledováni všichni pacienti bez ohledu na stadium schizofrenie. Teprve od roku 1999 byli do těchto studií zařazováni pouze pacienti s první epizodou schizofrenie, tedy pacienti, kteří nebyli nikdy na schizofrenii léčeni. Řada prací provedených po tomto roce ukázala, že se i zde skupiny schizofreniků s první epizodou schizofrenie a kontrolních skupin zdravých osob signifikantně lišily ve výskytu anti-toxoplasmatických protilátek i jejich hladin (Torrey, 2003). Podezření na pravděpodobnou souvislost onemocnění schizofrenií s infekcí *T. gondii* potvrzuje práce Jones-Brando z roku 2003. Ta uvádí inhibici růstu *Toxoplasma gondii* v tkáňové kultuře pomocí léků, které se používají při léčbě psychických poruch. Princip působení těchto léků může být vysvětlen jednak přímým patogenním působením *Toxoplasma gondii* na tkáň mozku nebo změnou hladiny neurotransmiterů, které může *Toxoplasma gondii* ovlivňovat. Lze očekávat, že v zemích s nejvyšší prevalencí toxoplazmózy by měla tedy být nejvyšší prevalence schizofrenie. Například ve Francii, která je známa jednou z nejvyšších prevalencí toxoplazmózy v rozvinutém světě je skutečně prokázán o 50 % vyšší výskyt schizofrenie (Van Os, 1993). Otázkou zůstává zda-li jde o vztah kauzální a jaký je charakter tohoto vztahu.

Nelze vyloučit, že lidé se schizofrenií nebo lidé s predispozicí k tomuto onemocnění vykazují vzorce chování, které zvyšují riziko jejich kontaktu s *Toxoplasma gondii*, nebo se vyskytují v prostředí, kde je vyšší riziko infekce tímto parazitem.

V diplomové práci Šárky Kaňkové (2005) a v práci Flegr et al., 2005 jsou popisovány další specifické vlivy latentní toxoplazmózy na člověka. Bylo zjištěno, že pohlavní index dětí od toxo-positivních matek je vyšší a má tendenci k růstu se stoupajícím titrem protilátek. U *toxoplasma*-pozitivních matek byla prokázána retardace růstu plodu v časných fázích těhotenství a matky s latentní toxoplazmózou, u kterých nebyl zaznamenán předčasný porod, měly delší těhotenství.

Pro imunodeficitní osoby představuje toxoplazmóza skutečné riziko. Imunodeficience může být vrozená nebo získaná. Ze získaných forem imunoprese jsou nejdůležitější virus HIV a imunoprese vlivem léčby (např. imunoprese při transplantacích, cytostatická léčba). U imunosuprimovaných osob dochází k reaktivaci latentní toxoplazmózy. Tkáňové cysty ve svalech praskají a bradyzoiti se přeměňují na tachyzoity, kteří se množí a prostupují celým organismem. Příznaky onemocnění mohou být splenomegalie, myokarditida, encefalitida, pneumonie (Beattie, 1982, Gagne, 2001, Dubey, 2004, Montoya a Liesenfeld, 2004). U nemocných virem HIV může reaktivace toxoplazmózy způsobit meningoencefalitidu (Gagne, 2001) a je dokumentováno, že až 25 % pacientů s AIDS v USA trpí příznaky toxoplazmózy (Kasper a Buzoni-Gatel, 1998).

Přesný vztah mezi imunopresí a fatálním dopadem toxoplazmózy byl u myši prokázán v práci Djurkovic-Djakovic a Milenkovic (2001). K navození imunoprese byly použity léky dexamethason (DXM) a cortison-acetát (CA). Po sedmi týdnech byly myši infikovány prvokem *Toxoplasma gondii*. Mortalita byla u léčených myši 61,1 % (DXM) a 85 % (DXM+CA), u kontrolní skupiny 33 %, což byly signifikantní změny. Počty cyst se signifikantně lišily pouze ve druhé skupině, kde byl použit preparát DXM+CA.

### **2.2.2 Kongenitální toxoplazmóza**

Nejnebezpečnější forma toxoplazmózy je pro člověka kongenitální forma. Incidence kongenitální toxoplazmózy je v České republice 5 případů na 100 000 narozených dětí ročně (Kodym, 2001). Riziko přenosu toxoplazmózy je v prvním trimestru těhotenství 6 % ze všech infikovaných, posléze však velmi prudce stoupá. Ve druhém trimestru je riziko přenosu 40 % a ve třetím trimestru dosahuje dokonce hodnoty 72 % (Dunn, 1999). Nejvíce bývá poškozen plod v prvním trimestru. Může se objevit jak postižení centrální nervové soustavy, tak i viscerální postižení. Charakteristické postižení plodu jsou hydrocephalus, intrakraniální

kalcifikace a chorioretinis popsané v roce 1939 jako "klasická triáda" (Wolf et al., 1939) a dále pak ještě několikrát (Sabin et al., 1952, Miller et al., 1967, Koppe a Rothova 1989). Ačkoliv většina dětí narozená s kongenitální toxoplazmózou nemá viditelné známky choroby, projeví se téměř u 80 % z nich neurologické a oční problémy (Wilson, 1980, Saxon, 1973, Tenter et al., 2000).

V práci Hostomské et al. (1957) je spojována toxoplazmóza a mongoloismus. Proximální příčinou Downova syndromu je trisomie 21. chromozómu. U *toxoplasma*-pozitivních matek byla zjištěna velmi vysoká prevalence latentní toxoplasmosy (84 %) a u jejich mongoloidních dětí dosahuje tato prevalence (42 %), což v obou případech odpovídá zhruba třikrát větší četnosti výskytu toxoplazmózy než byla průměrná normální československá populace. Jak by měla toxoplazmóza ovlivnit Downův syndrom či jak by mohl Downův syndrom ovlivnit toxoplazmózu není zatím zcela jasné.

Ve zcela vyjimečných případech může dojít k reaktivaci toxoplazmózy a jejímu kongenitálnímu přenosu na plod. Například v práci Silviera et al. (2003) je popsán případ matky (38 let), která byla před 20ti lety léčena na chorioretinis a po této době porodila dítě s kongenitální toxoplazmózou, která způsobila u dítěte chorioretinis a kalcifikace v mozku. Matka nebyla pozitivní na protilátky typické pro akutní toxoplazmózu a měla vysoké titry IgG protilátek proti *Toxoplasma gondii*. Reaktivaci oční formy toxoplazmózy během těhotenství popisuje i další autor (Ramachi et al., 2002), ovšem zde nedošlo k přenosu *Toxoplasma gondii* na plod. Další případy reaktive oční formy toxoplazmózy během těhotenství popisuje v retrospektivní studii Garweg et al., 2005. Riziko kongenitálního přenosu tedy není možno zcela zanedbat ani v případě matek s chorioretinis provázenou vysokými titry specifických protilátek třídy IgG.

## 2.3 Vliv těhotenství na organismus matky

### 2.3.1 Těhotenství

Vývoj člověka je velmi podobný vývoji u ostatních savců. Začíná oplozením vajíčka spermií a pokračuje následným vývojem embrya. Tento vývoj se rozděluje na období embryonální a fetální. Embryonální období začíná oplozením, po kterém následuje období fetální (plodové), které začíná devátým týdnem od oplození a končí porodem.

Těhotenství provází řada **fyziologických** změn spojených se změnami funkce jednotlivých orgánových systémů (Schneider H., 1997). Účelem změn je přizpůsobit mateřský organismus specifickým požadavkům podmíněných těhotenstvím. V rámci oběhového systému dochází k úbytku periferního cévního odporu, příbytku cirkulujícího objemu krve a zvýšení srdečního výkonu. V souvislosti se zvýšeným srdečním výkonem dochází ve druhém trimestru k poklesu krevního tlaku a ve třetím trimestru k lehkému vzestupu krevního tlaku. V dolní polovině těla může dojít ke kompresi vena cava a značnému vzestupu venózního tlaku, který může mít za následek otoky dolních končetin a varikozitu dolní poloviny těla. V krvi dochází k poklesu hemoglobinu a hematokritu, což představuje značné zatížení pro metabolismus železa. U počtu leukocytů dochází ke zvýšení. Se zvýšenou tvorbou faktorů na srážení souvisí hyperkoagulabilita, která může vést až k rozsáhlým trombózám. Více než 50 % všech těhotných žen má dýchací potíže, vysvětlující se centrální stimulací respirace se zřetelným zvýšením dechového objemu. U ledvin dochází k vzestupu renálního prokrvení o 50 % a vzestupu filtrace o 35 %. Glykozurie ani proteinurie nejsou do určité míry v těhotenství patologické. Pod vlivem zvýšené produkce estrogenu dochází ke krvácení dásní a změnou pH slin i k nadměrné kazivosti zubů. Snížení motility žaludku a snížený svalový tonus v oblasti přechodu ezofagu do žaludku umožňuje reflux žaludečního obsahu do jícnu, což vyvolává pálení žáhy. Snížená peristaltika tlustého střeva má za následek zvýšenou dobu pasáže a tím způsobení zácpy. V první polovině těhotenství jsou obvyklé rané gestózy (zvracení), způsobené fyziologickým stavem organismu matky, trvají obvykle do 4. měsíce a bývají postiženy především prvorodičky (Roztočil A., 2001). Snížení tonu žlučníku progesteronem může vést k zahuštění žluči, stázi jejího odtoku a tvorbu žlučových kamenů. Funkční změnou jater je zvýšená tvorba globulinů a faktorů srážení (fibrinogen). Stoupá koncentrace prolaktinu v krvi a klesá produkce gonadotropinů FSH (folikostimulační hormon) a LH (luteinizační hormon). Dochází ke zvýšené činnosti štítné žlázy a zvýšení bazálního



metabolismu o 20 %. U příštích tělísek dochází ke zvýšené tvorbě parathormonu. Kůra nadledvin produkuje více kortizolu. Vzestup v krvi vykazují plazmatické lipidy, cholesterol a triacylglyceroly. Průměrný příbytek hmotnosti je 12,5 kg. Kůže se pigmentuje ukládáním melaninu a v druhé polovině se vlivem zvýšené hladiny kortizolu tvoří v oblasti břicha, prsů a kyčlí defekty v kolagenní vrstvě kůže - tzv. strie.

Hluboké změny jsou u ženy v těhotenství též v oblasti **psychické**. V prvním trimestru je typické především uvědomování si těhotenství jako změny vlastního já. Vlivem změn látkové a endokrinní výměny začne těhotná žena pociťovat neodolatelné chuti na některé pokrmy s abnormálními počty chuťovými a čichovými. Naproti tomu nesnáší jídla dříve oblíbená a její averze se může obracet i proti okolí. Charakteristická je emocionální labilita. Změny ve druhém trimestru jsou charakteristické vědomým vnímáním plodu a akceptací těhotenství. V tomto období dochází k vystupňování pozitivních zážitků a příjemných pocitů. Toto období je stavem emocionální stability, harmonie a duševní i tělesné aktivity (Fuchs V., 1985). V pozdním těhotenství přichází na řadu strach, nejistota a konfrontace s novými rodičovskými úlohami a zodpovědností. Dále pak strach o zdraví dítěte a obavy z porodu, což může být v extrémních případech vnímáno jako strach ze smrti. V průběhu těhotenství nejsou psychické onemocnění příliš časté. Psychotická onemocnění v těhotenství, při porodu a v šestinedělí spadají do oblasti exogenních (tělesně podmíněných) i endogenních poruch (schizofrenie, manio-depresivní psychóza atd.). Endogenní poruchy jsou v těhotenství velmi vzácné, mluví se dokonce o protektivním vlivu gravidity. Exogenní poruchy dominují před porodem a těsně po porodu.

### Gametogeneze a oplození

Během meiózy vznikají lidské pohlavní buňky - vajíčka a spermie. Tyto buňky obsahují haploidní počet chromozomů v porovnání s buňkami somatickými. Proces tvorby mužských a ženských gamet nazýváme gametogeneze. V mužských gametách určuje přítomnost X nebo Y chromozomu budoucí pohlaví zárodku.

V období ovulace ženy může dojít při kontaktu vajíčka a spermie k oplození. Tento kontakt probíhá většinou v ampule vejcovodu. Vajíčko potom dále putuje až do dělohy, kde dochází k jeho uhníždění ve stěně.

### Vývoj embrya a plodu

Prenatální období (doba do narození dítěte) je dlouhé průměrně 280dní. Prvních 8 týdnů nitroděložního života označujeme jako období embryonální (zárodečné). V této fázi dochází k diferenciaci jednotlivých částí těla a k utváření základů všech orgánů a tělních systémů. Autoři se shodují, že právě mezi třetím a osmým týdnem embryonálního vývoje dochází k nejpodstatějším změnám (Streeter, 1942, Shiota, 1991, Moore et al., 1994). Od 9. týdne nastává období fetální – jednotlivé orgány a tělní systémy se strukturálně i funkčně diferencují a postupně zahajují svoji činnost.

### 2.3.2 Imunita v těhotenství

Velmi významnou roli hraje pro dítě v období těhotenství a kojení obranný imunitní systém matky. Tělo matky musí bránit dítě před cizorodými látkami a patogeny a jednak musí dostatečně tolerovat dítě jako cizorodý element. Ve většině případů je dětský organismus matkou v době těhotenství tolerován. Prakticky totiž nedochází k mísení krevních oběhů a k velkému průniku lymfocytů matky do plodu a opačně. Bariéru mezi organismem matky a dítěte tvoří v těhotenství trofoblast - zárodečná část placenty, která brání průchodu aloreaktivních T lymfocytů. Tyto T lymfocyty neexprimují klasické MHC glykoproteiny I. třídy a nemohou být proto T buňkami rozpoznány. Na trofoblastu jsou exprimovány jiné glykoproteiny (HLA-G, HLA-E), které za normálních podmínek nevyvolávají imunitní reakci cytotoxických T buněk. Též se zdá, že aloreaktivní T buňky matky jsou aktivně tolerizovány kontaktem s malým množstvím buněk plodu, které pronikají do těla matky. V těhotenství proto dochází k utlumení  $T_H1$  imunitních mechanismů a aktivaci  $T_H2$  buněk, které spolu s B buňkami podmiňují protilátkovou imunitu. To vysvětluje, že jsou ženy v průběhu těhotenství citlivější k infekcím způsobeným intracelulárními parazity a zároveň mívají utlumeny projevy autoimunitních chorob (Hořejší a Bartůňková 2002). Například reumatoidní artritida nebo roztroušená skleróza je pravděpodobně ovlivňovaná IL-12 a TNF- $\alpha$ . Recentní práce Elenkova et al. (2006) ukazuje během třetího trimestru těhotenství snižování monocytické produkce  $T_H1$  typu. Produkce IL-12 byla snížena až třikrát, zatímco množství TNF- $\alpha$  bylo menší o 40 %. Dále byl sledován vzestup některých hormonů – kortisolu, NE, kalcitrolu (1,25-dihydroxyvitamín  $D_3$ ). Autor poukazuje na to, že existuje velká variabilita mezi jednotlivými osobami a studii je nutno provádět porovnáváním mezi imunitním stavem ženy během těhotenství a mimo něj.

Autoimunitní onemocnění se může poprvé manifestovat právě v období těhotenství (Rožtočil A., 2001). Příkladem je lupénka (*Lupus erythematoses disseminatus*). Toto

chronické onemocnění se vyskytuje převážně u mladých žen a první příznaky se mohou projevit v těhotenství. Během těhotenství může dojít ke stabilizaci, zhoršení nebo remisi lupénky. Na autoimunitní onemocnění revmatoidní polyartritidu má těhotenství většinou pozitivní vliv. Zmírnění potíží je dočasné a k návratu příznaků dojde většinou v průběhu druhého poporodního měsíce.

### 2.3.3 Šestinedělí a kojení

Po porodu a v období šestinedělí odeznívají změny způsobené během těhotenství (období puerperium). U většiny žen je to v období 6-8 týdnů po porodu, kdy dochází k mateřské fyziologické adaptaci na novou situaci po porodu (Roztočil, 2001). Ta je charakterizována návratem k netěhotnému stavu ženy, rozvojem kojení a dalším změnám. Regresivní (involuční) změny během šestinedělí spočívají téměř u všech orgánů k návratu do stavu před těhotenstvím. Děloha se zmenšuje, poranění pochvy a hráze se hojí. Hladiny prolaktinu během kojení potlačují sekreci folikostimulačního (FSH) a luteinizačního (LH) hormonu a brání ovulaci a návratu menstruace.

Peurerální psychická adaptace probíhá ve dvou fázích. Pasivní fáze, trvající 2-3 dny, je charakterizována pasivitou matky a její závislosti na okolí. Poté nastupuje aktivní fáze, kdy se žena začíná aktivně přizpůsobovat změněné životní situaci. Přechodné období deprese, nazývané také „poporodní blues“ ("blueperiod") se v prvních šesti dnech šestinedělí vyskytuje u 60 % rodiček. Objevuje se již 3.-4.den po porodu. Může se projevovat nevysvětlitelnou anorexií, plačtivostí, poruchami spánku, podrážděností a pocity zbytečnosti. Je způsobeno jednak změnami životní situace, ale také prudkými hormonálními změnami. Je to krátkodobá "uvolňující" deprese po porodním stresu. Spolupodílet se může poporodní únava, emoční zatížení a deprivace. V tomto období jsou velmi časté psychózy. V období 10-30 dnů po porodu se někdy vyskytují psychózy typu endogenní deprese (Fuchs, 1985).

Po porodu placenty dochází k poklesu hladin estrogenů a progesteronu, vedoucí k uvolnění sekrece prolaktinů z adenohipofýzy, který stimuluje produkci mléka aciny. Dráždění bradavek ústy sajícího novorozence vede ke zvýšené sekreci prolaktinu a oxytocinu z neurohipofýzy a podílí se tak na další tvorbě mléka. Kojení je velmi důležité pro matku a dítě. Na matku má prolaktin uklidňující a euforizační vliv a zmírňuje poporodní blues.

Vztah dítěte k matce je posilován blízkým tělesným kontaktem, pachem matky, chutí jejích bradavek, pohledem z očí do očí. Mléko a kolostrum obsahuje protilátky a ostatní

faktory chránící dítě před infekcí. Kolostrum je produkováno asi první dva dny a je charakteristické vysokým obsahem IgG protilátek a mírným projímavým účinkem (odstranění smolky z gastrointestinálního traktu novorozence).

Během kojení dítěte matkou dochází k přenosu protilátek. V práci (Oluseyi Oyedele et al., 2005) je popisován přenos protilátek proti splničkám. Pokud mají matky v době porodu pozitivní protilátky IgG proti spalničkám v krvi, 58 % dětí má tyto protilátky ve stáří 4 měsíce a pouze 3 % ve stáří 6-9 měsíců. Ve vzorku mateřského mléka se detekují IgA protilátky proti spalničkám, jejichž množství klesá a během dvou týdnů se dostává pod hranici množství, které je schopno ochránit dítě.

#### **2.3.4 Reaktivace parazitárního onemocnění během těhotenství**

Současný názor na možnost reaktivace toxoplazmózy během těhotenství je negativní. Změny v humorální ani v buněčné imunitě nejsou natolik výrazné, aby docházelo k reaktivaci toxoplazmózy. U těhotných žen s latentní toxoplazmózou nezaznamenal Biedermann et al., 1995 žádné signifikantní změny v humorální nebo buněčné odpovědi vedoucí k reaktivaci onemocnění. K tomu může dojít během těhotenství pouze u imunosuprimovaných žen, které mají hodnotu CD4+ lymfocytů menší než 200 buněk na mikrolitr.

Kongenitální přenos parazitárního onemocnění je u člověka častým jevem. Například v práci Torrico et al., 2005 je popisován kongenitální přenos parazita *Trypanosoma cruzi*, který způsobuje Chagasovu nemoc. Přenos z matky na dítě nastal u 5-6 % infikovaných žen. Chronické onemocnění Chagasovou chorobou nemělo v této práci žádný vliv na dítě a jeho zdraví. Moretti et al., 2005 předpokládá, že častější přenos bude nastávat pokud akutní fáze Chagasovy nemoci propukne v první polovině těhotenství. Popisuje navíc při kongenitálním přenosu u dítěte hepatosplenomegálii.

Dalším popsáným kongenitálním onemocněním způsobeným parazitem je malárie (Mukhtar et al., 2005). Kongenitální přenos je možný ve fázi reaktivace onemocnění. V Nigérii je popisována incidence kongenitální malárie 15,3 % způsobená prvokem *Plasmodium falciparum*.

Meinecke et al., 1999 popisuje reaktivaci viscerální leishmaniózy a její přenos na dítě. Jednalo se o *Leishmania infantum*, která byla diagnostikována u 16 měsíců starého dítěte. Matka měla pozitivní titry na leishmaniózu, ale nikdy neměla symptomatické příznaky.

Vzhledem k tomu, že se dítě od svého narození nikdy nedostalo do oblasti, kde by se mohlo nakazit přes vektora, byl případ uzavřen jako reaktivace a kongenitální přenos leishmaniózy.

U skotu může dojít k reaktivaci kokcií *Neospora caninum*. Příkladem reaktivace u skotu v době březosti. V práci Andrianarivo et al., 2005 je popsán případ reaktivace u skotu v době březosti u dříve infikovaných zvířat. V případě reaktivace je zvýšená hladina specifických protilátek a to především IgG<sub>2</sub>. Výsledky této práce potvrdily, že vzestup specifických protilátek proti *Neospora caninum* může být nepřímým indikátorem reaktivace latentní infekce.

Reaktivace parazitického helminta *Ancylostoma caninum* během březosti psa je dobře popsaným jevem (Arasu, 2001). Zvýšené hladiny estrogenu a prolaktinu během březosti a kojení mohou mít za následek aktivaci L3 larvy parazita a transmamární přenos. Během stresu, březosti se může reaktivovat další parazitický helmint *Toxocara canis* (Arasu, 1999).

## 2.4 Dítě

### 2.4.1 Růst a vývoj

#### 2.4.1.1 Postnatální období

Po narození nastává **novorozenecké období**, které trvá do ukončeného 28. postnatálního dne (Lebl J., 2003). Je to období adaptace jednotlivých tělních systémů na mimoděložní podmínky. Následuje **kojenecké období** (1 měsíc až 1 rok) charakterizované dramatickým somatickým, neuropsychickým a motorickým vývojem. **Batolecí období** se ohraničuje 1. a 3. narozeninami dítěte. Charakteristické pro postupné osamostatňování dítěte. Díky stále dokonalejší samostatné lokomoci se batole intenzivně seznamuje s okolním světem a vzhledem k rozvoji řeči se také posiluje a zdokonaluje komunikace s ostatními lidmi. Dále se dítě dostává do **předškolního období** (3-6 let), **školního období** (7-14 let), **období dospívání** (15-18 let). Od 18ti let je člověk považován za **dospělého**. Ve své práci se budu věnovat především období od narození do konce batolecího období (tj. do 3 let).

### 2.4.1.2 Novorozenec

Novorozenec je pro přežití ve vnějším světě vybaven řadou reflexů. Nejdůležitější pro něj je pátrací a sací reflex, umožňující příjem potravy. Má však již rozvinuté smyslové funkce, které mu zprostředkují kontakt s okolím, učí jej orientovat se v okolním prostředí a reagovat na rozdílné podněty. Tyto schopnosti se rozvíjejí na základě geneticky podmíněných, individuálně variabilních vloh, které se navenek projevují jako rozdílný temperament, adaptabilita a dráždivost. Ze smyslů má novorozenec dobře rozvinutý sluch a čich a je schopen těmito smysly v několika prvních týdnech po narození rozeznat svou matku. Sítnice je při narození dobře vyvinutá, ale čočka je málo pohyblivá a špatná je i zraková ostrost. S věkem se tyto zrakové schopnosti zlepšují. Strabismus (šilhání) je u novorozence častý, avšak většinou mizí do 3 měsíců věku.

### 2.4.1.3 První rok života

#### Psychosociální vývoj

V prvních týdnech života je hlavním prostředkem komunikace dítěte s okolím pláč. Reaguje jím na hlad, nepohodlí či přesytením podněty. Tento stav se začíná měnit okolo 12 týdnů stáří dítěte, kdy dítě začíná své pocity dávat najevo i jinak (úsměv, dotyk, dumláni apod.). Dítě se začíná spojovat podnět z prostředí s vhodnou motorickou odpovědí a tyto stereotypní reflexy soustavně doplňuje novými zkušenostmi (Lebl J. a Krásničanová K., 2003).

#### Periodizace dětského růstu

Člověk ve srovnání s jinými živočišnými druhy roste pomalu a dlouho. Zatímco u většiny savců po období rychlého postnatálního růstu bezprostředně následuje pubertální výšvih a pohlavní zralost, u člověka je mezi tato dvě růstově dramatická období vloženo období klidného růstu - dětství. Ve své práci se zabývám růstem do tří let, který se označuje jako infantilní růstové období. Začíná před narozením, ve druhé polovině nitroděložního života. Rozlišujeme zde **fetální růst a časný postnatální růst** v prvních dvou letech života. Fetální růst nejlépe dokumentuje porodní délka a hmotnost. U děvčat je průměrná délka  $49,7 \pm 2,9$  cm a hmotnost  $3244 \pm 460$  g, u chlapců je průměrná délka  $50,4 \pm 2,9$  cm a hmotnost  $3390 \pm 460$  g. V časném postnatálním růstu v prvních dvou letech života děti vyrostou v průměru 25 cm. V závěru infantilního růstového období dosáhnou děti přibližně poloviny své budoucí dospělé výšky (dívky v 18 měsících, chlapci ve 24 měsících věku). Během novorozeneckého období

přibere dítě průměrně 1100g. Normální porodní hmotnost se zdvojnásobí ve 4. měsíci věku a ztrojnásobí kolem jednoho roku věku dítěte.

#### **2.4.1.4 Druhý a třetí rok života**

##### Psychosociální vývoj

Po prvním roce věku dovolí samostatná chůze dítěti opouštět matku a zkoumat okolí. Přichází vývojový zlom, kdy si dítě začíná uvědomovat samo sebe a začíná být samostatné a nezávislé. Počínající nezávislost sebou přináší výchovné problémy, typické pro druhý rok dítěte. Spolu s vědomím sama sebe začíná dítě vnímat pocity druhých, vyvíjí se základ empatie. Vývoj těchto nových prvků chování a prožívání je zrání mozku. Ukončuje se myelinizace a všechny vrstvy mozkové kůry dosahují mezi 15- 24 měsíci věku synchronního stavu maturace. Také řeč se velmi výrazně vyvíjí. Po první nonverbální fázi se od 2 měsíců věku začíná vzájemná interakce mezi matkou a dítětem vokalizovat. V 6-10 měsících začíná dítě díky lepšímu ovládnutí orálních svalů žvatlat a opakovat slabiky. Fáze vrcholí ve 12 měsících, kdy dítě začne pociťovat potřebu užívat konkrétní slova k označení předmětů a činností. V 18 měsících užívá průměrně 20-50 slov.

Od konce druhého roku věku se dítě začíná učit manipulovat se symbolickým světem. Dítě vnímá svět převážně egocentricky, ve vztahu k vlastním přáním a potřebám. Nechápe vztah mezi příčinou a následkem a často jej mylně egocentricky interpretuje.

##### Růst mezi druhým a třetím rokem věku

Ve druhém roce vyrostou děti v průměru o 11-13 cm. Od dvou let je růstové období dětské stabilní a tato stabilita končí až začátkem puberty. Ve třetím roce je přírůstek výšky průměrně 7,5-9 cm za rok. Dítě přibývá váhově ročně asi o 2 kg. V batolecím období se uzavírá velká fontanela (12.-18. měsíci) a třetím rokem končí prořezávání mléčného chrupu (první mléčný zub se prořezává v 6.-8. měsíci).

## 2.4.2 Neuropsychický vývoj

Tabulka č. 1 Neuropsychický vývoj dítěte. Volně převzato od Buchance J., 1990.

Věk (měsíce)	Hybnost, poloha těla	Řeč, smysly, chování, hra
0-1	pokusy o zvednutí hlavy	rozezná světlo a tmu, fixuje krátce světelné předměty
2	udrží zdviženou hlavu v poloze na břiše	úsměv
3	v poloze na břiše se opírá se o předloktí, má zdviženou hlavu	
5	převrací se na bok a na břicho	uchopí cíleně hračku, předmět analyzuje ústy
6	převracení z břicha na záda	žvatlá slabiky
7	sedí samo	vyslovuje opakované slabiky
8	začíná lézt, sedí bez držení	rozumí některým slovům, napodobuje některé projevy dospělých
11	stojí chvíli bez držení	schopné vykonat potřebu do nočníku
12	chodí kolem nábytku, udělá první samostatné kroky	vysloví dvě slova s významem
13-15		slovní zásoba 5-20slov
16-18	uchopí tužku celou rukou	dětský žargon, 20-70 slov
22-24	tužku bere do prstů	hraje si mezi dětmi, v noci se nepočůrává
25-30	při chůzi střídá nohy, samo se nají bez polítky	zná 300-500 slov, umí krátkou básničku, kreslí kruh a obrysové tvary
31-36	zašněruje si boty	opakuje krátkou pohádku

## 2.4.3 Faktory ovlivňující vývoj dítěte a jeho zdravotní stav

Faktory ovlivňující **růst** jsou (Buchanec J., 1990):

- genetické - porodní hmotnost je normální, avšak tempo růstu je pomalejší
- endokrinní - deficit hormonů může vést k opoždění nebo zástavě růstu
- porucha růstu při kostních dysplaziích - heterogenní skupina spojená se změnou velikosti a formy těla
- porucha při chronických onemocněních - nejčastěji choroby srdce (často vrozené), nemoci ledvin a močových cest (chronická infekce), nemoci dýchacích cest, trávicího systému, jater atd.



Příčiny a mechanismy poruch **neuropsychického vývoje** (Hejcmanová, L., Průhová Š., 2003):

- perinatální nebo časně postnatální noxa (škodlivina) - vede k zánikům neuronů
- perinatální hypoxie a krvácení do centrální nervové soustavy
- hyperbilirubinémie
- infekce
- poruchy vnitřního prostředí
- vrozené a geneticky podmíněné choroby
- další faktory

#### 2.4.4 Častá onemocnění dětí do tří let

Ve své práci se budu zabývat některými dětskými nemocemi a proto je důležité získat o nich alespoň základní informace. Jsou zde uvedeny především nemoci, na které jsem se soustředila a nemoci, které uváděly matky v dotazníku (viz kapitola 3.2).

##### Infekční onemocnění

Jedny z nejčastějších infekčních onemocnění jsou následující: **střevní onemocnění**. Tato onemocnění jsou způsobená jednak alimentární intoxikací (otravou z potravin), salmonelózou (nejčastěji v ČR *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*), břišním tyfem a paratyfem B, bacilární úplavicí (u nás dominuje původce *Shigella sonnei*), průjmovým onemocněním vyvolaným viry, nákazou vyvolanou enteroviry a dalšími (Havlík J., 2002). Infekcí mohou být též způsobeny **respirační nákazy** jako je streptokoková angína (původce *Streptococcus pyogenes*), virus Ebstein-Barrové, chřipka (vyvolaná virem chřipky, může vést především u malých dětí ke komplikacím jako jsou záněty středouší, vedlejších dutin, laryngitidy a pneumonie) a dalšími patogeny. **Exantémové nákazy**, typické pro nápadné změny na kůži jsou též infekčního původu. Z uvedených v dotazníku to je spála (*Streptococcus pyogenes*) a neštovice (*Herpesvirus varicella-zoster*).

### Onemocnění dýchacích cest

U dětí je velmi častá akutní **bronchitida** (zánět průdušek), jejímiž původci jsou viry a bakterie. Z vážných onemocnění je to **pneumonie** (zápal plic), které může být způsobeno bakteriemi, viry, chlamydiemi (*Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*), mykoplazmou (*Mycoplasma pneumoniae*), pneumocystou (*Pneumocystis carinii*) a dalšími (Zapletal A., 2002).

### Ušní, nosní, krční nemoci

Recidivující **středoušní záněty** (otitis media recidivans) jsou nejčastější v prvních dvou letech života. Příčin je několik a mimo jiné mezi ně patří nedostatečně vyvinutý imunitní systém a alergie (Fajstavr J., Vyhnánková L., 2002).

### Oční onemocnění

**Šilháním** (strabismem) je postiženo 4-7 % populace. Po šestém měsíci věku dítěte je šilhání již patologické. V současné době je strabismus považován za funkční senzorio-motorickou poruchu, která může být způsobena refrakčními vadami, poruchou zrakové dráhy či okohybných svalů nebo poruchou mozku a dalšími (Brůnová B., Filouš A., 2002). **Tupozrakost** (amblyopatie) nalézáme u 50 % šilhajících. U dětí s jednostrannou vizuální supresí dochází u šilhajícího oka k trvalé ztrátě zraku. U dítěte se zraková ostrost prudce narůstá do jednoho roku a plnohodnotně dítě vidí ve čtyřech letech. Pokud je porušen poměr mezi délkou oka a jeho optickým systémem vzniká **dalekozrakost** (hypermetropie) nebo **krátkozrakost** (myopie). Až 70 % novorozenců má zúžený až uzavřený slzný kanálek a předpokládá se, že v prvním roce života se zprůchodní spontánně. Někdy se tomu tak nestane vinou **zánětu slzných kanálků**, který se pak léčí průplachem.

### Kožní onemocnění

Nejčastějšími kožními onemocněními jsou **dermatomykózy** (Čapková Š., 2002). Rozvoj nemoci je umožněn kontaktem s patogenem a zejména oslabením obranyschopnosti organismu. Velmi častým onemocněním postihující už děti kojeneckého věku je **seboroická dermatitida kojenců** (seboroický ekzém). Její projevy se mohou vyskytovat v celé škále od recidivujících subakutních až po chronickou dermatitidu a jsou závislé na klimatických podmínkách a psychických faktorech. Podstata choroby není známá a je to pravděpodobně geneticky determinované onemocnění mazových žláz.

### Atopie (vznik a průběh alergického onemocnění)

Vznik a průběh alergie může být velmi výrazně ovlivněno prostředím, příkladem může být zvýšení alergizujícího účinku pylových zrn dieslovým motorem. Vznik alergického onemocnění je interakcí mezi geneticky danou dispozicí a vlivů z prostředí. Pokud dojde u geneticky predisponovaného jedince ke kontaktu s alergenem může dojít k senzibilizaci (a to především u dětí do 1 roku života). K nejčastějším projevům alergie postihujícím až 10% dětí je **atopický ekzém** (Špičák V., 2002). Příčinu výskytu tohoto onemocnění hledáme v genetických predispozicích (polygenní charakter), dysregulaci imunitních mechanismů (uplatňují se mechanismy pozdní alergické reakce, zvýšená tvorba protilátek IgE), porušení bariérové funkce kůže (nižší množství ceramidů). Atopickému ekzému je možné přecházet dlouhodobým kojením dítěte, hypoalergenní výživou do 12. měsíce věku dítěte, úpravou životního prostředí dítěte. Děti s atopickým ekzémem mají 50 % predispozici pro další onemocnění - **průduškové astma**. Druhou nejrizikovější skupinou dětí, u kterých dochází k manifestaci astmatu, jsou děti trpící **alergickou rýmou**. Projevy alergie jsou kožní, dýchací, oční, alergické exantémy a otoky. Alergie může být na celou řadu potravin, na hmyzí bodnutí, na pyly, roztoče, plísňe, zvířata atd.

## 3. Vliv latentní toxoplazmózy na děti

### 3.1 Cíl práce

Cílem práce bylo ověřit, zda latentní toxoplazmóza matky může ovlivnit zdravotní stav a chování jejího dítěte. Doposud byl zjištěn vliv latentní toxoplazmózy na pohlavní index dítěte a na pomalejší vývoj plodu v 16. týdnu těhotenství (viz kapitola 2.2 Toxoplazmóza a její vliv na člověka). Naším cílem bylo charakterizovat změny způsobené latentní toxoplazmózou matky u dětí do tří let.

### 3.2 Materiál a metody

#### 3.2.1 Soubor matek

Testovaný soubor dat byl získán rozesláním dotazníků matkám, které navštěvovaly během svého těhotenství dvě pražské ordinace soukromé společnosti GEST, sídlící na Praze 5 a na Praze 8. Jedná se o retrospektivní studii, v níž byly osloveny ženy, které navštěvovaly tuto kliniku v průběhu svého těhotenství. Za pomoci pracovníků této kliniky bylo odesláno celkem 1095 dotazníků. Každý dotazník připadá na jedno dítě a to se týká i dvojčat. Zpět se poštou vrátilo 346 dotazníků (31,6 %). Všechny údaje byly anonymizovány a celý výzkum byl prováděn v souladu se současnou legislativou a především s aktuálním zákonem na ochranu osobních informací.

Ženy byly v průběhu těhotenství rutinně vyšetřeny na přítomnost protilátek proti *Toxoplasma gondii*. Materiál byl zpracován v diagnostickém centru KlinLab s.r.o. Přítomnost protilátek byla zjišťována metodou nepřímé imunofluorescence (NIF). U většiny osob známe také titer protilátek. Do pokusu byly zařazeny ženy pouze s latentní toxoplazmózou, ne v akutní fázi toxoplazmózy.

#### 3.2.2 Vyšetření na toxoplazmózu - metoda nepřímé imunofluorescence

Ženy byly během těhotenství vyšetřovány na toxoplazmózu. Infekce toxoplazmózou se diagnostiku průkazem specifických protilátek v krevním séru. Pro vyšetření se odebírá 3-5 ml srážlivé krve.

Na našem souboru osob byla pro průkaz protilátek použita metoda nepřímé imunofluorescence (označovaná též NIFR, NIF nebo NFR). Principem této metody je vazba protilátky značené fluorochromem na antigen. Komplex protilátky s fluoreskujícím barvivem se nazývá konjugát. Do samotné reakce se jako konjugát obvykle používá prasečí

gamaglobulin proti globulinové frakci séra značený například FITC (isothiokyanatan fluorescein). Antigen je připravován z peritoneálního exudátu infikovaných myší. Jedná se o metabolický antigen, který je uvolňován látkovou výměnou živých prvoků *Toxoplasma gondii*. Odpovídající ředění vyšetřovaného séra se přidá k antigenu na podložní skličku a inkubuje se ve vlhké komůrce 30 minut při 37 °C. Po vyjmutí z vlhké komůrky se podložní sklička opláchnou v tekoucí vodě a nechají osušit. Na preparát se navrství roztok konjugátu s Evansovou modří (za účelem odstranění nespecifické fluorescence), 30 minut se vše inkubuje a poté opět následuje propírání. Reakce se odečítá ve fluorescenčním mikroskopu a určuje se intenzita fluorescence. Za pozitivní se považuje reakce, kdy alespoň periferie zoitů září jasně žlutozeleně. Za negativní se považuje reakce, kdy ani obrysy buněk nejeví známky fluorescence (Jíra a Rosický, 1983).

### 3.2.3 Obsah dotazníku

Obsahem dotazníku byli podrobné otázky týkající se matky a dítěte.

Na začátku dotazníku byli **základní údaje** o dítěti - datum a čas narození, pohlaví a porodní váha.

Dále byl dotaz na **zdravotní stav matky** během těhotenství v průběhu všech trimestrů. Možnost odpovědi byla v každém trimestru ano nebo ne.

- zvracení po ránu
- zvracení po celý den
- bolest a napětí v prsou
- zvýšené nucení k močení
- zvýšená unavenost
- vysoký tlak
- těhotenská cukrovka
- otoky nohou
- křeče
- bílkoviny v moči

Následoval stručný **psychologický dotazník pro matku**, který se skládal ze dvou částí - nálady před otěhotněním a po otěhotnění. Všechny psychické stavy byly vyjádřeny ve škále 1 až 7 (1=rozhodně ne, 7=rozhodně ano).

- sebedůvěra, sebejistota
- citlivost, zranitelnost
- starosti, obavy
- agresivita
- deprese
- netrpělivost
- potřeba být sám
- potřeba být ve společnosti
- optimismus
- žárlivost, podezíravost
- těkavost, neklid
- veselost, dobrá nálada

Dále následoval soubor tabulek (viz tabulka 2, 3, 4, 5, 6).

Tabulka č. 2 Otázky na průběh těhotenství

Měla jste během těhotenství zvýšenou chuť na některá jídla?	ANO x NE
Cítila jste během těhotenství odpor k nějakým jídlům?	ANO x NE
Jak dlouho jste se snažila otěhotnět?	
Byl Váš menstruační cyklus před otěhotněním pravidelný (bez antikoncepce)?	ANO x NE
Pokud ano, uveďte prosím jeho délku (od prvního dne menstruace do prvního dne další menstruace).	
Brala jste před otěhotněním nějaké antikoncepční tablety?	ANO x NE
Pokud ano, jak dlouho před otěhotněním jste je vysadila?	
Porod Vašeho dítěte byl:	předčasný, v termínu, dítě přenášeno
Porod Vašeho dítěte byl:	vyvolávaný, spontánní
Brala jste během těhotenství vitamínové tablety?	ANO x NE
Brala jste je dále i po narození dítěte?	ANO x NE
Kojila jste Vaše dítě?	ANO x NE
Plně kojené dítě (bez příkrmování):	do ... měsíce
Kojené dítě včetně příkrmování:	do ... měsíce
Z jakého důvodu jste přestala úplně kojit?	
Pokud jste nekojila, uveďte prosím důvod:	

Tabulka č. 3 Růstu a spánek dítěte

stáří dítěte	6 týdnů	3 měsíce	6 měsíců	1 rok	1 a ½ roku	3 roky
váha						
výška						
kolikrát se dítě budilo v noci						
kolikrát dítě spalo přes den a jaká byla průměrná délka jednoho spánku přes den						

Tabulka č. 4 Psychomotorický vývoj dítěte

Ve kterém měsíci Vaše dítě už udrželo samo hlavičku?	
Kdy se poprvé Vaše dítě začalo samo otáčet na bříško?	
Od kdy Vaše dítě samo sedělo?	
Ve kterém měsíci začalo Vaše dítě lézt ?	
Ve kterém měsíci začalo Vaše dítě chodit?	
Kdy začalo Vaše dítě používat ve větší míře ke komunikaci jednotlivá slova?	
Od kdy používalo Vaše dítě tužku nebo pastelky?	
V kterém měsíci se prořezal Vašemu dítěti 1. zub?	
Kdy začalo Vaše dítě jezdit na šlapací tříkolce nebo na kole?	

Tabulka č. 5 Zdravotní stav dítěte

Prodělalo do 3 let věku Vaše dítě některé ze jmenovaných onemocnění ?		
	neštovice	ANO x NE
	spála	ANO x NE
	angína	ANO x NE
	zánět střed. ucha	ANO x NE
	střevní onemocnění	ANO x NE
	zápal plic	ANO x NE
	zánět průdušek	ANO x NE
Má Vaše dítě alergii?		ANO x NE
Trpí Vaše dítě kožním onemocněním?		ANO x NE
Je některá nemoc, kterou Vaše dítě prodělává nebo prodělávalo opakovaně?		ANO x NE
Mělo Vaše dítě doposud nějaké problémy se zrakem?		ANO x NE
Chodila jste s dítětem někdy na speciální zdravotní cvičení?		ANO x NE
Cvičila jste na radu lékaře s Vaším dítětem doma nějaké cviky?		ANO x NE

Následovaly otázky na chování dítěte do tří let (tab. č. 6) Na stupnici bylo možno zaškrtnout možnosti od 1 do 7 (1=rozhodně ne, 7=rozhodně ano).



Tabulka č. 6 Chování dítěte

Jaké bylo Vaše dítě v období do 3 let a co se u něj projevovalo?	
více plaché, bázlivé než jeho vrstevníci	
více nebojácné než jeho vrstevníci	
více vzteklé a vzdorovité než jeho vrstevníci	
více citlivé, zranitelné než jeho vrstevníci	
více agresivní než jeho vrstevníci	
více mazlivé než jeho vrstevníci	
chytřejší než jeho vrstevníci	
veselejší než jeho vrstevníci	
společensštější než jeho vrstevníci	
zvýšené dominantní chování než jeho vrstevníci	
vyšší obliba nových situací než jeho vrstevníci	
větší smysl pro pořádek než jeho vrstevníci	
větší smysl pro spolupráci než jeho vrstevníci	
větší schopnost napodobovat chování druhých než jeho vrstevníci	

Poslední otázky se týkaly dosaženého vzdělání matky v době porodu a stáří otce v době porodu. Tato data byla přidána k základním údajům. Stáří otce bylo během rozesílání dotazníku přidáno, takže není dostupné u všech dat.

### 3.2.4 Průběh testování

Dotazníky byly pomocí spolupráce s ordinacemi společnosti Gest rozeslány poštou pacientkám. Pacientky doma dotazník vyplnily a odeslaly v přiložené obálce zpět. Zasláné výsledky pracovnice Gestu anonymizovaly a v této podobě nám je předaly ke zpracování.

### 3.2.5 Statistické zpracování

Data z dotazníků byla statisticky zpracována v programu Statistica verze 6.0.

Psychologický profil matky před a během těhotenství, růst a spánek dítěte, psychomotorický vývoj dítěte a chování dítěte do tří let byly testovány pomocí GLM (General Linear Models) testu. V kapitole 3.3.3 Psychologický profil matky před otěhotněním byla ve statistickém testu GLM dosazena jako kovariáta binární veličiny pohlaví dítěte, umělé oplození a snaha otěhotnět (t.j. počet měsíců od rozhodnutí otěhotnět do otěhotnění, spojitá veličina). Při testování psychologie matky během těhotenství byla jako kovariáta dosazena spojitá veličina věk matky, binární veličiny pohlaví dítěte a umělé oplození. Cílová proměnná byla psychologie matky před a během těhotenství a vysvětlující proměnná TOXO (binární proměnná označující přítomnost nebo nepřítomnost latentní toxoplazmózy matky).

V kapitole 3.3.5 Růst a spánek dítěte byla do použitého testu GLM při testování růstu dítěte jako kovariáta dosazena proměnná věk matky. Při testování spánku dítěte byla jako kovariáta dosazena proměnná pohlaví dítěte a počet porodů. V kapitole 3.3.6 Psychomotorický vývoj dítěte byla do testu GLM jako kovariáta dosazena proměnná věk matky. V kapitole 3.3.8 Chování dítěte do tří let byla jako kovariáta dosazena veličina věk matky a pohlaví dítěte a to opět v testu GLM.

V kapitole 3.3.5 Růst a spánek dítěte byly pro testování vlivu latentní toxoplazmózy matky na růst dítěte (hmotnosti a výšky) použit test opakovaného měření ANOVA (Repeated measures ANOVA).

Ostatní testované proměnné byly testovány pomocí Log-lineární analýzy frekvenčních tabulek (Log-Linear Analysis of frequency tables). Testoval se zde vliv hlavních faktorů i interakcí těchto faktorů. V případě použití další metody je tato skutečnost uvedena a posána.

Ve všech testováních byly odstraněny extrémní hodnoty větší než 2,5 násobek směrodatné odchylky. Počet odstraněných dat nebyl větší než 10 % z celkového počtu případů. Rozdíly ve sledovaných prvcích byly považovány za signifikantní, pokud byla hladina významnosti ( $p$ ) menší než 0,05. Protože náš pokus týkající se vývoje dětí od toxo-negativních a toxo-pozitivních matek byl explorační výzkum nedělala se v rámci statistických testů Bonferroniho korekce.

### 3.3 Výsledky

#### 3.3.1 Základní údaje

Prevalence toxoplazmózy všech oslovených žen z ordinace Gest (celkový počet 1095 žen) byla 18,9 %. Celkem se vrátilo 346 dotazníků. Toxo-pozitivních matek bylo 52 (15,2 %), což znamená, že ženy s latentní toxoplazmózou odpovídaly na dotazník méně často, tento rozdíl však nebyl v testu difference (Difference test) statisticky signifikantní ( $p=0,147$ ).

Věk matek, které měly latentní toxoplazmózu nebyl signifikantně jiný než věk matek z kontrolní skupiny ( $p=0,2868$ ,  $F=1,14$ ). Jako statistický test byl použit GLM.

Binární veličina umělé oplození (t.j. účast v programu asistované reprodukce) nebyla závislá na proměnné toxo, toxo-pozitivní i toxo-negativní matky se nelišily v pravděpodobnosti umělého oplození ( $p=0,785$ ), pravděpodobnost umělého oplození však rostla s věkem matky ( $p<0,0001$ ). V tomto testování byla použit statistický test logistická regrese. V celém souboru vrácených dotazníků nebylo pohlaví dítěte závislé na latentní toxoplazmóze matky ( $p=0,7878$ ) ani na umělém oplození ( $p=0,3804$ ). Opět byla použita logistická regrese.

Ze všech 346 vrácených dotazníků bylo 9 dvojic dvojčat. Mezi dětmi od toxo-pozitivních žen nebylo žádné dvojče, ale tato odlišnost nebyla statisticky signifikantní ( $p=0,67$ , testováno Fisherovým exaktním testem v programu StatXact-4).

Z celkového počtu 346 dotazníků bylo 52 matek uměle oplodněno (15 %). Z uměle oplodněných žen mělo 40 matek jedno dítě a 6 mělo dvojčata. Věk matky a umělé oplození bylo testováno GLM testem a pozitivně korelovalo s pravděpodobností mít dvojčata (věk matky a dvojčata  $p=0,0011$ ,  $F=2,3439$ , umělé oplození a dvojčata  $p<0,0001$ ,  $F=37,2441$ ). Z 52 uměle oplodněných žen bylo 8 toxo-pozitivních (15,4 %).

Prvorodiček bylo 220 (63,6 % dotazníků). 124 (35,8 %) žen mělo před porodem jedno dítě, 17 žen (4,9 %) dvě děti a 3 ženy (0,86 %) tři děti. Prvorodičky měly prevalenci toxoplazmózy 8 %. Při použití logistické regrese nebyla prevalence prvorodiček statisticky signifikantně odlišná u toxo-pozitivních a toxo-negativních matek ( $p=0,4901$ ).

Tabulka č.7 Rozdíly v základních údajích u *toxoplasma*-pozitivních a *toxoplasma*-negativních žen

	TOXO-negativní matky			TOXO-pozitivní matky			F	p
	N	průměr	SD	N	průměr	SD		
věk	290	30,06	3,93	52	30,69	3,87	1,1400	0,2868
počet porodů	290	0,47	0,63	52	0,54	0,64	0,4767	0,4904
počet potratů	290	0,27	0,60	52	0,37	0,82	1,0945	0,2962

Jak vyplývá z tabulky č.7 nezaznamenali jsme žádné statisticky signifikantní rozdíly ve věku, počtu porodů a počtu potratů u *toxoplasma*-pozitivních a *toxoplasma*-negativních žen. Průměrný věk porodu byl 30 let ( $p=0,2868$ ,  $F=1,14$ ). Počet porodů byl asi 0,5 na jednu ženu ( $p=0,4904$ ,  $F=0,4767$ ). Počet potratů byl u *toxoplasma*-negativních žen 0,3 a 0,4 u *toxoplasma*-pozitivních žen, ale tento rozdíl testovaný logistickou regresí nebyl signifikantní ( $p=0,2996$ ).

### 3.3.2 Zdravotní stav matky během těhotenství

Dále jsme se věnovali odlišnosti zdravotního stavu v průběhu těhotenství u *toxoplasma*-pozitivních a *toxoplasma*-negativních žen. Tabulka č.8 ukazuje počty výskytů daného zdravotního problému, přičemž pro zjednodušení jsou všechny tři trimestry sloučeny. V tabulce jsou uvedeny všechny případy, kdy alespoň jednou měla žena během těhotenství daný zdravotní problém.

Tabulka č.8 Zdravotní problémy toxo-pozitivních a toxo-negativních žen během těhotenství testované pomocí Log-lineární analýzy.

	četnosti odpovědí				interakce s			
	NE		ANO		pohlavím dítěte		TOXO	
	Toxo-negativní	Toxo-pozitivní	Toxo-negativní	Toxo-pozitivní	chi kvadrát	p	chi kvadrát	p
Zvracení po ránu	212 (85,1 %)	37 (14,9 %)	83 (83,8 %)	16 (16,2 %)	3,334	0,0679	0,2816	0,5957
zvracení po celý den	256 (85 %)	45 (15 %)	40 (83,2 %)	8 (16,8 %)	0,4699	0,4930	0,2968	0,5859
bolest a napětí v prsou	148 (86 %)	24 (16 %)	147 (83,5 %)	29 (16,5 %)	0,0923	0,7613	0,1849	0,6672
zvýšené nucení k močení	50 (87,7 %)	7 (12,3 %)	245 (84,2 %)	46 (15,8 %)	0,4438	0,5053	0,1542	0,6946
zvýšená unavenost	63 (86,3 %)	10 (13,7 %)	233 (84,4 %)	43 (15,6 %)	0,1752	0,6755	0,0122	0,9121
vysoký tlak	274 (85 %)	48 (15 %)	22 (81,5 %)	5 (18,5 %)	1,3596	0,2436	0,699	0,4031
těhotenská cukrovka	278 (85 %)	49 (15 %)	18 (81,8 %)	4 (18,2 %)	0,1208	0,7282	0,4781	0,4893
otoky nohou	179 (83,6 %)	35 (16,4 %)	117 (86,7 %)	18 (13,3 %)	1,1920	0,2749	0,3886	0,5330
Křeče	216 (84,7 %)	39 (15,3 %)	80 (85,1 %)	14 (14,9 %)	0,9150	0,3388	0,0065	0,9357
Bílkoviny v moči	281 (85,2 %)	49 (14,8 %)	13 (81,3 %)	3 (18,7 %)	0,0081	0,9283	0,0584	0,8091

df=1 Pro názornost byly sloučeny všechny tři trimestry.

Pokud jsme sloučili všechny trimestry a jako odpověď ano jsme počítali, že žena alespoň v jednom trimestru měla daný zdravotní problém, vyšlo nám při testování log-lineární analýzou, že není rozdíl mezi zdravotními problémy u toxo-pozitivních a toxo-negativních žen (viz tabulka č. 8).

Pomocí log-lineární analýzy byly jednotlivé zdravotní problémy během všech tří trimestrů testovány odděleně a sledovalo se, zda se liší skupiny matek s latentní toxoplazmózou a kontrolní skupina. Testoval se model: daný zdravotní problém x latentní toxoplazmóza matky x pohlaví dítěte.

Tabulka č.9 Zdravotní problémy během těhotenství testované log-lineární analýzou

	trimestr	interakce s			
		pohlavím dítěte		TOXO	
		chí kvadrát	p	chí kvadrát	p
zvracení po ránu	1.	4,1695	0,0412	0,3807	0,5372
	2.	0,6243	0,4295	1,4779	0,2241
	3.	3,0262	0,0819	1,7258	0,1889
zvracení po celý den	1.	0,6793	0,4098	0,0391	0,8433
	2.	0,3882	0,5332	0,9683	0,3251
	3.	0,0936	0,7597	0,2323	0,6298
bolest a napětí v prsou	1.	0,0328	0,8562	0,6827	0,4087
	2.	2,3518	0,1251	0,0936	0,7596
	3.	4,8255	0,0280	0,8702	0,3509
zvýšené nucení k močení	1.	0,0048	0,9448	0,9161	0,3385
	2.	3,6990	0,0544	1,3675	0,2422
	3.	0,1570	0,6919	0,3329	0,5640
zvýšená unavenost	1.	0,0631	0,8017	0,2501	0,6170
	2.	0,2312	0,6306	2,2244	0,1358
	3.	0,0012	0,9721	0,1173	0,7320
vysoký tlak	1.	1,1442	0,2848	1,7342	0,1879
	2.	0,1744	0,6762	0,0510	0,8213
	3.	1,0184	0,3129	0,8625	0,3530
těhotenská cukrovka	1.	---	---	---	---
	2.	0,2876	0,5918	4,8314	0,0279
	3.	0,0869	0,7682	0,7968	0,3721
otoky nohou	1.	0,1894	0,6634	0,0671	0,7956
	2.	0,2386	0,6252	0,8957	0,3439
	3.	1,2746	0,2589	0,2777	0,5982
křeče	1.	3,0272	0,0819	0,9882	0,3202
	2.	0,2467	0,6194	0,0033	0,9542
	3.	0,2554	0,6133	0,0239	0,8771
bílkoviny v moči	1.	0,0121	0,9126	0,0635	0,8010
	2.	0,0120	0,9128	1,7172	0,1901
	3.	0,5212	0,4703	0,0607	0,8054

df=1

Při testování zdravotních problémů matky během těhotenství byly zjištěny některé signifikantní nebo signifikanci se blížíící efekty studovaných faktorů pohlaví dítěte a toxoplazmóza (viz tabulka č. 9). Ženy s latentní toxoplazmózou měly statisticky signifikantně méně často těhotenskou cukrovku (chí kvadrát=4,8314, p=0,0279). Ženy, které čekaly dítě ženského pohlaví měly statisticky signifikantně častější problém se zvracením po ránu v 1. trimestru (chí kvadrát=4,1695, p=0,0412) a statisticky méně často bolest a napětí v prsou ve 3. trimestru (chí kvadrát=4,8255, p=0,028) a trend k méně častému nutkání k močení ve 2. trimestru (chí kvadrát=3,699, p=0,0544).

### 3.3.3 Nálady matky před a během těhotenství

Pokusili jsme se prokázat vliv latentní toxoplazmózy matky na nálady matky během těhotenství. Testovali jsme odlišnost nálad matky pomocí GLM statistického testu a jako kovariátu jsme dosadili při testování nálad matky před otěhotněním binární veličiny pohlaví dítěte, umělé oplození a snaha otěhotnět (t.j. počet měsíců od rozhodnutí otěhotnět do otěhotnění, spojitá veličina). Při testování vlivu toxoplazmózy na nálady matky během těhotenství byla jako kovariáta dosazena spojitá veličina věk matky, binární veličiny pohlaví dítěte a umělé oplození.

*Tabulka č.10 Nálady matky před otěhotněním*

	Od kontrolních matek			Od toxo- pozitivních matek			F	p
	N	průměr	SD	N	průměr	SD		
sebedůvěra, sebejistota	222	4,76	1,43	39	4,90	1,62	0,2739	0,6012
citlivost, zranitelnost	225	3,90	1,58	40	3,70	1,71	1,3343	0,5375
starosti, obavy	223	3,77	1,73	40	3,45	1,77	1,1250	0,2898
agresivita	216	1,50	0,91	38	1,39	0,68	0,4688	0,4942
deprese	220	2,02	1,56	39	2,18	1,78	0,3923	0,5316
netrpělivost	219	3,10	1,80	39	3,08	1,91	0,0000	1,0000
potřeba být sám	221	2,26	1,49	40	2,53	1,52	1,0303	0,3111
potřeba být ve společnosti	224	4,55	1,49	40	4,70	1,29	0,3071	0,5800
optimismus	225	5,22	1,41	39	5,26	1,29	0,0056	0,9406
žárlivost, podezíravost	217	1,89	1,41	40	1,63	0,87	1,2878	0,2575
těkavost, neklid	219	2,21	1,47	39	2,05	1,34	0,3729	0,5420
veselost, dobrá nálada	228	5,37	1,31	38	5,50	1,22	0,2915	0,5897

V tomto testu bylo možné vybrat hodnocení od 1 do 7, kdy 1 znamenala rozhodně ne, 7 rozhodně ano.

Před těhotenstvím se ukázal signifikantní vliv kovariáty umělé oplození (tab. č. 11) na citlivost ( $p=0,0146$ ,  $F=6,048$ ), starosti ( $p=0,0044$ ,  $F=8,25$ ), depresi ( $p=0,0171$ ,  $F=5,7587$ ), netrpělivost ( $p=0,0016$ ,  $F=10,2097$ ), optimismus ( $p=0,0139$ ,  $F=6,135$ ) a žárlivost ( $p=0,0055$ ,  $F=7,8378$ ).

Tabulka č. 11 Vliv veličiny umělé oplození na nálady matky před otěhotněním:

	umělé oplození			
	NE	ANO	F	p
citlivost	3,741	4,308	6,048	0,0146
starosti	3,625	4,333	8,250	0,0044
deprese	1,951	2,480	5,759	0,0171
netrpělivost	2,977	3,820	10,210	0,0016
optimismus	5,319	4,765	6,135	0,0139
žárlivost	1,854	2,137	7,838	0,0055

V tomto testu bylo možné vybrat hodnocení od 1 do 7, kdy 1 znamenala rozhodně ne, 7 rozhodně ano.

Tabulka č. 12 Nálady matky během těhotenství

	Od kontrolních matek			Od toxo-pozitivních matek			F	p
	N	průměr	SD	N	průměr	SD		
							sebedůvěra, sebejistota	246
citlivost, zranitelnost	272	4,75	1,55	50	4,92	1,91	0,5966	0,4405
starosti, obavy	273	4,63	1,68	50	4,90	1,79	1,3366	0,2485
agresivita	259	1,58	1,17	49	1,37	0,86	1,3563	0,2451
deprese	262	2,05	1,51	50	2,54	1,90	4,6150	0,0325
netrpělivost	269	2,95	1,66	50	2,80	1,86	0,2025	0,6530
potřeba být sám	262	2,46	1,58	50	2,50	1,53	0,0062	0,9374
potřeba být ve společnosti	267	4,28	1,50	50	4,42	1,31	0,4939	0,4827
optimismus	265	5,38	1,36	51	5,35	1,16	0,0398	0,8420
žárlivost, podezřívavost	262	1,88	1,35	50	1,66	1,08	1,1229	0,2901
těkavost, neklid	264	2,30	1,49	50	2,04	1,40	1,0761	0,3004
veselost, dobrá nálada	267	5,41	1,33	51	5,37	1,30	0,0478	0,8272

V tomto testu bylo možné vybrat hodnocení od 1 do 7, kdy 1 znamenala rozhodně ne, 7 rozhodně ano.

Během těhotenství byl zjištěn signifikantní vliv latentní toxoplazmózy na pocit deprese matky ( $p=0,0325$ ,  $F=4,615$ ). Ženy s latentní toxoplazmózou měly signifikantně větší sklon k pocitu deprese. Umělé oplodnění mělo signifikantní vliv na starosti ( $p=0,0083$ ,  $F=7,049$ ) a veselost ( $p=0,0336$ ,  $F=4,554$ )(tab. č. 13). A kovariáta věk matky měla vliv na depresi ( $p=0,0197$ ,  $F=5,4984$ ) a na potřebu být ve společnosti ( $p=0,0284$ ,  $F=4,849$ ). Je nutné připomenout, že nebyla prováděna Bonferroniho korekce a tudíž bude třeba ověřit získané výsledky této explorační studie na nezávislém souboru.



Tabulka č. 13 Vliv veličiny umělé oplození na nálady matky během těhotenství

	umělé oplození	
	NE	ANO
starosti	4,569	5,176
veselost	5,469	5,039

V tomto testu bylo možné vybrat hodnocení od 1 do 7, kdy 1 znamenala rozhodně ne, 7 rozhodně ano.

### 3.3.4 Průběh těhotenství

Po odfiltrování binární veličiny umělého oplodnění (t.j. nutnost asistované reprodukce) nebyla spojitá proměnná „snaha otěhotnět“ (t.j. počet měsíců od rozhodnutí otěhotnět do otěhotnění) ovlivněná veličinou TOXO ( $p=0,1102$ ,  $F=2,5714$ ). Jako kovariáta byla do testu GLM dosazena ordinální proměnná počet porodů, jejíž vliv na veličinu snaha otěhotnět byl signifikantní ( $p=0,0222$ ,  $F=5,3032$ ). Proměnná snaha otěhotnět nebyla ovlivněna proměnnou TOXO ( $p=0,8317$ ,  $F=0,0453$ ) ani bez odfiltrování veličiny umělé oplodnění.

Délka menstruačního cyklu nebyla statisticky signifikantně odlišná u *toxoplasma*-pozitivních a *toxoplasma*-negativních žen ( $p=0,1949$ ,  $F=1,69$ ). Jako kovariáta byl do testu GLM dosazena proměnná věk matky a počet předchozích porodů.

Při sledování spojitě veličiny vysazení hormonální antikoncepce (t.j. časové období od vysazení hormonální antikoncepce do otěhotnění) se statisticky signifikantně nelišily dvě skupiny žen – toxo-pozitivní a toxo-negativní ( $p=0,4499$ ,  $F=0,5744$ ). Kovariáta vlivu věku matky na vysazení hormonální antikoncepce, která byla zde dosazena, byla v testu GLM signifikantní ( $p=0,0282$ ,  $F=4,9288$ ).

Tabulka č. 14 Zjišťované veličiny v průběhu těhotenství

	NE		ANO	
	Toxo-negativní	Toxo-pozitivní	Toxo-negativní	Toxo-pozitivní
zvýšená chuť na některá jídla	142 (83 %)	29 (17 %)	153 (86,4 %)	24 (13,6 %)
odpor k nějakým jídlům	203 (85,3 %)	35 (14,7 %)	90 (83,3 %)	18 (16,7 %)
pravidelný menstruační cyklus	90 (86,5 %)	14 (13,5 %)	188 (83,2 %)	38 (16,8 %)
antikoncepční tablety před otěhotněním	179 (85,6 %)	30 (14,4 %)	117 (83,6 %)	23 (16,4 %)
vitaminové tablety během těhotenství	56 (84,8 %)	10 (15,2 %)	236 (84,6 %)	43 (15,4 %)
vitaminové tablety po narození dítěte	146 (81,6 %)	33 (18,4 %)	142 (87,7 %)	20 (12,3 %)
kojení	10 (83,3 %)	2 (16,7 %)	286 (84,9 %)	51 (15,1 %)

Žádná ze sledovaných veličin v průběhu těhotenství se statisticky signifikantně nelišila u žen s latentní toxoplazmózou a u kontrolních žen. Pro testování v log-lineární analýze byl použit jednoduchý model daná veličina v průběhu těhotenství x TOXO x pohlaví dítěte. Výsledky log-lineární analýzy jsou uvedeny v tabulce č. 15.

Tabulka č. 15 Veličiny v průběhu těhotenství testované log-lineární analýzou.

	interakce s			
	pohlavím dítěte		TOXO	
	chí kvadrát	p	chí kvadrát	p
zvýšená chuť na některá jídla	3,2836	0,0700	0,5386	0,4630
odpor k nějakým jídlům	0,3557	0,5509	0,4725	0,4918
pravidelný menstruační cyklus	0,3420	0,5587	0,3419	0,5588
antikoncepční tablety před otěhotněním	3,3189	0,0685	0,4055	0,5243
vitamínové tablety během těhotenství	1,6813	0,1948	0,0644	0,7997
1. Trimestr	0,0046	0,9459	0,8555	0,3550
2. Trimestr	0,6275	0,4283	0,0279	0,8673
3. Trimestr	0,0055	0,9410	2,7305	0,0984
vitamínové tablety po narození dítěte	0,0054	0,9414	3,3423	0,0675
kojení	0,2714	0,6024	0,3217	0,5706
plně kojené 3 měsíce	0,0019	0,9652	0,6441	0,4222
plně kojené 6 měsíců	1,1320	0,2873	0,0229	0,8797

Při zjišťování průběhu porodu u toxo-positivních a toxo-negativních žen jsme se soustředili na termín porodu - předčasný, v termínu, dítě přenášeno (označovaný v tabulce jako porod 1, tabulka č. 16) a spontánní porodu - vyvolávaný, spontánní (označovaný v tabulce jako porod 2, tabulka č. 17).

Frekvenční tabulka č. 16 - Porod 1

předčasný		v termínu		dítě přenášeno	
Toxo-negativní	Toxo-positivní	Toxo-negativní	Toxo-positivní	Toxo-negativní	Toxo-positivní
31 (88,6 %)	4 (11,4 %)	186 (87,3 %)	27 (12,7 %)	68 (76,4 %)	21 (23,6 %)

Frekvenční tabulka č. 17 - Porod 2

vyvolávaný		spontánní	
Toxo-negativní	Toxo-positivní	Toxo-negativní	Toxo-positivní
79 (82,3 %)	17 (17,7 %)	164 (86,3 %)	26 (13,7 %)

Při testování rozdílnosti porodu žen s latentní toxoplazmózou a kontrolních žen jsme použili log-lineární analýzu - model TOXO x pohlaví dítěte x porod. Nebyl zjištěn žádný signifikantní vliv latentní toxoplazmózy na spontanitu porodu či termín porodu (tabulka č. 18). V testu byl zjištěn trend vzájemné interakce veličiny TOXO a termínu porodu.

*Tabulka č. 18 Porod dítěte - testováno log-lineární analýzou*

	chí kvadrát	df	p
předčasný x v termínu x dítě přenášeno (porod 1)	9,0324	7	0,2503
vyvolávaný x spontánní (porod 2)	6,1186	5	0,2948

Pokud se termín porodu považuje nikoli za kvalitativní veličinu (jako tomu bylo v případě log-lineární analýze) ale za veličinu ordinální a analyzuje se pomocí logistické regrese jsou hodnoty: chí kvadrát=5,3, df=1, p=0,0225. To znamená, že porod u matek toxo-pozitivních je statisticky signifikantně posunut ve směru dítě přenášeno.

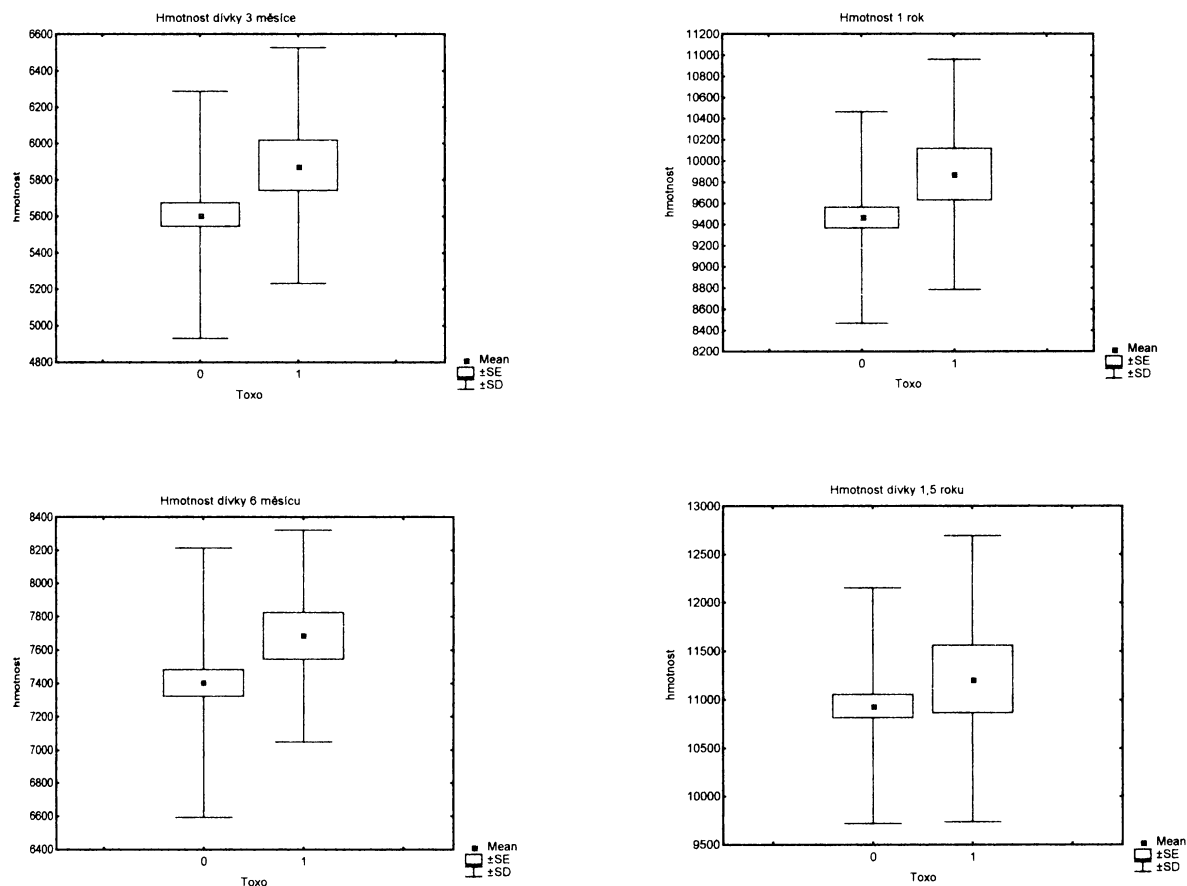
### 3.3.5 Růst a spánek dítěte

Hmotnost dítěte byla zaznamenávána v 6. týdnu, 3. a 6. měsíci, v 1 a 1,5 roku a ve 3 letech a analyzována odděleně podle pohlaví dítěte. Nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi dětmi od toxo-negativních a toxo-pozitivních matek. Pouze u chlapců ve stáří 1,5 roku byl zjištěn určitý trend - chlapci od toxo-pozitivních matek byli o něco těžší než chlapci od matek kontrolních (p=0,0576, F=3,4861). Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 19, 20 a znázorněny na grafech č. 1 a 2.

*Tabulka č. 19 Hmotnosti dětí - dívky.*

	Od kontrolních matek			Od toxo-pozitivních matek			F	p
	N	průměr	SD	N	průměr	SD		
6 týdnů	107	4518	505	22	4517	532	0,0002	0,9897
3 měsíce	108	5663	616	22	5879	647	2,1959	0,1409
6 měsíců	107	7341	837	22	7626	680	2,2248	0,1383
1 rok	106	9405	1062	21	9746	1211	1,7061	0,1939
1,5 roku	98	10915	1238	18	11213	1478	0,7855	0,3773
3 roky	49	14471	1976	11	14918	2139	0,4620	0,4994

Graf č.1 Hmotnosti dívek ve stáří 3 měsíce, 6 měsíců, 1 rok, 1,5 roku

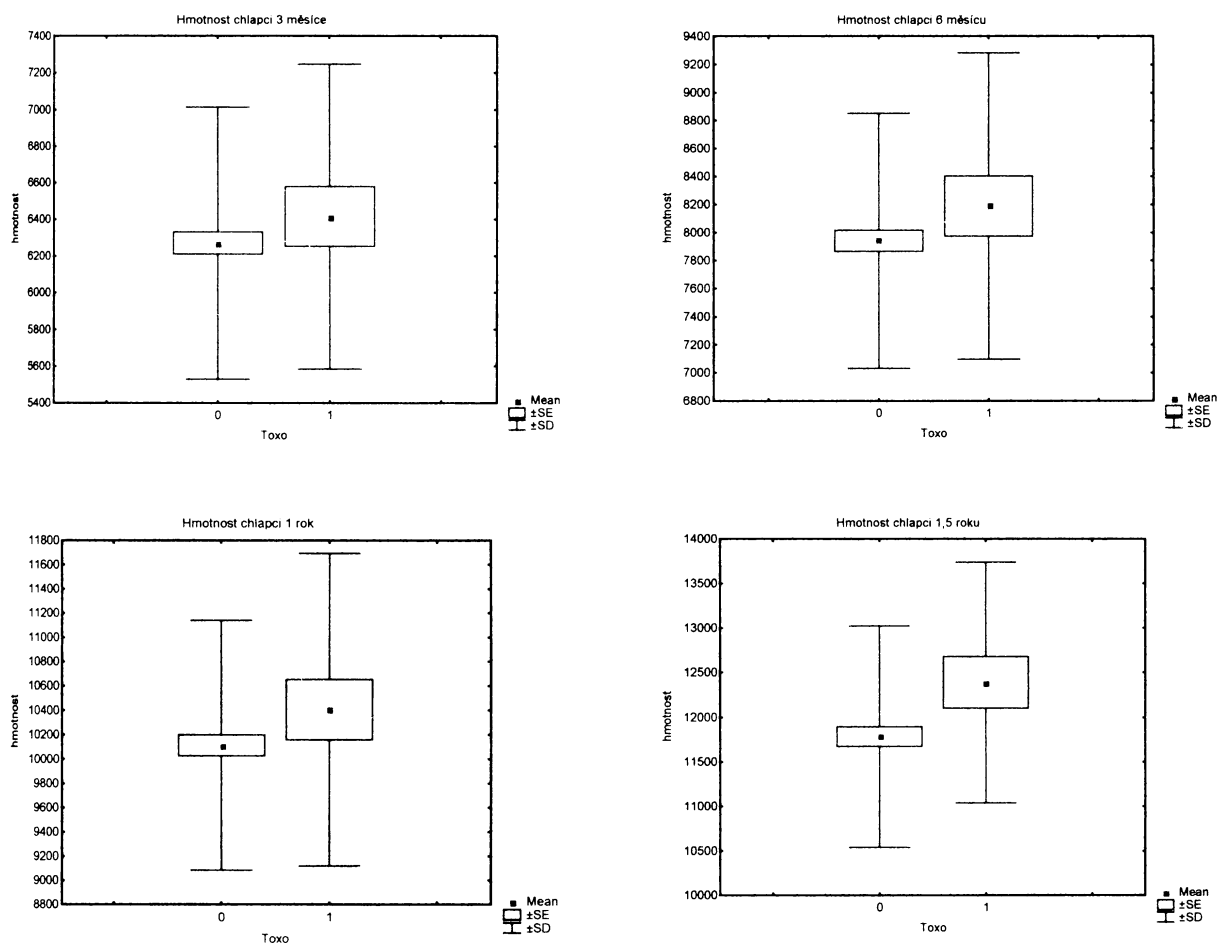


0-děti od toxo-negativních matek, 1-děti od toxo-pozitivních matek

Tabulka č. 20 Hmotnost dětí - chlapci

	Od kontrolních matek			Od toxo-pozitivních matek			F	p
	N	průměr	SD	N	průměr	SD		
6 týdnů	138	4906	603	24	5014	508	0,8756	0,3508
3 měsíce	142	6318	718	27	6422	816	0,6191	0,4325
6 měsíců	140	7994	895	27	8210	1077	1,1128	0,2930
1 rok	136	10143	1003	28	10398	1264	1,1700	0,2810
1,5 roku	118	11820	1255	23	12424	1328	3,6664	0,0576
3 roky	72	15623	1771	10	15934	2913	0,2589	0,6123

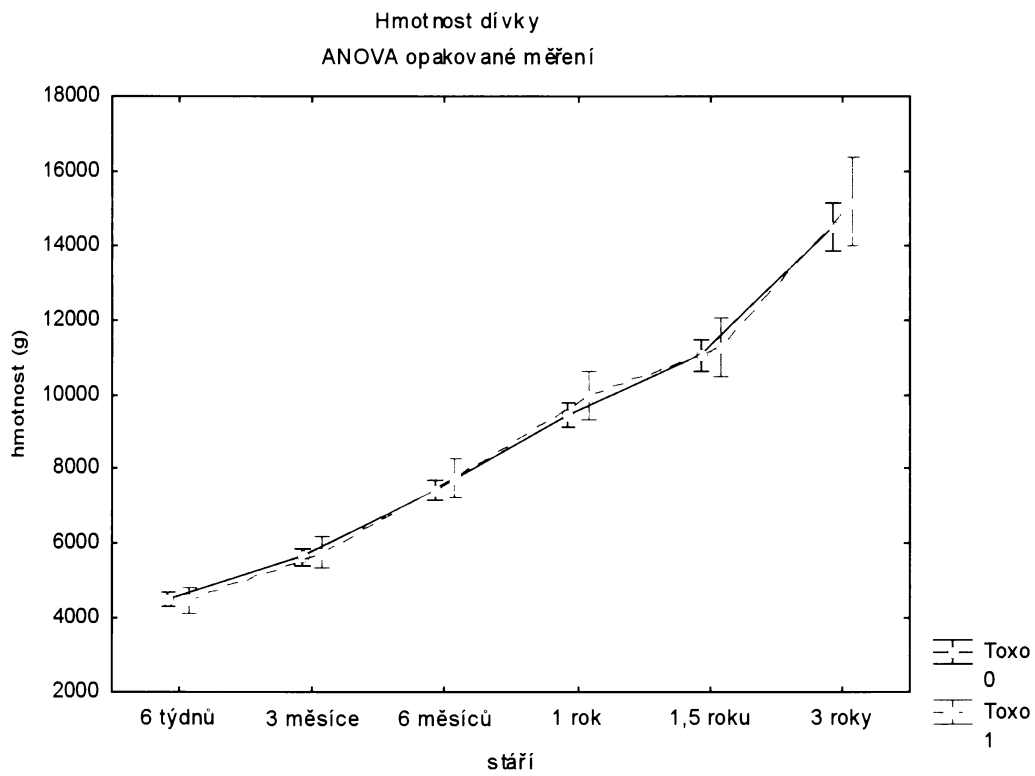
Graf č. 2 Hmotnosti chlapců ve stáří 3 měsíce, 6 měsíců, 1 rok, 1,5 roku



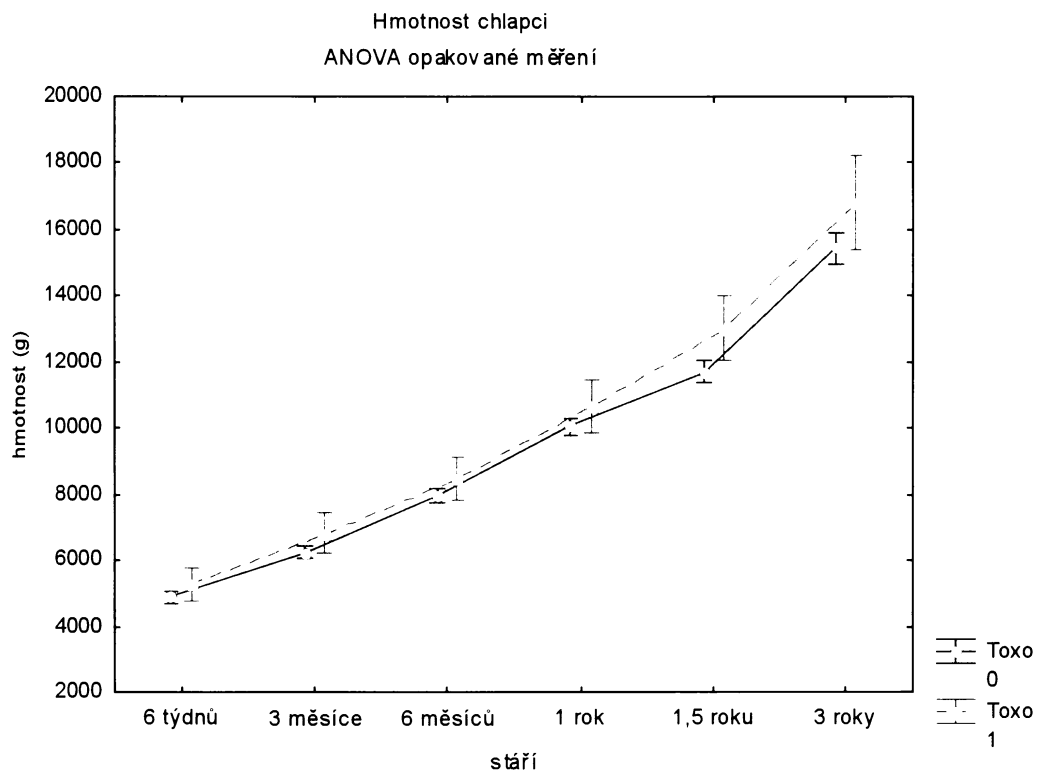
0-děti od toxo-negativních matek, 1-děti od toxo-pozitivních matek

Při zjišťování vlivu latentní toxoplazmózy matky na hmotnost dítěte byla data též testována ANOVA testem opakovaného měření. Hodnota  $R1 \times TOXO$  je u dívek  $p=0,607$  a u chlapců  $p=0,104$ . Výsledky jsou znázorněny na grafu 3 a 4.

Graf č. 3 Opakované měření - hmotnost dívky. Červeně děti od toxo-pozitivních matek, modře od toxo-negativních matek.



Graf č. 4 Opakované měření – hmotnost chlapci

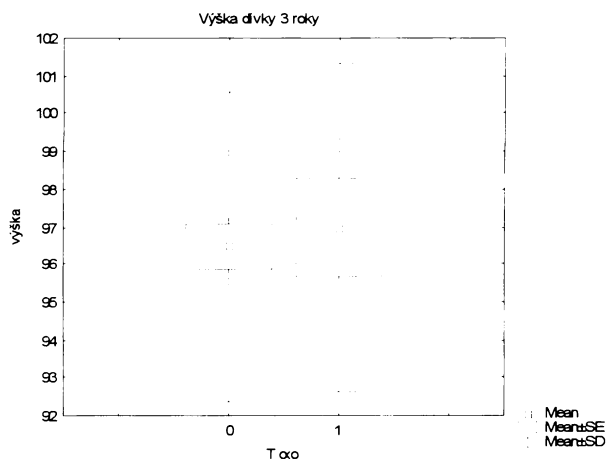
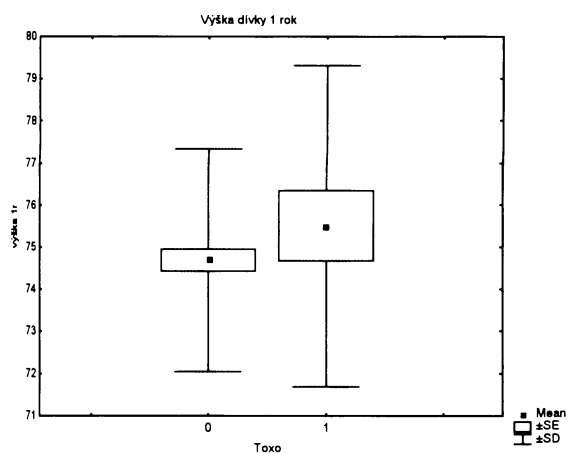
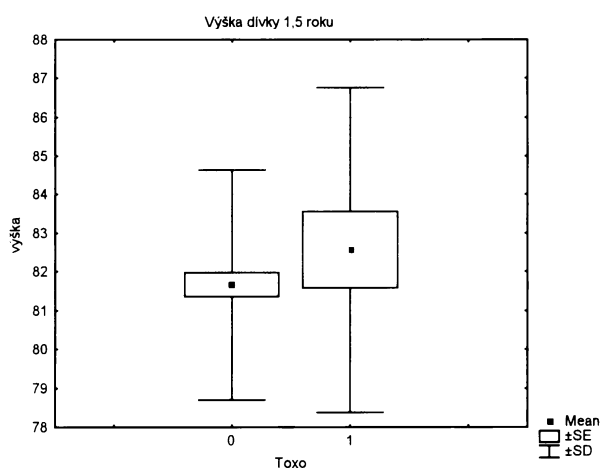
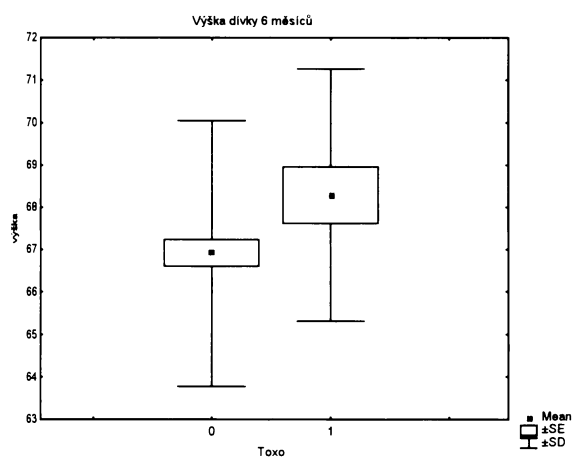


Výška dětí byla měřena ve stejném stáří jako hmotnost (tabulky č.21 a 22). Nebyl zjištěn signifikantní rozdíl u dětí od matek s latentní toxoplazmózou a kontrolních dětí. Ve věku 6ti měsíců byl u dívek zjištěn trend - dívky od toxo-pozitivních matek byly vyšší ( $p=0,0645$ ,  $F=3,4861$ ). U chlapců se ukázala ve věku 1 roku pozitivní korelace výšky dítěte na věku matky ( $p=0,0175$ ,  $F=5,8$ ).

*Tabulka č. 21 Výška dětí - dívky*

	Od kontrolních matek			Od toxo-pozitivních matek			F	p
	N	průměr	SD	N	průměr	SD		
6 týdnů	88	55,4	2,1	21,0	55,4	3,0	0,0199	0,8882
3 měsíce	94	60,3	2,5	20,0	60,2	2,7	0,0278	0,8680
6 měsíců	95	66,8	3,1	20,0	68,3	3,0	3,4861	0,0645
1 rok	103	74,7	2,6	21,0	75,5	3,8	1,2780	0,2605
1,5 roku	96	81,6	3,0	18,0	82,6	4,2	1,3566	0,2466
3 roky	47	96,6	4,1	11,0	97,0	4,3	0,0846	0,7723

Grafy č. 5 Výška dívek ve stáří 6 měsíců, 1 rok, 1,5 roku, 3 roky



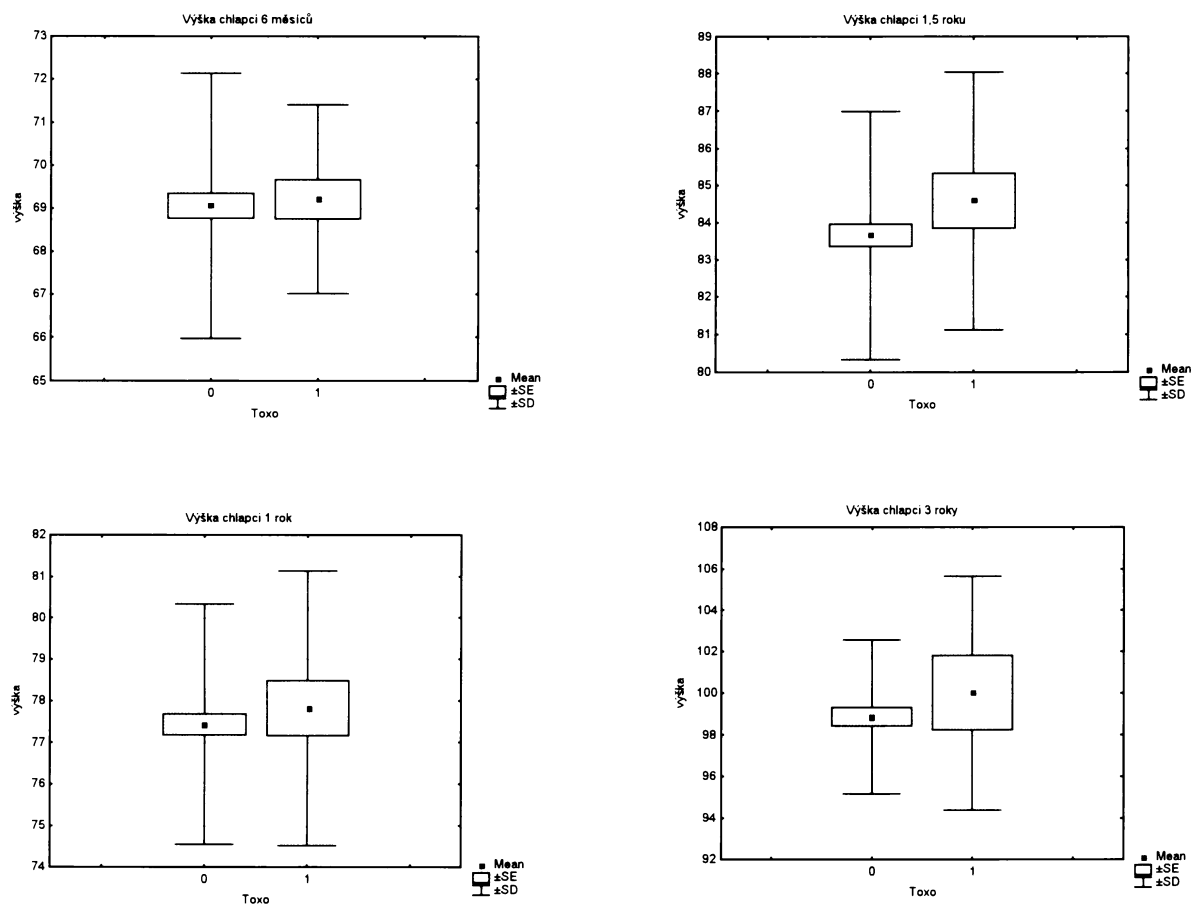
0-děti od toxo-negativních matek, 1-děti od toxo-pozitivních matek

Tabulka č. 22 Výška dětí - chlapci

	Od kontrolních matek			Od toxo-pozitivních matek			F	p
	N	průměr	SD	N	průměr	SD		
6 týdnů	107	56,85	2,67	21	56,50	2,30	0,5000	0,4821
3 měsíce	117	62,61	2,90	23	63,30	2,99	1,0300	0,3117
6 měsíců	112	69,16	3,09	25	69,18	2,16	0,0100	0,9305
1 rok	125	77,48	2,90	26	77,83	3,25	0,0000	0,9055
1,5 roku	113	83,64	3,38	23	84,65	3,39	1,2200	0,2720
3 roky	67	98,87	3,76	10	100,05	5,64	0,9200	0,3397



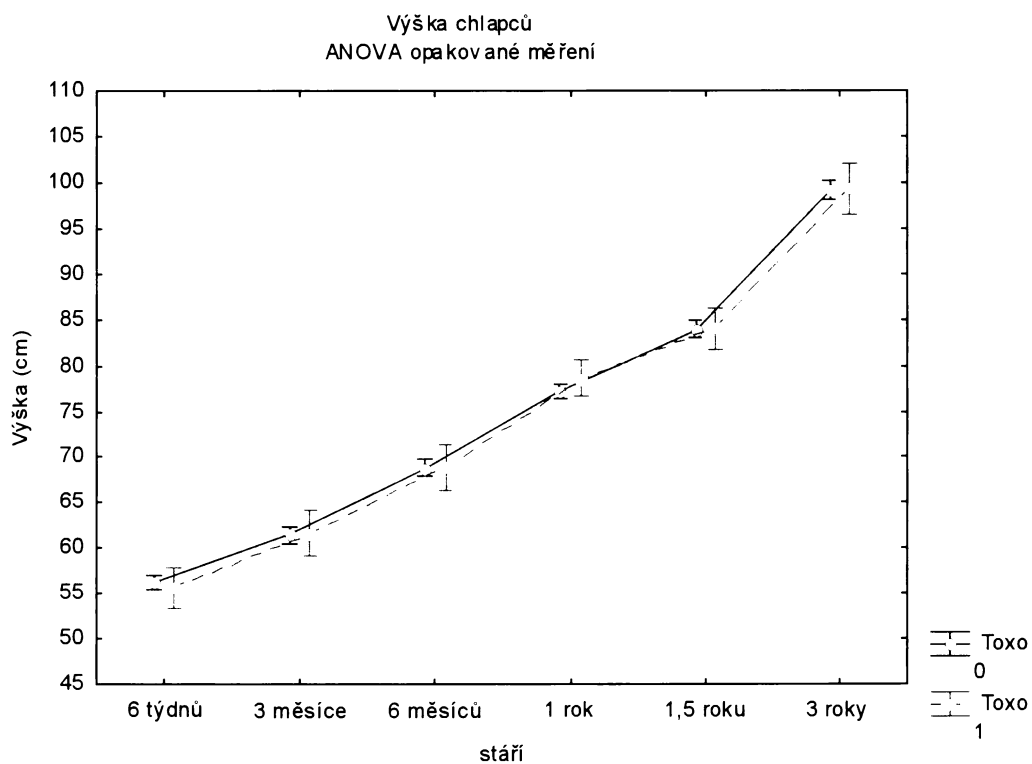
Grafy č. 6 Výška chlapců ve stáří 6 měsíců, 1rok, 1,5 roku, 3roky



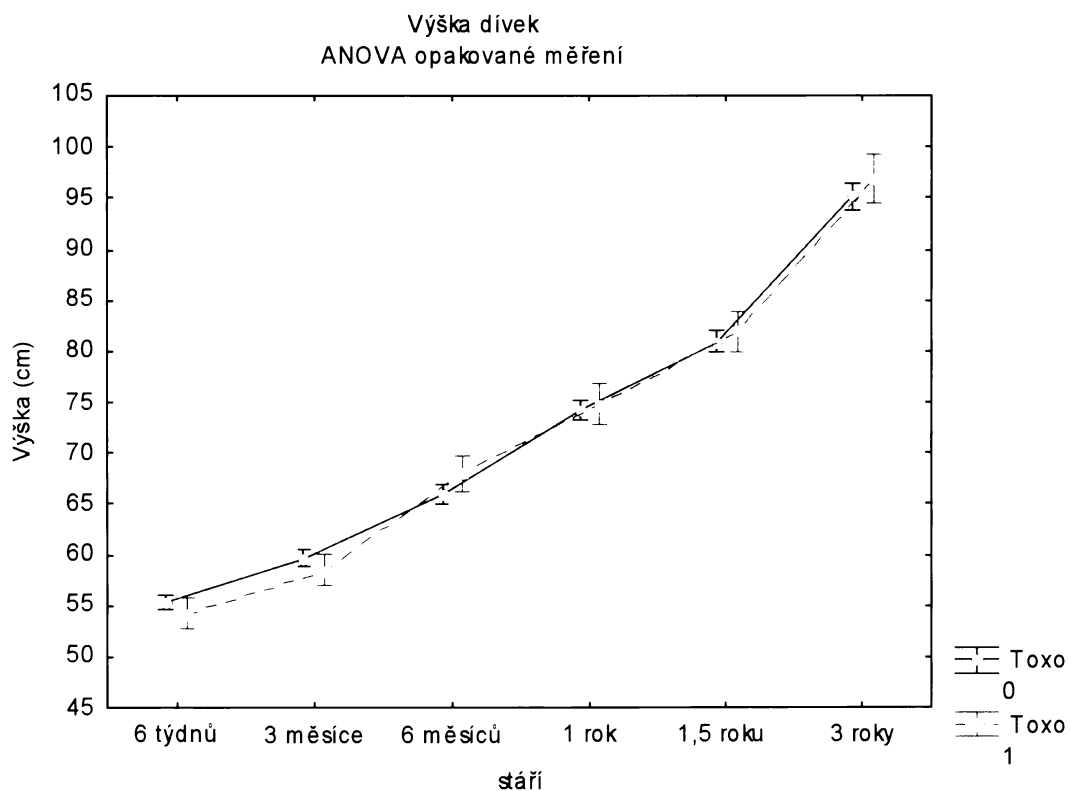
0-děti od toxo-negativních matek, 1-děti od toxo-pozitivních matek

Testování ANOVA testem opakovaného měření jsme získali hodnota  $R1 \times TOXO$  u dívek  $p=0,006$  a u chlapců  $p=0,841$ . Výška dětí je znázorněna na grafech č. 7 a 8.

Graf č. 7 Opakované měření – výška chlapci. Červeně děti od toxo-positivních matek, modře od toxo-negativních matek.



Graf č. 8 Opakované měření – výška dívky



Statisticky signifikantní nebyl rozdíl mezi frekvencí buzení dítěte od toxo-pozitivní a toxo-negativní matky v noci (viz tabulka č. 24). Při testování frekvence buzení testem ANOVA opakovaného měření, nebyla interakce R1\*TOXO signifikantní ( $p=0,893$ ,  $F=0,33$ ).

Pohlavní rozdíly ve hmotnosti a výšce byly všechny signifikantní. Dívky byly ve všech vážených obdobích signifikantně lehčí a signifikantně nižší než chlapci (Viz tabulka č. 23)

*Tabulka č. 23 Mezipohlavní rozdíly ve hmotnosti a výšce*

	hmotnost (g)			výška (cm)		
	dívky	chlapci	p	dívky	chlapci	p
6 týdnů	4496	4860	<0,0001	55,4	56,6	0,0001
3 měsíce	5659	6293	<0,0001	60,2	62,5	<0,0001
6 měsíců	7451	7984	<0,0001	67,2	69,1	<0,0001
1 rok	9524	10164	<0,0001	74,9	77,5	<0,0001
1,5 roku	10981	11884	<0,0001	81,8	83,8	<0,0001
3 roky	14493	15599	0,0007	96,7	99,0	0,0007

*Tabulka č. 24 Frekvence buzení dítěte v noci*

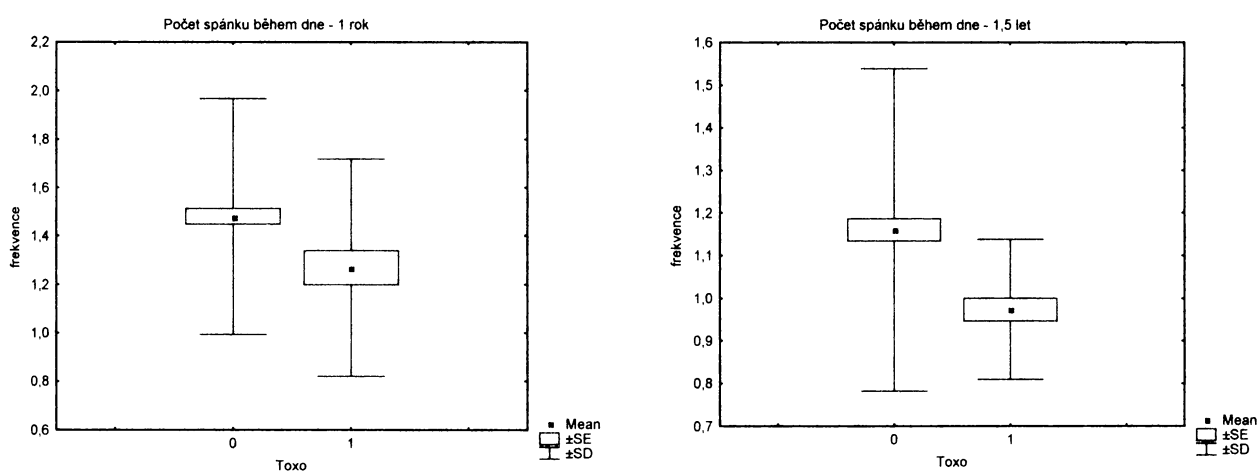
	Od kontrolních matek			Od toxo-pozitivních matek			F	p
	N	průměr	SD	N	průměr	SD		
6 týdnů	241	3,04	1,38	44	2,95	1,25	0,1080	0,7424
3 měsíce	251	2,69	1,61	46	2,39	1,52	1,1843	0,2774
6 měsíců	248	2,43	1,94	47	2,54	2,43	0,1586	0,6907
1 rok	242	1,59	1,47	46	1,65	1,56	0,1465	0,7022
1,5 roku	229	1,03	1,25	42	0,92	1,02	0,2113	0,6461
3 roky	130	0,40	0,63	24	0,42	0,64	0,0011	0,9742

Frekvence spánku dítěte přes den je v tabulce č. 25. Zde byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi dětmi od toxo-pozitivních a toxo-negativních matek. Ve věku 1 a 1,5 let spaly děti od toxo-pozitivních matek méně často přes den. Při opakovaném měření testem ANOVA pro opakovaná měření nebyla interakce R1\*TOXO signifikantní ( $p=0,28$ ,  $F=1,26$ ).

Tabulka č. 25 Frekvence spánku dítěte přes den

	Od kontrolních matek			Od toxo-pozitivních matek			F	p
	N	průměr	SD	N	průměr	SD		
6 týdnů	172	3,35	1,11	25	3,04	0,99	1,6860	0,1957
3 měsíce	191	2,75	0,77	34	2,63	0,82	0,6030	0,4381
6 měsíců	206	2,14	0,56	40	2,06	0,79	0,4740	0,4918
1 rok	223	1,48	0,49	41	1,27	0,45	6,8090	0,0096
1,5 roku	210	1,16	0,38	37	0,97	0,16	8,8740	0,0032
3 roky	123	0,54	0,49	22	0,64	0,58	1,1201	0,2917

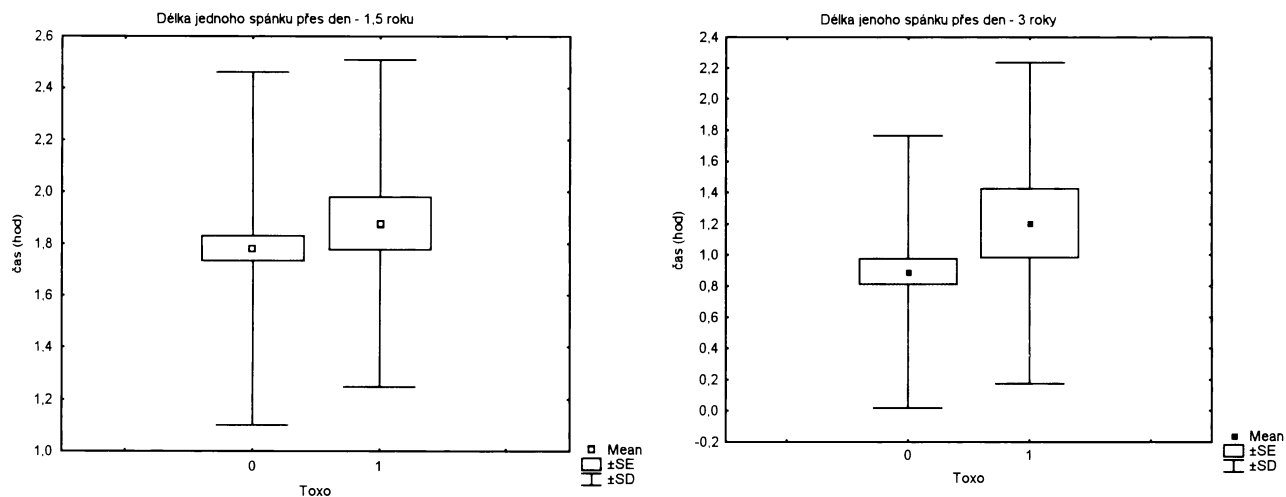
Grafy č. 9 Počet spánků během dne



0-děti od toxo-negativních matek, 1-děti od toxo-pozitivních matek

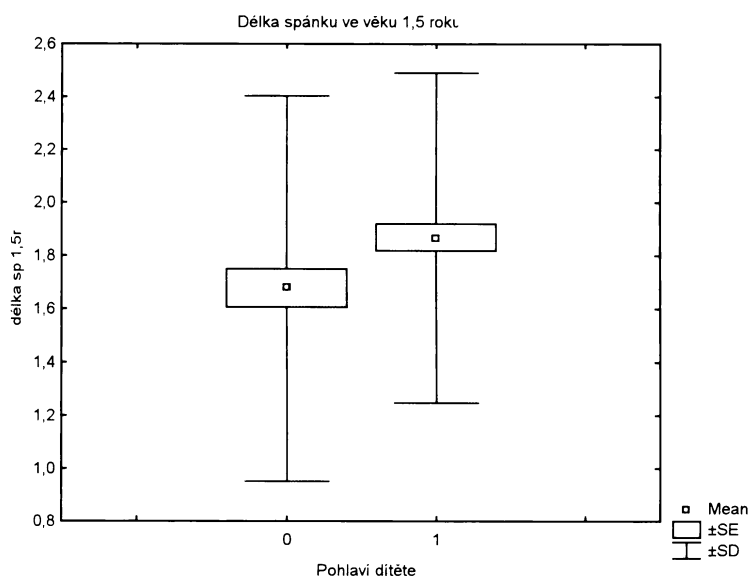
V délce jednoho spánku přes den nebyl zjištěn mezi dětmi od toxo-pozitivních a toxo-negativních matek žádný signifikantní rozdíl (tabulka č. 26). Ve věku 1,5 let se ukázal rozdíl mezi dívkami a chlapci ( $p=0,0402$ ,  $F=4,254$ , graf č. 10). Délka jednoho spánku přes den byla u dívek signifikantně kratší než u chlapců. Při testování délky jednoho spánku testem ANOVA opakovaného měření, nebyla interakce  $R1*TOXO$  signifikantní ( $p=0,664$ ,  $F=0,647$ ).

Grafy č. 10 Délka jednoho spánku přes den



0-děti od toxo-negativních matek, 1-děti od toxo-pozitivních matek

Graf č. 11 Délky jednoho spánku přes den u dívek a chlapců



Dívky jsou označeny 0 a chlapci 1.

Tabulka č. 26 Délka jednoho spánku pře den u dětí od toxo-pozitivních a toxo-negativních matek.

	Od kontrolních matek			Od toxo-pozitivních matek			F	p
	N	průměr	SD	N	průměr	SD		
6 týdnů	168	1,69	0,78	25	1,88	0,81	1,3495	0,2468
3 měsíce	177	1,67	0,69	33	1,77	0,59	0,5247	0,4697
6 měsíců	192	1,76	0,75	38	1,69	0,67	0,4136	0,5208
1 rok	210	1,80	0,62	41	1,87	0,56	0,4116	0,5217
1,5 roku	208	1,78	0,67	40	1,88	0,62	0,7599	0,3842
3 roky	114	0,89	0,87	22	1,20	1,03	2,9411	0,0887

### 3.3.6 Psychomotorický vývoj dítěte

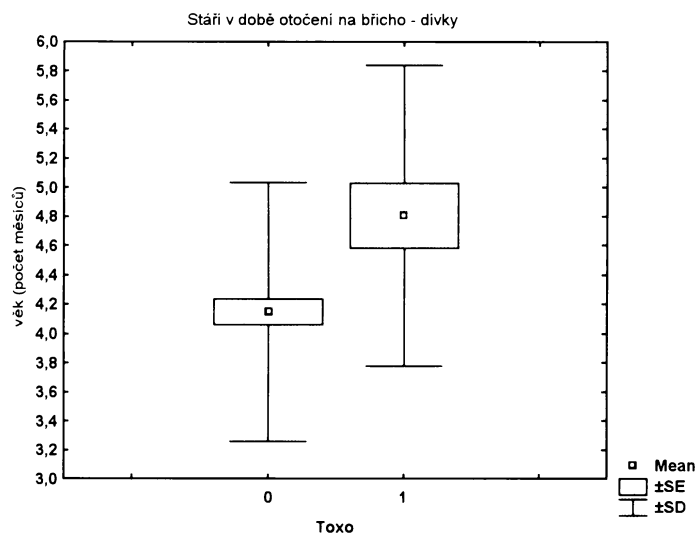
Data týkající se psychomotorického vývoje dítěte bylo rozdělena podle pohlaví, protože chlapani bývají v psychomotorickém vývoji pomalejší. Ze statistického testování byla vyřazena dvojčata.

Z tabulky č. 27 vyplývá, že dívky od toxo-pozitivních matek se signifikantně později zvedají otáčejí na břicho ( $p=0,0034$ ,  $F=8,9594$ ). Určitý trend je zde naznačen u použití tužky. Dívky od toxo-pozitivních matek používají tužku o něco dříve ( $p=0,0577$ ,  $F=3,6823$ ), tento rozdíl však není signifikantní.

Tabulka č. 27 Psychomotorický vývoj - dívky

	Od kontrolních matek			Od toxo-pozitivních matek			F	p
	N	průměr	SD	N	průměr	SD		
Hlavička	106	2,26	0,92	21	2,19	0,89	0,0892	0,7658
Bříško	102	4,15	0,89	21	4,81	1,03	8,9594	0,0034
Sezení	114	7,23	1,24	22	7,39	1,40	0,3389	0,5615
Plazení	114	7,88	1,53	19	8,42	1,78	1,9729	0,1625
Chůze	109	11,78	1,26	22	12,09	1,49	1,0348	0,3110
Slova	96	15,13	4,09	16	16,66	5,33	1,7170	0,1928
Tužka	94	18,37	4,70	16	16,06	4,46	3,6823	0,0577
1. zub	113	7,11	2,25	21	7,12	2,19	0,0039	0,9505
Tříkolka	72	29,06	5,85	14	28,93	6,62	0,0172	0,8960

Graf č. 12 Stáří v době otočení na břicho u dětí ženského pohlaví



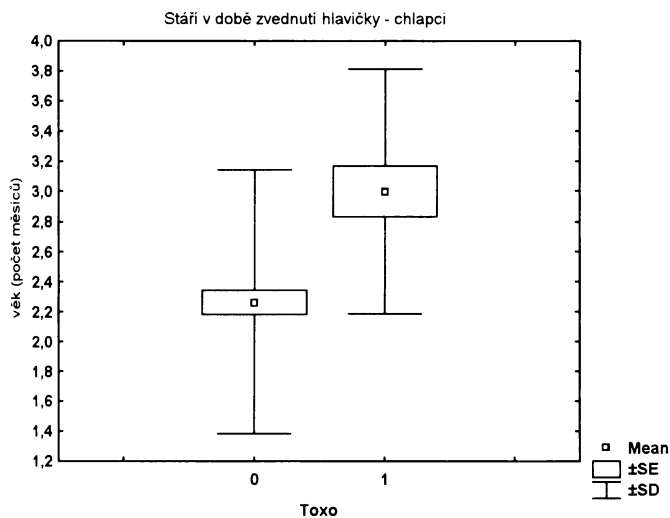
0-děti od toxo-negativních matek, 1-děti od toxo-pozitivních matek

Rozdíl ve vývoji dětí mužského pohlaví je u matek s latentní toxoplazmózou signifikantně pozdější zvednutí hlavičky ( $p=0,0002$ ,  $F= 14,2087$ ). Psychomotorický vývoj je celý popsán v tabulce č. 28.

Tabulka č. 28 Psychomotorický vývoj - chlapci

	Od kontrolních matek			Od toxo-pozitivních matek			F	p
	N	průměr	SD	N	průměr	SD		
Hlavička	122	2,27	0,88	23	3,00	0,81	14,2087	0,0002
Bříško	126	4,59	1,15	23	4,88	1,45	0,8438	0,3598
Sezení	147	7,27	1,48	26	7,48	1,23	0,3005	0,5843
Plazení	145	7,55	1,47	26	7,77	1,72	0,4076	0,5241
Chůze	157	12,13	1,71	28	11,89	1,64	0,4491	0,5036
Slova	139	16,96	4,92	24	17,08	4,73	0,0995	0,7528
Tužka	122	18,80	5,28	25	18,70	5,68	0,0004	0,9850
1. zub	151	6,59	1,98	27	5,96	1,83	2,3678	0,1257
Tříkolka	102	28,95	6,87	15	29,60	9,42	0,1324	0,7166

Graf č. 13 Stáří v době zvednutí hlavičky u dětí mužského pohlaví od toxo-negativních a toxo-pozitivních matek



0-děti od toxo-negativních matek, 1-děti od toxo-pozitivních matek

Pohlavní rozdíly v psychomotorickém vývoji byly zjištěny u proměnné otočení na břicho, plazení, první slova a první zub (tab. č. 29). Chlapci se signifikantně později otáčejí na břicho ( $p=0,0144$ ), dříve se plazí ( $p=0,0233$ ), později používají první slova ( $p=0,004$ ) a dříve jim vyroste první zub ( $p=0,0066$ ).

Tabulka č. 29 Mezipohlavní rozdíly v psychomotorickém vývoji

	dívky		chlapci		F	p
	N		N			
Hlavička	127	2,23	144	2,38	1,6781	0,1963
Bříško	123	4,28	149	4,61	6,0612	0,0144
Sezení	134	7,28	172	7,28	0,0000	1,0000
Plazení	131	7,97	168	7,56	5,1985	0,0233
Chůze	131	11,82	181	12,04	1,6375	0,2016
Slova	110	15,40	162	17,07	8,4201	0,0040
Tužka	108	17,93	146	18,82	1,8946	0,1699
1. zub	134	7,18	174	6,52	7,4914	0,0066
Tříkolka	84	29,01	115	28,76	0,0730	0,7873

### 3.3.7 Zdravotní stav dítěte

Četnosti výskytu onemocnění a zdravotních problémů dětí od matek s latentní toxoplazmózou a od kontrolních matek můžeme vidět v tabulce č. 30.



Tabulka č. 30 Frekvenční tabulka - zdravotní stav dítěte do tří let

	NE		ANO	
	Toxo-negativní	Toxo-pozitivní	Toxo-negativní	Toxo-pozitivní
neštovice	213 (84,2 %)	40 (15,8 %)	42 (93,3 %)	3 (6,7 %)
spála	248 (85,2 %)	43 (14,8 %)	5 (100 %)	0 (0 %)
angína	204 (85,7 %)	34 (14,3 %)	49 (81,7 %)	11 (18,3 %)
zánět střed. ucha	203 (85,3 %)	35 (14,7 %)	52 (86,7 %)	8 (15,3 %)
střevní onemocnění	145 (84,3 %)	27 (15,7 %)	108 (87,1 %)	16 (12,9 %)
zápal plic	244 (85,3 %)	42 (14,7 %)	9 (90 %)	1 (10 %)
zánět průdušek	172 (85,1 %)	30 (14,9 %)	81 (82,7 %)	17 (17,3 %)
alergie	233 (83,8 %)	45 (16,2 %)	54 (88,5 %)	7 (11,5 %)
kožní onemocnění	207 (86,6 %)	32 (15,4 %)	86 (81,1 %)	20 (18,9 %)
opakované nemoci	200 (87 %)	30 (3 %)	88 (80,7 %)	21 (19,3 %)
problémy se zrakem	276 (84,4 %)	51 (15,6 %)	15 (93,8 %)	1 (6,2 %)
speciální zdravotní cvičení	236 (83,4 %)	47 (16,6 %)	53 (91,4 %)	5 (8,6 %)
domácí cvičení	215 (82,4 %)	46 (17,6 %)	74 (92,5 %)	6 (7,5 %)

Rozdíly ve výskytu onemocnění dětí do tří let od toxo-pozitivních a toxo-negativních matek jsme testovali pomocí log-lineární analýzou. Její výsledek můžeme vidět v tabulce č. 31. Byl použit jednoduchý model veličina TOXO x pohlaví dítěte x daná proměnná (nemoc nebo zdravotní problém dítěte do tří let).

Tabulka č. 31 Loglineární analýza TOXO x Pohlaví dítěte x daná proměnná - onemocnění nebo zdravotní aspekty dítěte,  $df=1$

	interakce s			
	pohlavím dítěte		TOXO	
	chí kvadrát	p	chí kvadrát	p
neštovice	1,1936	0,2746	2,0346	0,1538
spála	0,0072	0,9324	0,0030	0,9563
angína	0,2254	0,6350	1,0565	0,3040
zánět střed. ucha	2,7255	0,0988	0,0027	0,9586
střevní onemocnění	0,5948	0,4406	0,2900	0,5902
zápal plic	1,4545	0,2278	0,0259	0,8721
zánět průdušek	1,3462	0,2459	0,5164	0,4724
alergie	1,2938	0,2553	0,5561	0,4558
kožní onemocnění	0,1045	0,7465	1,7870	0,1813
opakované nemoci	0,8365	0,3604	2,4816	0,1152
problémy se zrakem	0,0018	0,9662	0,2330	0,6293
speciální zdravotní cvičení	0,3955	0,5294	1,7523	0,1856
domácí cvičení	0,1114	0,7386	4,6650	0,0308

Neukázal se žádný signifikantní vliv latentní toxoplazmózy matky na zdraví, nemoci a alergie dítěte. Z tabulky č. 31 vyplývá, že je zde signifikantní interakce mezi proměnnou TOXO a domácím cvičením (chi kvadrát 4,665, df=1, p=0,0308). Matky, které měly latentní toxoplazmózu se domácím cvičením s dítětem věnovaly téměř o polovinu méně (domácí cvičení TOXO negativní= 26,16 %, TOXO pozitivní= 11,76 %).

Při testování veličin jsme se zaměřili také na vliv plného kojení (do 6ti měsíců) na nemoci dítěte. V loglineární analýze byl testován model: nemoc dítěte x plné kojení do 6ti měsíců x věk matky. Signifikantní vliv byl zaznamenán pouze u onemocnění angínou (chi kvadrát 5,677, df=1, p=0,0172), plně kojené děti do 6ti měsíců onemocněly méně často angínou než nekojené děti. Jinak kojení nemělo vliv na ostatní nemoci, kožní onemocnění a alergie.

### 3.3.8 Chování dítěte do tří let

Z dotazníků vyplynulo, že chování dětí od matek s latentní toxoplazmózou se liší v tom, že děti od toxo-pozitivních matek jsou signifikantně víc citlivé než děti od toxo-negativních matek ( $p=0,021$ ,  $F=5,389$ , tabulka č. 32). V tomto modelu byl signifikantní vliv kovariáty pohlaví dítěte na dominantní chování ( $p=0,0283$ ,  $F=4,859$ ) a vliv kovariáty věk matky na vyšší oblibu nových situací ( $p=0,0423$ ,  $F=4,160$ ). Vliv kovariáty pohlaví dítěte na dominantní chování byla taková, že dívky byly v porovnání s chlapci víc dominantní. Možnost ohodnocení byla od 1 do 7 (1=rozhodně ano, 7=rozhodně ne) a dívky měly průměr 3,83 ( $N=120$ ) a chlapci 3,41 ( $N=173$ ).

Tabulka č. 32 Chování dětí do toxo-negativních a toxo-pozitivních matek (1=rozhodně ne, 7=rozhodně ano)

	Od kontrolních matek			Od toxo-pozitivních matek			F	p
	N	průměr	SD	N	průměr	SD		
více plaché, bázlivé než jeho vrstevníci	252	2,65	1,80	45	2,80	2,14	0,2141	0,6439
více nebojácné než jeho vrstevníci	253	3,84	1,84	44	3,70	1,68	0,2317	0,6306
více vzteké a vzdorovité než jeho vrstevníci	254	3,23	1,76	44	3,52	1,91	0,8074	0,3696
více citlivé, zranitelné než jeho vrstevníci	250	3,44	1,62	44	4,05	1,64	5,3890	0,0210
více agresivní než jeho vrstevníci	250	2,14	1,47	44	2,48	1,72	1,9931	0,1591
více mazlivé než jeho vrstevníci	256	4,21	1,54	44	3,98	1,81	1,0044	0,3171
chytřejší než jeho vrstevníci	252	4,48	1,42	44	4,66	1,27	0,4895	0,4847
veselejší než jeho vrstevníci	254	4,56	1,48	46	4,89	1,42	1,7671	0,1848
společensjtější než jeho vrstevníci	256	4,62	1,57	56	4,63	1,78	0,0000	1,0000
zvýšené dominantní chování než jeho vrstevníci	254	3,54	1,76	43	3,70	1,75	0,1595	0,6899
vyšší obliba nových situací než jeho vrstevníci	251	3,96	1,66	43	4,28	1,75	1,0033	0,3174
větší smysl pro pořádek než jeho vrstevníci	249	3,78	1,69	43	3,77	1,80	0,0004	0,9842
větší smysl pro spolupráci než jeho vrstevníci	251	4,16	1,52	44	3,98	1,61	0,5229	0,4702
větší schopnost napodobovat chování druhých než jeho vrstevníci	250	4,31	1,55	43	4,44	1,52	0,1337	0,7149

## **4. Vliv latentní toxoplazmózy na potomstvo myší**

### **4.1 Cíl práce**

Vzhledem k tomu, že v dostupné literatuře nejsou žádné zmínky o vlivu latentní toxoplazmózy matky na potomstvo u myší, bylo naším cílem zjistit, zda-li vůbec k tomuto ovlivnění dochází a jak se projevuje. Cílem bylo zjistit, jestli je latentní toxoplazmózou matky ovlivněna hmotnost potomstva a jeho chování.

### **4.2 Materiál a metody**

#### **4.2.1 Experimentální zvířata**

V experimentu byly použita mláďata myší křížením kmenů BALB/c (samice) a C57BL (samci). Pokus byl prováděn v aseptickém zvěřinci. Denní režim byl nastaven na 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Experimentální zvířata dostávala vodu a laboratorní krmivo ad libidum. Samicím byla pro zpestření stravy podávána během březosti směs obilovin, která byla vyklákována. Ve stáří dvou měsíců bylo 35 budoucích matek nainfikováno pomocí žaludeční sondy 10 cystami málo virulentního kmene HIF. Celkem 35 samicím myší, které sloužily jako kontrolní, byl podán pomocí žaludeční sondy fyziologický roztok. U nainfikovaných samic proběhla akutní fáze a ve fázi latentní, konkrétně asi 8-12 týdnů po infekci byly samice připuštěny. Celkem zabřezlo 54 samic, jedna potratila celý vrh a u jedné samice došlo k úhynu. Toxo-pozitivních samic zabřezlo 27, toxo negativních 25. Průměrně byla četnost vrhu u toxo-pozitivních 5,9 mláďat a u toxo-negativních 5,7 mláďat. Celkem tyto samice porodily 305 mláďat, z toho se 6 týdnů dožilo 264 mláďat.

Mláďata byla chována ve standardních podmínkách aseptického zvěřince. Vodu a krmivo dostávala ad libidum. V místnosti byl dvanáctihodinový světelný režim. Experimenty byly prováděny během tmavé fáze dne a osvětleny červeným světlem. Na test s kladinou bylo použito 192 myší, z toho 101 samic (47 od kontrolních matek a 54 od matek s latentní toxoplazmózou) a 91 samců (41 od kontrolních matek a 50 od matek s latentní toxoplazmózou). Na test light-dark box bylo použito 188 myší. Z toho 100 samic (44 od kontrolních matek a 55 od matek s latentní toxoplazmózou) a 88 samců (39 od kontrolních matek a 50 od matek s latentní toxoplazmózou).

## 4.2.2 Příprava inokula

K přípravě inokula byly použity mozky ze tří myši infikovaných kmenem HIF. Mozky byly zhomogenizovány a byl mikroskopicky zjištěn počet cyst v 10x10 µl homogenátu. Homogenát byl naředěn tak, aby každá myš dostala infekční dávku asi 10 cyst. Kmen použitý v tomto experimentu byl v roce 1993 izolován z HIV pozitivního pacienta (Kodym, 2002). Tento kmen patří k málo virulentním, cystogenním. Cysty se tvoří ve slezině, játrech, plicích, srdci a mozku.

## 4.2.3 Hmotnosti mlád'at

Do pokusu bylo náhodným výběrem zařazeno 192 mlád'at F1 kříženců matek BALB/c a otců C57BL, 100 samic a 92 samců. Tato mlád'ata byla chována ve zvěřinci Státního zdravotního ústavu. Odstav a oddělení podle pohlaví proběhlo ve stáří 6 týdnů. Matky i mlád'ata byla krmena a napájena ad libidum. V místnostech byl 12ti hodinový světelný režim. Mlád'ata byla pravidelně vážena ve stáří 43-102 dnů ve stejnou denní dobu. Myši byly v době vážení rozděleny podle přibližného stáří do šesti skupin – 43-52 dnů, 53-62 dnů, 63-72 dnů, 73-82 dnů, 83-92 dnů a 93-102dnů.

## 4.2.4 Séropozitivita

U mlád'at myši byla zjištěna pomocí metody KFR (podrobně popsané v kapitole 5.2.3) určitá hladina protilátek. Ve stáří 8 týdnů byl u většiny mlád'at od toxo-pozitivních matek 1:32 nebo 1:16. Ve věku 12 týdnů byl tento titr u většiny mlád'at 1:4 nebo pod hranicí detekce. Z těchto výsledků vyplývá, že se jedná o protilátky pravděpodobně přenesené od matky. Mlád'ata s kongenitální infekcí by pravděpodobně měla velmi vysoký titr po relativně dlouhou dobu.

## 4.2.5 Behaviorální testy

Při behaviorálních testech bylo naším úkolem zjistit, zda-li se liší potomstvo myši od samic nakažených a od kontrolních samic. Zvolili jsme proto behaviorální test light-dark box, který má za úkol měřit anxieta, a dále kladinu, která měří koordinaci a motoriku. Vzhledem k tomu, že při inbreedingu dochází u laboratorních zvířat k inbrední depresi (Lipp a Wolfer, 2003), bylo příhodné, že byla pro etologické pokusy použita F1 generace kříženců inbredních kmenů myši BALB/c a C57BL. Kříženci těchto dvou inbredních kmenů jsou izogenetičtí, na rozdíl od rodičovských kmenů jsou však heterozygotní. Bylo také prokázáno, že F1 kříženci dosahují lepších výsledků v testech učení a paměti a jsou zdravější než inbrední kmeny myši.

## Kladina

Překonávání kladiny je behaviorální test zaměřený na sledování motoriky a koordinace u laboratorních myši. Chování myši na kladině je motivováno snahou uniknout ze stresujícího prostředí. Základem testovací aparatury byla kladina o délce 50 cm a šířce 25 mm. Kladina byla upevněna 50 cm nad měkký povrch a upevněna na jednom konci ke kovové plošině. Během experimentu byla místnost osvětlena červenou žárovkou. Testovaná myš byla umístěna hlavou směrem od plošiny na volný konec kladiny. Měřena byla latence otočky myši směrem k plošině, čas potřebný k překonání lávky a celkový čas strávený na látce (Contet et al., 2001, Deacon et al., 2002). Časový limit byl 90 sekund. Kladina byla považována za překonanou, pokud byla myš alespoň jednou nohou na odpočinkové plošině. Pokud se myš neotočila nebo kladinu nepřekonala, byl jí do statistických testů počítán maximální čas, tj. 90 sekund.

## Light-dark box

Light-dark box měří míru anxiety u myši na základě jejich přirozeného chování preferovat tmavé prostředí a explorovat. V původní práci byla aparatura tvořena tmavým bezpečným kompartmentem (1/3) a větší osvětlenou částí (2/3). Délka pozorování byla 10 minut (Crawley a Goodwin, 1980). Velikost tmavé části byla různými autory modifikována a může tvořit víc než polovinu aparatury. Délka pozorování je zkrácena na 5 minut (Bourin a Hascoet, 2003). Měří se obvykle počet přechodů mezi osvětlenou a tmavou částí aparatury, latence prvního přechodu do tmavého prostoru (pokud myš začíná na světle).

Light-dark box probíhal v plastové aréně 54 x 32 x 22 cm osvětlené 40W žárovkou. V rohu arény byla umístěna tmavá krabička z červeného plexiskla o rozměrech 18 x 12 x 12cm. V delší straně krabičky byl vyříznut otvor o rozměrech 5 x 5 cm. Testovaná myš byla umístěna doprostřed arény hlavou od krabičky. Pozorování probíhalo 5 minut, poté byla myš přemístěna zpět do chovného boxu a obě části aparatury byly vyčištěny detergentem, opláchnuty vodou a vysušeny. Zaznamenané aktivity byly: latence přechodu do tmavé části, přechody a celkový čas strávený ve tmavé části.

### **4.2.6 Statistické zpracování dat**

Data získaná při etologických pokusech byla vyhodnocena pomocí programu STATISTIKA 6.0. Před vlastním vyhodnocením dat byly ze souboru vyřazeny odlehlé

hodnoty. Za odlehlé hodnoty byly považovány hodnoty lišící se od průměru pro danou skupinu o více než 2,5 násobek směrodatné odchylky. Počet vyloučených pozorování nebyl pro žádnou skupinu větší než 10 %. Pro data behaviorálních testů, která obsahovala nulové hodnoty (kladina, light-dark box) byla použita transformace ve tvaru  $X'=\log(X+1)$ . Pro testování změn hmotností byl použit obecný lineární model (GLM). V testování rozdílů hmotností byla jako kovariáta dosazen počet mláďat ve vrhu a vliv matky na daný vrh. Vzhledem k tomu, že v behaviorálních pokusech mohou být výsledky ovlivněny hmotností myši, byla do GLM testů jako kovariáta dosazena hmotnost. Při opakovaném měření hmotnosti byl použit test ANOVA opakované měření. Rozdíly ve sledovaných prvcích byly považovány za signifikantní, pokud byla dosažená hladina významnosti menší než 0,05.

### 4.3 Výsledky

Při zpracování výsledků si musíme uvědomit, že u mláďat pravděpodobně nedošlo ke kongenitálnímu přenosu a proto jsou pravděpodobně všechny zkoumané jevy zapříčiněny latentní toxoplazmózou matky nebo přenesenými protilátkami.

#### 4.3.1 Hmotnost mláďat

Hmotnost mláďat byla sledována během jejich 43 až 102 dnů stáří. Jelikož se přírůstek hmotnosti liší u obou pohlaví, jsou tato pohlaví sledována odděleně.

Rozdíly ve hmotnostech dvou skupin myši byly testovány pomocí testu GLM. Nezávislým faktorem byla binární veličina toxo (protilátky od matky negativní a pozitivní), závislá proměnná byla spojitá veličina hmotnost, které měla přibližně normální rozdělení. Jako kovariáta byl dosazen vliv matky a velikost vrhu.

#### Celý soubor

Podařilo se prokázat rozdíly ve hmotnostech mláďat od toxo-pozitivních matek a kontrolních matek. Rozdíly byly i v celkovém souboru, kde jsou sloučena obě pohlaví.

Vliv toxoplazmózy matky na mláďata se podařilo prokázat ve stáří 43-52 dní, 53-62 dní, 63-72 dní a 83-92dní (viz tabulka č.33).

Měřeny jsou vždy stejné myši, takže pozorování jsou nezávislá.

Tabulka č. 33 Hmotnost mláďat od matek s latentní toxoplazmózou a kontrolních mláďat ve stáří 43-72 dnů.

	Stáří 43-52				Stáří 53-62				Stáří 63-72			
	N	hmotnost	-0,95	0,95	N	hmotnost	-0,95	0,95	N	hmotnost	0,95	-0,95
Od kontrolních matek	45,00	25,24	24,12	26,35	61,00	26,40	25,52	27,28	49,00	26,83	25,97	27,69
Od toxo-pozitivních matek	41,00	23,36	22,24	24,48	71,00	25,11	24,25	25,96	62,00	25,80	24,84	26,76
p		0,0001				0,0003				0,0294		
F		15,9600				14,1100				4,8800		

Pokračování tabulky č. 33 Hmotnost mláďat od matek s latentní toxoplazmózou a kontrolních mláďat ve stáří 73-102 dnů.

	Stáří 73-82				Stáří 83-92				Stáří 93-102			
	N	hmotnost	-95%	95%	N	hmotnost	-95%	95%	N	hmotnost	-95%	95%
Od kontrolních matek	53,00	27,58	26,84	28,32	26,00	28,25	26,52	29,98	18,00	29,29	27,27	31,31
Od toxo-pozitivních matek	79,00	27,13	26,32	27,95	36,00	28,54	26,85	30,24	32,00	28,32	26,64	30,00
p		0,2596				0,0024				0,0971		
F		1,2800				10,1000				2,8700		

Při testování vlivu latentní toxoplazmózy matky na mláďata byl zjištěn signifikantní vliv působení velikosti vrhu a matky mláďat. Signifikantní rozdíl velikosti vrhu byl zjištěn ve stáří 43-52 dní ( $p=0,0017$ ,  $F=10,526$ ), 53-62 dní ( $p<0,0001$ ,  $F=18,408$ ), 63-72 dní ( $p<0,0001$ ,  $F=24,117$ ), 73-82 dní ( $p=0,0003$ ,  $F=13,86$ ), 83-92 dní ( $p<0,0001$ ,  $F=50,143$ ) a 93-102 dní ( $p<0,0001$ ,  $F=46,237$ ). Dále byl zjištěn signifikantní rozdíl vlivu matky ve stáří 53-62 dní ( $p=0,008$ ,  $F=7,262$ ) a 63-72 dní ( $p=0,0014$ ,  $F=10,719$ ).

#### Hmotnost v závislosti na pohlaví

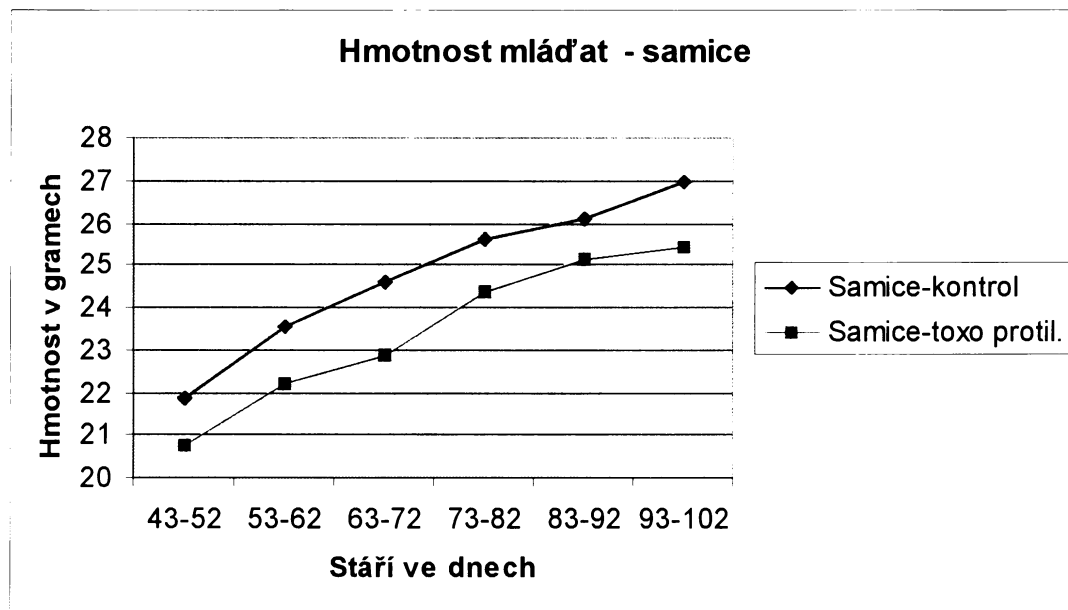
Největších rozdílů mezi stejně starými mláďaty bylo dosaženo když byla analyzována obě pohlaví zvlášť. Hmotnost mláďat samičího pohlaví od toxo-pozitivních matek byla nižší ve všech případech vážení (tj. 43-102 dnů stáří mláďat). Rozdíl hmotnost samců myši od toxoplazma-pozitivních matek byl signifikantně jiný ve stáří 43-52 dní, 53-62 dní, 63-72 dní, 83-92 dní a 93-102dní.



### Hmotnost mláďat samičího pohlaví

Hmotnost samic od toxoplasma-pozitivních matek a od kontrolních matek se signifikantně lišila během celé pozorovací období, tj. ve věku 43-102dní (tabulka č. 34). Na grafu č. 14 můžeme vidět stejnoměrné vzrůstání hmotností obou skupin myši v závislosti na věku.

Graf č. 14 Hmotnost samic mláďat myši od toxo-pozitivních a toxo-negativních matek v určitém časovém období.



Tabulka číslo 34 Hmotnosti samic myši od toxoplasma-pozitivních a toxoplasma-negativních matek stáří 43-72 dnů.

	Stáří 43-52				Stáří 53-62				Stáří 63-72			
	N	hmotnost	-95%	95%	N	hmotnost	-95%	95%	N	hmotnost	95%	-95%
Samice-kontrol	19	21,57	20,76	22,4	30	23,87	22,9	24,89	25	25	23,8	26,2
Samice-toxo protil.	22	20,6	20,08	21,1	35	22,11	21,6	22,63	30	22,89	22,2	23,6
p		0,0001				0,0000				0,0001		
F		18,9100				42,5600				18,0100		

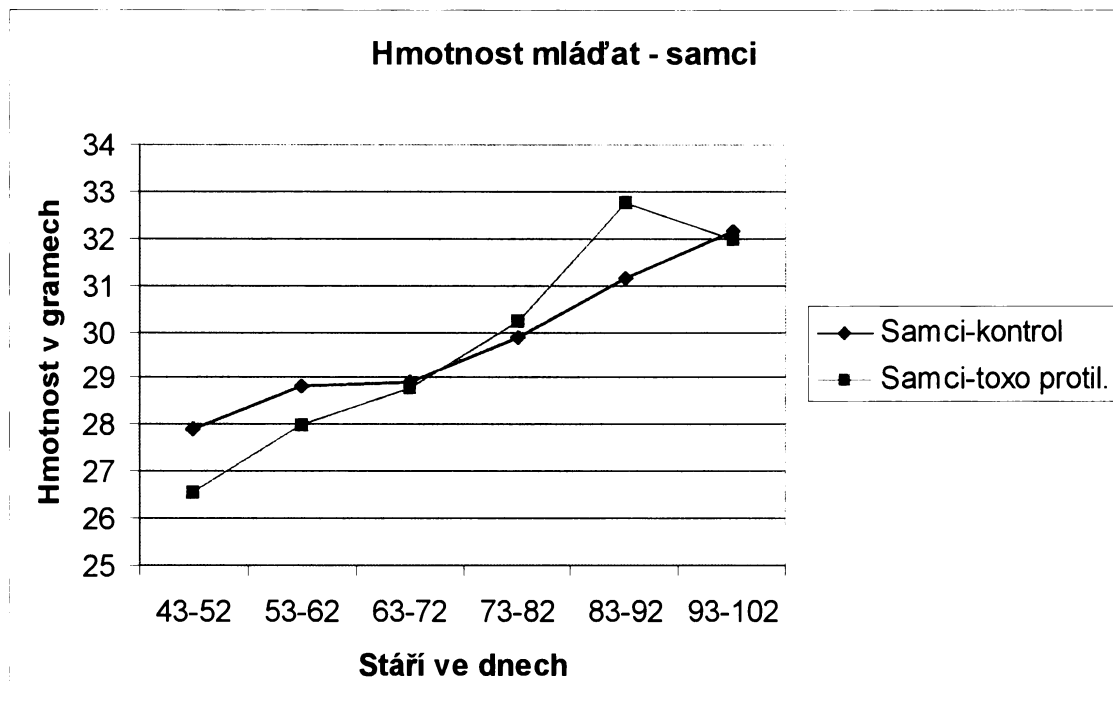
*Pokračování tabulky č. 34 Hmotnosti samic myši od toxoplasma-pozitivních a toxoplasma-negativních matek stáří 73-102 dnů.*

	Stáří 73-82				Stáří 83-92				Stáří 93-102			
	N	hmotnost	-95%	95%	N	hmotnost	-95%	95%	N	hmotnost	-95%	95%
Samice-kontrol	30	25,95	25,09	26,8	15	26,11	24,5	27,75	10	27,01	25,1	28,9
Samice-toxo protil.	40	24,39	23,9	24,9	20	25,18	24,6	25,79	18	25,45	24,7	26,2
p		0,0001				0,0001				0,0367		
F		17,7600				19,2100				4,8960		

### Hmotnost mláďat samčího pohlaví

Rozdíly hmotností u samců nebyly tak velké jako u samic. Přesto se zde jasně prokázal vliv toxoplasma-pozitivní matky na potomstvo (graf č. 15). Samci od toxoplasma-pozitivních matek byli ve stáří 43-52 dnů, 53-62 dnů, 63-72 dnů, 93-102 dnů signifikantně lehčí než samci od toxoplasma-negativních matek. Ve stáří 83-92 dnů byli samci od toxo-pozitivních matek signifikantně těžší než kontrolní skupina (tabulka č. 35).

*Graf č. 15 Hmotnost samců mláďat myši od toxo-pozitivních a toxo-negativních matek v určitém časovém období.*



*Tabulka číslo 35 Hmotnosti samců myši od toxoplasma-pozitivních a toxoplasma-negativních matek stáří 43-72 dnů.*

	Stáří 43-52				Stáří 53-62				Stáří 63-72			
	N	hmotnost	-95%	95%	N	hmotnost	-95%	95%	N	hmotnost	95%	95%
Samci-kontrol	26	27,92	27,07	28,8	31	28,86	28,2	29,57	24	28,74	28	29,4
Samci-toxo protil.	19	26,56	25,37	27,8	36	28,02	27,2	28,86	32	28,53	27,5	29,6
p		0,0162				0,0005				0,0234		
F		6,2900				13,4300				5,4600		

*Pokračování tabulky č. 35 Hmotnosti samců myši od toxoplasma-pozitivních a toxoplasma-negativních matek stáří 73-102 dnů.*

	Stáří 73-82				Stáří 83-92				Stáří 93-102			
	N	hmotnost	-95%	95%	N	hmotnost	-95%	95%	N	hmotnost	-95%	95%
Samci-kontrol	23	29,72	29,14	30,3	11	31,16	28,4	33,96	8	32,14	29	35,3
Samci-toxo protil.	39	29,95	28,99	30,9	16	32,76	30,2	35,27	14	32,01	29,3	34,8
p		0,2969				0,0025				0,0367		
F		1,1100				11,4960				5,0920		

Při použití ANOVA testu opakovaného měření byly hodnoty R1 x TOXO protilátky u samic ve stáří 43-72 dnů  $p=0,251$  ( $F=1,43$ ) a ve stáří 73-102 dnů  $p=0,17$  ( $F=1,833$ ). U samců byly hodnoty opakovaného měření R1 x TOXO protilátky ve stáří 43-72 dnů  $p=0,105$  ( $F=2,4$ ) a ve stáří 73-102 dnů  $p=0,194$  ( $F=1,718$ ).

### 4.3.2 Behaviorální pokusy

#### Kladina

U celého souboru 192 myši se nepodařil prokázat signifikantní rozdíl v čase otočky nebo přežení kladiny u mláďat od toxoplasma-pozitivních a toxoplasma-negativních matek (otočka:  $p=0,489$ ,  $F=0,4807$ , přežení  $p=0,2082$ ,  $F=1,595$ ). Výsledky jsou v tabulce č. 36.

Doba otočení a přežení lárky korelovala s hmotností (otočení  $p=0,0066$ ,  $F=7,5383$ , přežení  $p=0,0005$ ,  $F=12,716$ ).

Samci byli signifikantně rychlejší než samice v čase otočky ( $p=0,0012$ ,  $F=10,8209$ ) a signifikantně pomalejší v čase přežení lárky ( $p=0,0061$ ,  $F=7,688$ ).

Tabulka č. 36 Výsledky testu kladina aplikovaný na mláďata od toxo-pozitivních a toxo-negativních matek

	Od kontrolních matek (N=88)		Od toxo-pozitivních matek (N=104)		F	p
	průměr	SD	průměr	SD		
Otočka	28,72	30,50	25,24	27,45	0,481	0,489
Přezení	70,40	27,84	74,40	25,95	1,595	0,208

### Light-dark box

Rozdíl v chování u mláďat od toxoplazma-pozitivních a toxoplazma-negativních matek nebyl statisticky signifikantní (tabulka č. 37).

Samci strávili v porovnání se samicemi kratší časový úsek v tmavé části aparatury ( $p=0,0335$ ,  $F=4,5876$ ).

Tabulka č. 37 Výsledky testu light-dark box aplikovaný na mláďata od toxo-pozitivních a toxo-negativních matek

Prvek chování	Od kontrolních matek (N=83)		Od toxo-pozitivních matek (N=104)		F	p
	průměr	SD	průměr	SD		
Latence přechodu do tmavé části	55,21	45,68	65,13	50,18	2,03	0,156
Čas ve tmavé části	37,46	27,52	37,85	29,72	0,00	0,986
Přechody	13,76	8,68	13,47	8,05	0,08	0,776

# 5 Vliv antitoxoplasmických protilátek na infekci toxoplazmózou

## 5.1 Cíl práce

Cílem práce bylo zjistit, zda-li přenesené protilátky proti *Toxoplasma gondii* ochrání mláďata myši z kapitoly 4 před infekcí toxoplazmózou nebo zda dojde k zmírnění příznaků infekce.

## 5.2 Materiál a metody

### 5.2.1 Příprava experimentálních zvířat

K pokusu byly použity dvě skupiny po dvaceti kusech samic myši ve stáří průměrně dva měsíce. Polovina pocházela od matek s latentní toxoplazmózou a polovina byla od kontrolních matek. Oběma skupinám myši byla podána dávka cca 10 cyst *Toxoplasma gondii* kmenu HIF.

### 5.2.2 Sledování změny hmotnosti

U myši byla vážená hmotnost těsně před infekcí a během infekce. Vážení probíhalo ve stejnou denní dobu.

### 5.2.3 Stanovení titru protilátek

Stanovení množství protilátek v séru komplement-fixační reakcí (KFR)

Experimentálním zvířatům byla odebrána krev ze supraorbitálního sinu. Zvířata byla uspána anestetikem Narkotan (Zentiva). Z krve bylo centrifugací získáno sérum, které bylo dále zpracováno metodou KFR.

Myši sérum bylo inaktivováno v 56 °C teplé vodní lázni (45min). Do jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 25 µl veronalového pufru (Oxoid). Do první jamky v každé řadě bylo přidáno 25 µl inaktivovaného séra, opakovaným přenesením 25 µl směsi séra a pufru do další jamky byla séra naředěna dvojkovou řadou od 1:2 do 1:4000. Ředění 1:2 se dále nevyužívá, ředění 1:4 slouží jako kontrola antikomplementarity a přidává se k němu 25 µl veronalového pufru. Do ostatních jamek bylo přidáno 25 µl antigenu (Sevac). Po dodání antigenu bylo do všech jamek napipetováno 50 µl komplementu (Sevac). Výsledný objem byl

proto v každé jamce 100  $\mu$ l. Destičky byly protřepány a inkubovány přes noc ve vlhké komůrce o teplotě 4 °C. Po inkubaci bylo do jamek přidáno 25  $\mu$ l hemolytického systému. Hemolytický systém byl připraven z hemolyzínu (Sevac) a 2,8 % suspenze beraních erytrocytů v poměru 1:1 a senzibilizován 30 minut v 37 °C teplé vodní lázni. Po přidání hemolytického systému byly destičky protřepány a inkubovány 60 minut ve vlhké komůrce o teplotě 37 °C. V polovině inkubace byly destičky protřepány. Reakce byla zastavena přemístěním destiček do teploty 4 °C. Po 60 minutách byl odečten výsledek.

Pokud sérum obsahuje protilátky proti *Toxoplasma gondii* vzniká komplex antigen-protilátka, který váže komplement a zabraňuje lyzi beraních krvinek. Stupeň hemolýzy odpovídá množství protilátek v séru. Nejnižší ředění, při kterém ještě sedimentují nezlyzované erytrocyty, je udáváno jako výsledný titer protilátek. Pokud sérum neobsahuje protilátky, dochází k úplné hemolýze beraních erytrocytů.

Pro kontrolu správnosti provedení reakce bylo použito kontrolní pozitivní a negativní lidské sérum. Byla též provedena kontrola antigenu (dvě jamky s napipetovaným množstvím 25  $\mu$ l veronalového pufru, 25  $\mu$ l antigenu a 50  $\mu$ l komplementu), kontrola komplementu (50  $\mu$ l veronalového pufru, 50  $\mu$ l komplementu) a kontrola hemolytického systému (100  $\mu$ l veronalového pufru).

#### **5.2.4 Detekce parazita v krvi metodou PCR**

Po nakažení myši jsme úspěšnost infekce obvykle testovali stanovením titru protilátek cca 2 měsíce po infekci metodou komplement fixační reakce. Přítomnost prvoků v krvi nebo v plodové vodě je však možno prokázat i přímo pomocí metody PCR (polymerázová řetězová reakce) (Dupon et al., 1995, Jenum et al. 1998, Čermáková et al., 2005) a Real Time PCR (kvantitativní PCR) (Lin et Al., 2000, Romand et al., 2004). Podstatou PCR reakce je mnohonásobné namnožení určitého úseku DNA. Namnožování provádíme opakovaným střídáním fází denaturace, nasednutí primerů a syntézy DNA, které jsou charakteristické specifickými teplotami. K vizualizaci produktů se používá agarový gel s etydiumbromidem. V našem pokusu jsme použili stejné primery (viz tab. 39) pro replikaci genu ITS1 (18S rRNA) z prvoka *Toxoplasma gondii* jaké použil článku Jauregui et al., 2001 a pokusili jsme se optimalizovat PCR metodu upravením teplot a složením amplifikační směsi. Dále jsme se pokusili optimalizovat použité teplotní cykly (jejich počet, trvání a teploty), protože původní protokol (tab. č. 39, 40) byl vytvářen pro Real-Time PCR (kvantitativní PCR).

*Tabulka č.38 Použité primery*

<b>Toxo ITS1</b>	
Sense primer	5' GATTTGCATTCAAGAAGCGTGATAGTA-t 3'
Antisense primer	5' AGTTTAGGAAGCAATCTGAAAGCACATC 3'

*Tabulka č. 39 Jauregui et al., 2001. Obsah reagensii do 50 µl reakce.*

50 µl reakce obsahuje:	
1 x	TaqMan pufr A (Applied Biosystems)
1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 µM	každého primeru
200 nM	fluorescentní próba
200 nM	deoxynukleotid trifosfát
1 U	AmpliTaq Gold polymeráza

*Tabulka č. 40 Jauregui et al., 2001 Teplotní cykly PCR*

PCR cykly		
1 x		
aktivace DNA polymerázy	10 minut	95 °C
50 x		
rozvolnění DNA	15 sekund	94 °C
nasednutí polymerázy	1 minuta	60 °C
syntéza DNA	...	72 °C

Postupnou optimalizací podmínek amplifikace jsme dospěli k následujícímu protokolu.

Ze části tkáně hostitele se vyzoluje DNA. DNA izolujeme pomocí běžně dostupného komerčního kitu k izolaci DNA z krve nebo použijeme následujícího postupu. K 1 ml vzorku se přidá 2 ml lyzačního roztoku (guanidium, TRIS, EDTA, SDS, merkaptoethanol) a 8 ml chloroformu. Tato směs se třepe asi 5 minut a poté zcentrifuguje po dobu 5 minut na 6000 otáček. Do nové zkumavky se přidá opět 8 ml chloroformu a vodná fáze z původní zkumavky. Opět se protřepává a centrifuguje a celý postu se opakuje třikrát. Nakonec se do čisté zkumavky odebere vodná fáze a přidá se asi 0,8 objemového dílu isopropanolu. Takto se dají

vzorky skladovat v mrazáku při teplotě -20 °C. Před použitím do reakce se vzorky vytemperují na pokojovou teplotu, zcentrifugují po dobu 3 minut na 1000 otáček. Odebere se vrchní část a k usazenině se přidá 70 % alkohol. Opět se vzorek zcentrifuguje, odebere se alkohol pipetou a zbytek se nechá asi 20 minut při pokojové teplotě oschnout. K vysušené DNA se přidá 200-400 µl TE pufru (10 mM TRIS, 1mM EDTA).

Pro přípravu směsi na reakci PCR se použijí složky uvedené v tabulce č. 41.

*Tabulka č. 41 Obsah reagentů do 20 µl PCR reakce.*

<b>Do 20 µl reakce jsme použili:</b>		
	množství	koncentrace
destilovaná, vyklávaná H <sub>2</sub> O	11,3 µl	
Taq pufr +(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -MgCl <sub>2</sub> (Fermentas)	2 µl	10 x
dNTP(Fermentas)	1 µl	2mM
MgCl <sub>2</sub> (Fermentas)	1,5 µl	25mM
primery	1 µl od každého primeru	10µM
Taq polymeráza (Fermentas)	0,2 µl	5 U/1 µl
DNA	2 µl	

Poté se zkumavka se směsí (tab. č. 41) umístí do cykleru a použijí se teploty uvedené v tabulce č.42.



Tabulka č. 42 Teplotní cykly

PCR cykly		
1 x		
aktivace DNA polymerázy	2 minuty	94 °C
35 x		
denaturace DNA	30 sekund	94 °C
nasednutí primerů	1 minuta	60 °C
syntéza DNA	30 sekund	72 °C

Produkt reakce PCR se dále detekuje elektroforézou na agarózovém gelu. Principem je separace DNA podle rychlost pohybu DNA, která závisí jednak na jejích vlastnostech (molekulová hmotnost - velikost, elektrický náboj, prostorové uspořádání), na vlastnostech nosiče (gelu), prostředí (pufru) a na přivedeném napětí. Je zde využita skutečnost, že DNA má vždy negativní náboj. K separaci DNA se používá pufr s přídavkem tris-acetát EDTA. Pro vizualizaci elektroforetických gelů se použije metoda barvení agarózových gelů pomocí ethydiumbromidu. Využívá se vlastnosti fluorescenční molekuly ethydiumbromidu vmezeřovat se (interkalovat) do vlákna nukleových kyselin. Metoda PCR se používá při zjištění přítomnosti či nepřítomnosti daného genu z určitého organismu.

### 5.2.5 Počet cyst v mozku

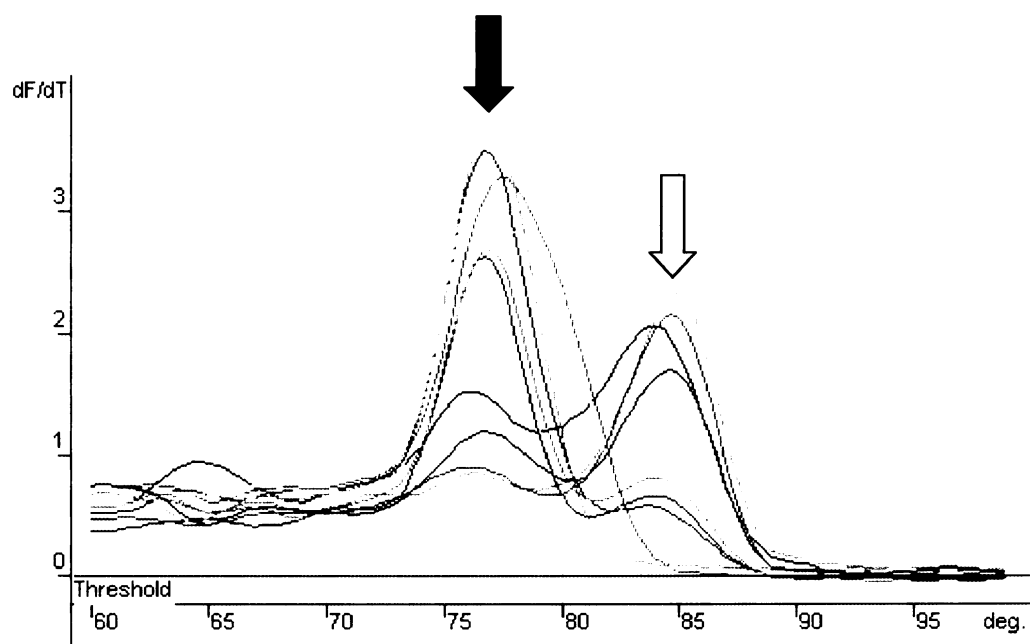
#### Kvantifikace množství prvoků v mozku

Intenzita nákazy *Toxoplasma gondii* byla kvantifikována počtem cyst v mozku. Myš byla utracena a z lebky byl vyjmut mozek. Mozek byl zhomogenizován a naředěn na 2 ml fyziologickým roztokem. Cysty byly počítány pod mikroskopem v množství 10 x 10 µl. Celkový počet cyst na mozek byl z tohoto množství vypočítán.

Pro kvantifikaci parazita v těle hostitele by byla teoreticky vhodná metoda kvantitativní RT PCR (Real-Time PCR) (Jauregui et al., 2001, Contini et al., 2005, Ordinaire et al., 2005). Real Time PCR jsme prováděli pomocí cykleru Rotor-Gene (firma Corbett). Tato metoda umožňuje pomocí cykleru zjistit množství amplifikovaného úseku DNA během každého cyklu. Pomocí zjištění teplot tání daného produktu lze tento produkt identifikovat. A na rozdíl

od klasické metody PCR není nutné k vizualizaci produktu používat agarový gel s etydiumbromidem, množství produktu je odčítáno cyklem v závislosti na fluorescenci barviva Sybr Green. Syber Green funguje tak, že jeho fluorescence se zvyšuje při navázání na dvouřetězcovou DNA. Nevýhodou je, že se váže na nespecifické produkty a primer-dimery. Při použití Real Time PCR s používanými primery (tab. 38) jsme dostávali pravděpodobně primer-dimery nebo nespecifické produkty (graf č. 16)

Graf č. 16 Teplota tání jednotlivých produktů při použití Syber Greenu (Real Time PCR).



Červená šipka ukazuje na nespecifické produkty, zelená šipka na cílový produkt.

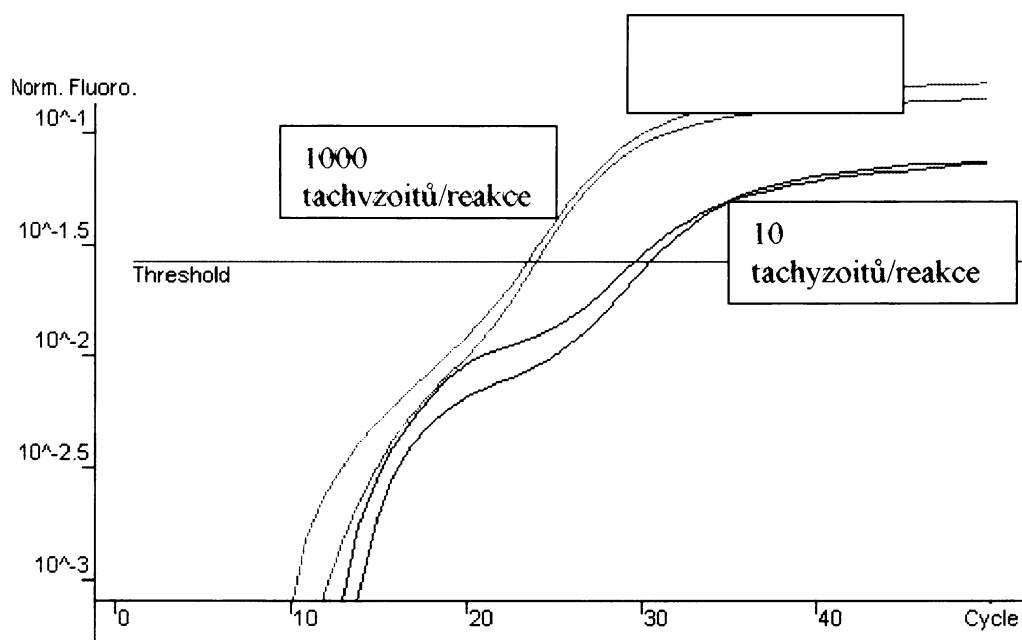
Proto jsme přistoupili k použití duálně značené BHQ1-FAM fluorescenční sondy (Generi Biotech). Sekvence sondy byla 5' - CTG CGC TGC TTC CAA TAT TGG-3'. Na rozdíl od původní z článku Jauregui et al., 2001 byla použita jiná fluorescenční barviva. Do real-time PCR cyklu byly vloženy vzorky složení (viz tabulka č.43)

Tabulka č. 43 Obsah reagensií do 25  $\mu$ l Real Time PCR reakce.

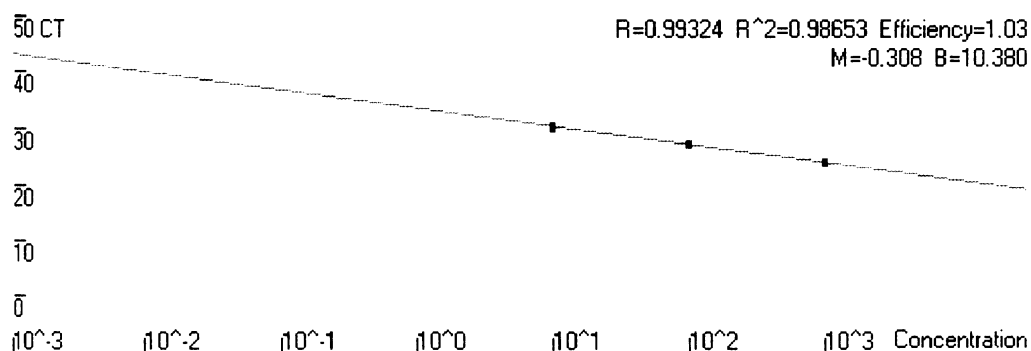
Do 25 $\mu$ l reakce jsme použili:		
	množství	koncentrace
destilovaná, vyklávaná H <sub>2</sub> O	16,45 $\mu$ l	
Taq pufr +(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -MgCl <sub>2</sub> (Fermentas)	2 $\mu$ l	10 x
dNTP (Fermentas)	1 $\mu$ l	2mM
MgCl <sub>2</sub> (Fermentas)	1,5 $\mu$ l	25mM
primery	1 $\mu$ l od každého primeru	10 $\mu$ M
Taq polymeráza (Fermentas)	1 $\mu$ l	1 U/1 $\mu$ l
BHQ1-FAM (Generi Biotech)	0,05 $\mu$ l	0,1 mM
DNA	1 $\mu$ l	

Pro PCR reakci byly použity stejné teploty jako jsou uvedeny v tabulce 42. Cykly ale nebyly opakovány 35 krát ale 50 krát. Fluorescence sondy BHQ1-FAM byla měřena v posledním kroku (72 °C, 30 sekund).

Graf č. 17 Závislost fluorescence na počtu cyklů - přepočtená data (Quantitation data)



Graf č. 18 Standartizační přímka



Při metodě Real-Time PCR byli použity tachyzoiti ve známé koncentraci. Při koncentraci 1000 tachyzoitů/reakce byla vypočtena koncentrace 1201, 854 tachyzoitů, při koncentraci 100 tachyzoitů/reakce byla vypočtena koncentrace 97, 87 tachyzoitů. Při koncentraci 10 tachyzoitů/reakce byla vypočtena koncentrace 15, 8 tachyzoitů. Pokud byla koncentrace menší než 10 tachyzoitů na reakci, nebyl zaznamenán žádný obsah DNA. Pomocí tohoto standartu, který jsme vytvořili, by se mohla za přítomnosti dalšího referenčního hostitelského genu kvantifikovat *Toxoplasma gondii* ve tkáni. V průběhu diplomové práce se nám bohužel nepodařilo standardizovat tuto metodu pro bradyzoity v mozkové tkáni do takové míry, abychom i zde získali rozumnou koncentrační závislost a mohli tak využít Real Time PCR pro kvantifikaci intenzity nákazy (jak jsme původně zamýšleli).

### **5.2.6 Statistické zpracování dat**

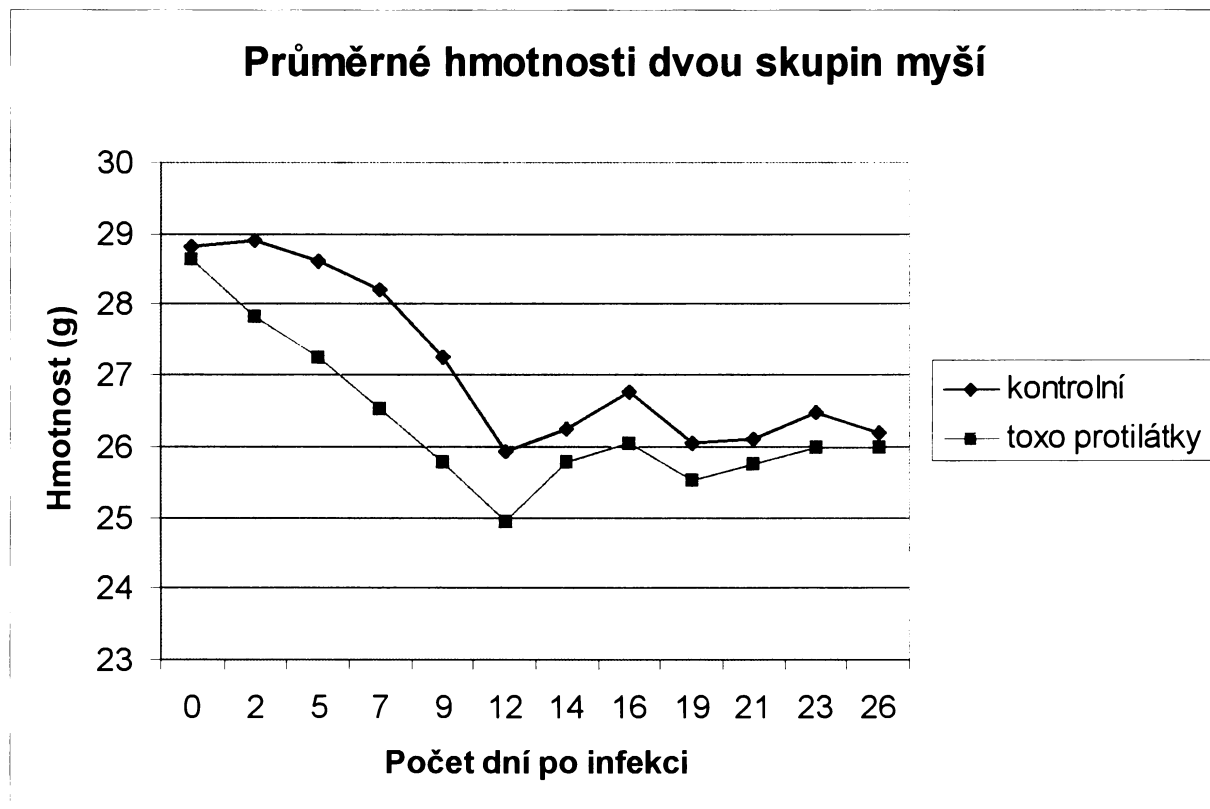
Data byla zpracována v programu Statistica verze 6.0. Rozdíly ve hmotnostech dvou skupin myši byly testovány pomocí testu GLM (obecný lineární model). Nezávislým faktorem byla binární veličina toxo protilátky (negativní, pozitivní toxo protilátky od matky), závislá proměnná byla spojitá veličina hmotnost, která měla přibližně normální rozdělení. Jako kovariáta byl dosazen vliv matky. V testování titrů protilátek byl použit neparametrický Kendallův test.

## **5.3 Výsledky**

### **5.3.1 Sledování změn hmotnosti**

Hmotnosti myši byly v den infekce a potom pravidelně třikrát týdně zaznamenávány. Během prvního vážení před infekcí nebyl rozdíl ve hmotnostech statisticky signifikantní ( $p=0,1374$ ,  $F=2,308$ ). Největší úbytek hmotnosti byl zaznamenán 12. den po infekci. Během dvou měsíců po infekci neuhynulo žádné zvíře. V průběhu infekce došlo u každé skupiny k jiným změnám ve hmotnosti. Mláďata od matek s latentní toxoplazmózou měla větší ztrátu hmotnosti než kontrolní skupina a pokles hmotnosti u nich začínal dříve.

Graf č.19 Závislost hmotnosti myši od toxo-positivních matek a toxo-negativních matek na době po infekci



Tabulka č. 44 Hmotnost myši od toxo-positivních matek a toxo-negativních matek po infekci

Počet dní po infekci	Kontroly (N=20)		Od toxo-positivních matek (N=19)		F	p
	průměr	SD	průměr	SD		
0	28,82	3,64	28,67	2,07	2,308	0,1374
2	28,91	3,54	27,83	2,00	8,865	0,0052
5	28,61	3,80	27,26	1,63	9,114	0,0047
7	28,22	3,67	26,55	1,41	11,346	0,0018
9	27,27	3,11	25,78	1,60	11,567	0,0017
12	25,93	2,92	24,97	1,64	5,977	0,0195
14	26,26	2,92	25,78	1,20	2,662	0,1115
16	26,78	2,77	26,05	1,02	6,287	0,0168
19	26,07	2,51	25,53	0,96	3,643	0,0643
21	26,13	2,65	25,70	1,06	4,186	0,0481
23	26,50	2,54	26,01	0,94	3,681	0,0630
26	26,21	2,55	26,01	1,23	3,602	0,0658
28	26,49	2,69	26,16	1,00	3,413	0,0729
30	26,57	2,71	26,36	0,99	3,410	0,0730

### 5.3.2 Titr protilátek

Sérologické vyšetření potvrdilo přítomnost protilátek u 39 myší (97,5%). Jedna myš se nenakazila a ze souboru byla proto vyřazena. Při použití neparametrického Kendallova testu byla hodnota  $p < 0,001$ , což znamená, že dvě skupiny myší se statisticky signifikantně lišily.

Jak vyplývá z tabulky č. 45 bylo největší zastoupení myší s titrem 4000 a více. Na grafu č. 20 můžeme vidět jednotlivé zastoupení titrů protilátek u infikovaných mláďat od kontrolních toxo-pozitivních matek.

Tabulka č. 45 Procentuální zastoupení titrů protilátek u infikovaných mláďat myší

Titr protilátek	Počet procent myší
512	4,65
1024	18,60
2048	9,30
4000 a více	58,14

Graf č. 20 Titry protilátek mláďat myší od kontrolních a od toxo-pozitivních matek



### 5.3.3 Detekce parazita v krvi pomocí metody PCR

Právě 14 dní po infekci se nám podařilo identifikovat prvoka *Toxoplasma gondii* v krvi. Od myši 14 dní po infekci byla odebrána srážlivá krev a z plazmy zizolována DNA. Celý postup metody PCR se opakoval 2 krát. Podruhé byl místo vyizolované DNA z plazmy použit jako vzorek produkt předchozí PCR reakce. Tím se pravděpodobnost pozitivního nálezu zvýšila.

### 5.3.4 Počet cyst v mozku

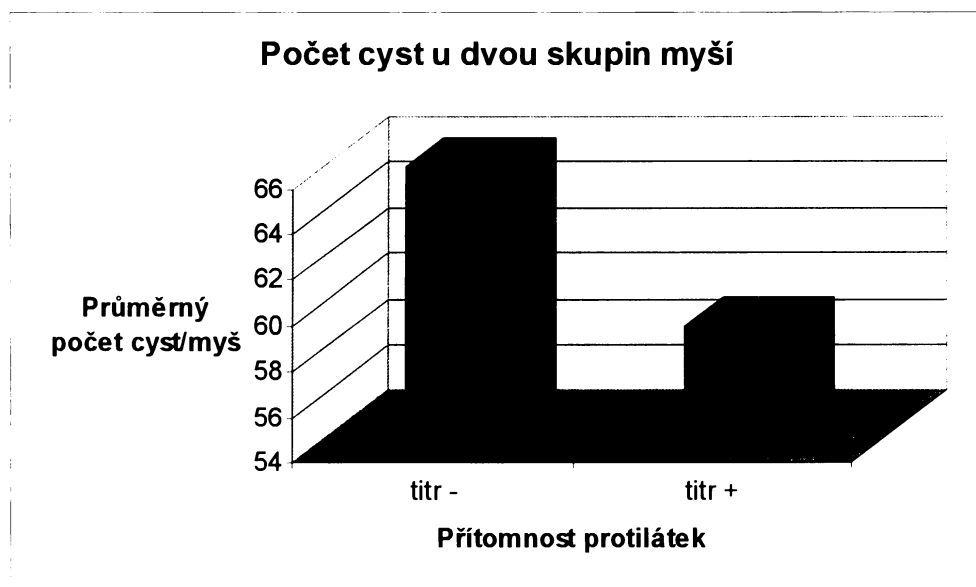
Cysty byly počítány z homogenizátu dva měsíce po infekci. Minimální záchytnost byla 20 cyst na mozek. Ve dvou případech se nepodařilo cysty prokázat (4,7%), ale vzhledem k diagnostickému titru protilátek jsme tyto případy považovali jako pozitivní na toxoplazmózu. Rozdíl počtu cyst u mláďat od matek s latentní toxoplazmózou a od kontrolních matek se nepodařilo prokázat ( $p=0,608$ ,  $F=0,268$ ). Největší zastoupení měly skupiny s počtem 20 a 40 cyst na mozek (tabulka č. 46), což představuje poměrně nízkou infekci a jedná se o vhodný model pro testování latentní toxoplazmózy.

Tabulka č. 46 Počet procent cyst v mozcích myši

Počet prokázaných cyst/mozek	Počet procent myši
0	4,65
20	18,60
40	18,60
60	16,28
80	9,30
100	9,30
120	4,65
140	6,98
160	2,33



Graf č. 21 Průměrný počet cyst u infikovaných mláďat od kontrolních matek (titr -) a od matek s latentní toxoplazmózou (titr +)



Z grafu č. 21 můžeme vidět, že infikovaná mláďata od toxo-pozitivních matek měla pravděpodobně méně cyst než infikovaná mláďata od kontrolních matek. Tento rozdíl se nám však nepodařilo prokázat statisticky signifikantně (tabulka č. 47)

Tabulka č.47 Počet cyst na mozek mláďate od toxo-pozitivních matek a toxo-negativních matek

	Od kontrolních matek (N=20)		Od toxo-pozitivních matek (N=19)		F	p
	průměr	SD	průměr	SD		
Počet cyst/mozek	66,00	39,52	58,95	45,45	0,268	0,608

## 6. Diskuze

Cílem této studie bylo prokázat případný vliv latentní toxoplazmózy matky na potomstvo, a to jak na lidském, tak i na zvířecím modelu. V obou případech se jednalo o explorační výzkum a proto bude nutné získané výsledky potvrdit na nezávislých souborech. Naše výsledky naznačují, že latentní toxoplazmóza matky má vliv na potomstvo. Diskuze získaných výsledků byla pro přehlednost rozřazena do jednotlivých bloků, které odpovídají jednotlivým kapitolám: kapitola 3 (Vliv latentní toxoplazmózy na děti), 4 (Vliv latentní toxoplazmózy na potomstvo myši), 5 (Vliv antitoxoplasmických protilátek na infekci toxoplazmózou).

### 6.1 Vliv latentní toxoplazmózy na děti

#### Zdravotní stav matky během těhotenství

Zdravotní stav matky se zjišťoval pomocí souboru otázek v dotazníku, který byl ženám zaslán poštou. Než přistoupíme k diskuzi výsledků, je třeba zdůraznit, že právě zdravotní stav byl matkou hodnocen relativně objektivně. Vlivy na hodnocení zdravotních problémů mohou být subjektivní i objektivní, ale většina ze sledovaných proměnných vycházela z lékařského hodnocení. Proto lze předpokládat, že většina údajů týkajících se sledovaných zdravotních problémů nebyla zkreslena subjektivním vnímáním matky.

Jako signifikantní se zde ukázal vliv toxoplazmózy matky na pravděpodobnost těhotenské cukrovky ve 2. trimestru ( $\chi^2$  kvadrát=4,8314,  $df=1$ ,  $p=0,0279$ ), přičemž infikované ženy měly nižší pravděpodobnost cukrovky. Je pochopitelně otázkou, zda může být těhotenská cukrovka zlepšována latentní toxoplazmózou nebo zda může latentní toxoplazmóza působit přímo preventivně. V literatuře se nám nepodařilo najít žádné údaje o této souvislosti. Spíše by se dalo očekávat, že těhotenská cukrovka se v případě matky s latentní toxoplazmózou bude zhoršovat. V případě latentní toxoplazmózy totiž dochází k encystaci *Toxoplasma gondii* ve svalech a různých orgánech (mozek, srdce a další) a mohla by tedy existovat zhoršená funkce ledvin z důvodu encystace parazita v ledvinách. Těhotenská cukrovka je objektivní nález, takže se dá vyloučit např. vliv větší citlivosti *Toxoplasma*-negativních žen ke vnímání příznaků onemocnění. Možné je, že přítomnost tkáňových cyst v některých orgánech by mohla ovlivňovat metabolismus glukózy a tím působit na prevenci

těhotenské cukrovky. Přítomnost tkáňových cyst v ledvinách dokazuje publikace Wulf et al., 2005, která popisuje reaktivaci toxoplazmózy po transplantaci ledvin. V současnosti se ovšem daleko spíše přikláníme k závěru, že se jedná o artefakt explorační studie – konkrétně o náhodný pozitivní výsledek jednoho z mnoha prováděných statistických testů. Může jít také o problém malého počtu případů (matek s těhotenskou cukrovkou bylo 22 a z toho pouze 4 matky byly toxo-pozitivní).

### Nálady matky během těhotenství

V naší studii jsme prokázali signifikantní vliv latentní toxoplazmózy matky na deprese během těhotenství. Ženy s latentní toxoplazmózou měly během těhotenství větší sklon k pocitu deprese než kontrolní ženy. V psychologickém dotazníku byla použita škála 1-7, kdy jedna znamenala rozhodně ne, 7 rozhodně ano. *Toxoplasma*-pozitivní ženy měly průměr 2,54 a kontrolní skupina žen 2,05. Neznamená to však nutně, že by ženy s latentní toxoplazmózou trpěly v průběhu těhotenství depresí. Výsledky pouze ukazují, že ženy s latentní toxoplazmózou se cítily o trochu víc posunuty ve směru k depresi. Změna nálady během těhotenství může být způsobena jiným subjektivním vnímání sama sebe u žen s latentní toxoplazmózou a u kontrolních žen, což se projeví jinými odpověďmi na otázky v dotazníku. Dalším možným vysvětlením je změněné hodnocení sama sebe v závislosti na době od porodu. V našem statistickém modelu jsme však vliv různého časového úseku od porodu do vyplnění dotazníku použili jako kovariátu a tato interakce nebyla signifikantní, čímž bylo toto vysvětlení vyvráceno.

Vlivem latentní toxoplazmózy na osobnostní faktory žen se zabýval článek Flegr et al., 2000 který popisuje posunutí některých psychologických faktorů u toxo-pozitivních žen. Mechanismus působení latentní toxoplazmózy na psychiku člověka není znám, ale bude pravděpodobně souviset s ovlivněním některých neurotransmiterů v mozku nebo jejich drah. Latentní toxoplazmóza je spojována s poklesem „novelty seeking“ u člověka, tedy faktoru, jehož hladina negativně koreluje s hladinou dopaminu v mozku. Nižší novelty seeking by tedy mohlo být způsobeno vyšší hladinou dopaminu v mozku infikovaných osob (Skallová et al., 2005).

## Průběh těhotenství

Prokázali jsme, že průběh těhotenství nebyl signifikantně ovlivněn latentní toxoplazmózou matky. Určitý trend jsme zaznamenali u proměnné porod 1 (tj. předčasný, v termínu, dítě přenášeno). Při testování log-lineární analýzou byly do modelu zahrnuty veličiny TOXO x pohlaví dítěte x porod 1. Projevila se zde interakce TOXO x porod 1, které ovšem nebyla signifikantní (chí kvadrát=5,4772, df=2, p=0,064). Pokud se termín porodu považoval za ordinální veličinu (0-předčasný porod, 1 porod v termínu, 2 dítě přenášeno) a souvislost mezi toxoplazmózou a časem porodu se analyzovala pomocí logistické regrese, byl vliv toxoplazmózy na termín porodu statisticky signifikantní (chí kvadrát=5,3, df=1, p=0,0225). To znamená, že termín porodu byl u toxo-positivních matek statisticky signifikantně posunut ve směru dítě přenášeno. Delší těhotenství u žen s latentní toxoplazmózou je popisováno v článku Flegr et al., 2005. Jako pravděpodobný důvod je uveden pomalejší fetální růst. V diplomové práci Šárky Kaňkové (2005) bylo pozorováno u toxo-positivních žen delší těhotenství. Délka těhotenství byla signifikantní větší pokud šlo o měření podle poslední menstruace (p=0,0151) a stejně tak podle ultrazvukového vyšetření (p=0,0256). Odůvodněním, proč dochází k prodloužení těhotenství může být např. pomalejší vývoj plodu u žen s latentní toxoplazmózou. Den porodu nastává od 266 dne těhotenství a porody, které se uskuteční dříve bývají označovány jako předčasné (Moore a Persaud, 2002). Titiž autoři popisují, že v případě některých chronických chorobných stavů, může dojít ke změnám v oběhu krve mateřskou částí placenty nebo ke změně děložního oběhu a to může vyvolat podvýživu plodu. V případě, že by šlo u zárodku o zpomalený vývoj, můžeme předpokládat, že latentní toxoplazmóza pravděpodobně „vypíná“ nějaký mechanismus kontroly jakosti embrya a v důsledku toho může docházet k donošení dětí s menšími vývojovými vadami. V práci Hostomské et al., 1957 je zmíněna vyšší prevalence toxoplazmózy u matek mongoloidního dítěte. Pravděpodobně v důsledku imunosuprese způsobené toxoplazmózou mohou matky donosit plody, které by jinak byly při „kontrolě jakosti“ matčiným tělem potraceny.

## Růst a spánek dítěte

V naší práci bylo zjištěno ovlivnění růstu a frekvence spánku dítěte latentní toxoplazmózou matky.

Hmotnost chlapců od toxo-positivních matek byla ve stáří 1,5 let o něco větší než u chlapců od kontrolních matek. Tento trend se však pouze blížil hranici signifikance ( $p=0,0576$ ,  $F=3,4861$ ).

Ve výšce dítěte byl též nalezen trend ve věku 6ti měsíců - dívky od toxo-positivních matek byly nižší ( $p=0,0645$ ,  $F=3,4861$ ). Testováním výšky ANOVA testem opakovaného měření v období od 6 týdnů do tří let jsme získali hodnotu  $R1 \times TOXO$  u dívek  $p=0,006$ . Velmi pravděpodobným důvodem by mohlo být přetrvávání důsledků zpomaleného vývoje dítěte ke kterému dochází u toxo-positivních matek během intrauterinního vývoje. Tímto jevem se zabývá práce Flegr et al. (2005), ve které byly pozorovány nepřímé indicie zpomaleného vývoje zárodku v prvních týdnech gravidity. Důvod proč tomu taky tak není v případě dětí mužského pohlaví není příliš jasný. Je však možné, že u chlapců od toxo-positivních matek dochází k působení dalšího mechanismu, který působí na růst v opačném směru. Tímto mechanismem by mohla být změna hladiny testosteronu, který ovlivňuje růst. Příkladem ovlivnění intrauterinního vývoje plodu testosteronem může být různá délka druhého a čtvrtého prstu a mužů a žen (Benderlioglu a Nelson, 2004). Tato práce dokazuje u žen závislost v poměru druhého a čtvrtého prstu na pravé ruce a agresivitu. Ženy, které mají masukulinní (tj. nízký) poměr druhého a čtvrtého prstu vykazují vysoká skóre při testování agresivity. V práci Flegr et al. (2005) byl zaznamenán signifikantně nižší poměr druhého a čtvrtého prstu u toxo-positivních osob a rovněž dosavadní (nepublikované) výsledky ukazují, že toxo-positivní muži mají vyšší hladinu testosteronu (ve slinách).

U frekvence spánku dítěte přes den byl v naší studii zjištěn signifikantní rozdíl mezi dětmi od toxo-positivních a toxo-negativních matek. Ve věku 1 a 1,5 let spaly děti od toxo-positivních matek méně často přes den (v 1 roce  $p=0,0096$ ,  $F=6,8090$ , v 1,5 roce  $p=0,0032$ ,  $F=8,874$ ). Jednou z příčin, proč by mohlo docházet ke změně frekvence spánku přes den u dětí od toxo-positivních matek může být vliv změn psychiky matky na vnímání jejího dítěte. Matka by mohla být úzkostnější v péči o dítě a tím by mohla narušit či ovlivnit jeho spánkový režim. Dalším důvodem by mohla být zvýšená aktivita dítěte, není však známo, čím by mohla být způsobena. Vzhledem k tomu, že méně častá frekvence spánku dítěte přes den se odlišovala stejným směrem u dětí od toxo-positivních matek ve věku 1 rok a 1,5 roku, nedomníváme se, že by šlo o náhodný výsledek. U všech dat byly odstraněny extrémní hodnoty větší než 2,5 násobek směrodatné odchylky od daného průměru, takže i případné ovlivnění extrémní hodnotou vylučujeme.

## Psychomotorický vývoj dítěte

Divky od toxo-pozitivních matek se signifikantně později otáčejí na břicho ( $p=0,0034$ ,  $F=8,9594$ ) a chlapci od matek s latentní toxoplazmózou signifikantně později zvedají hlavičku ( $p=0,0002$ ,  $F= 14,2087$ ). Dříve než postoupíme k diskuzi výsledků, je třeba zdůraznit, že i další posuny u dětí od toxo-pozitivních matek byly u psychomotorického vývoje většinou stejným směrem, avšak nebyly signifikantní. U dívek i chlapců byly toxo-pozitivní děti většinou pomalejší ve vývoji. Jedním z důvodů by mohl být vertikální „asymptomatický“ přenos toxoplazmózy od matky. Běžně zachycený kongenitální přenos toxoplazmózy se také projevuje zpomaleným psychomotorickým vývojem (Fusková et al., 2003). Naprosto vyloučit "asymptomatický" kongenitální přenos nemůžeme, neboť děti se v případě latentní toxoplazmózy matky netestují na přítomnosti protilátek proti *Toxoplasma gondii*. Tato příčina pomalejšího vývoje dětí od toxo-pozitivních matek se nám ovšem zdá dosti nepravděpodobná, protože možnost přenosu toxoplazmózy od matky, která je v latentní fázi onemocnění, je velice nízká. Další možností by bylo, že děti od toxo-pozitivních matek žijí (stejně jako jejich nakažené matky) v prostředí s větším rizikem nákazy prvokem *Toxoplasma gondii* a pokud se nakazí do tří let věku, může být prodělané onemocnění důvodem zpomalení vývoje a toto zpomalení se může jevit jako vliv latentní toxoplazmózy matky. Toto vysvětlení se nám opět jeví jako nepravděpodobné, protože námi prokázané zpomalení psychomotorického vývoje je ve velmi nízkém věku dítěte (2-3 měsíc, 4-5 měsíc věku dítěte), takže je pravděpodobnost nákazy toxoplazmózou velmi nízká. Další možnost vysvětlení našich dat ukazujících zpomalení psychomotorického vývoje dětí od toxo-pozitivních matek by mohlo být jiné vnímání dítěte matkou s latentní toxoplazmózou. Taky tento důvod se nám opět jeví být nepravděpodobným, zvednutí hlavičky či otočení na břicho je objektivní jev a matka tuto skutečnost většinou nahlašuje i svému pediatrovi. Dalším možným vysvětlením je přenos protilátek z těla matky na dítě a negativní vliv těchto protilátek na psychomotorický vývoj dítěte. Tento důsledek přenosu protilátek z matky na dítě však zatím nebyl nikdy pozorován. Dále je možné, že se *Toxoplasma gondii* nebo imunitní reakce na *Toxoplasma gondii* podílí v organismu matky na vypínání „kontroly kvality“ potomků a v důsledku toho u infikovaných matek stoupá pravděpodobnost úspěšného vývoje mírně poškozených zárodků, ze kterých následně vyrostou mírně retardované děti. I tato teorie nám ovšem připadá velmi nepravděpodobná. Nejpravděpodobnějším vysvětlením se nám v tuto chvíli jeví možnost, že dítě od matky s latentní toxoplazmózou je zpomalené ve vývoji z důvodu přetrvávající

retardace z fetálního období. Protichůdným výsledkem je ale zjištění, že se matky s latentní toxoplazmózou věnují méně domácímu cvičení s dítětem .

### Zdravotní stav dítěte

Pro testování zdravotního stavu dítěte pomocí log-lineární analýzy byl použit jednoduchý model veličina TOXO x pohlaví dítěte x sledovaná proměnná (nemoc nebo zdravotní problém dítěte do tří let). Signifikantní zde byla interakce mezi proměnnou TOXO a domácím cvičením (chi kvadrát 4,665,  $df=1$ ,  $p=0,0308$ ). Matky, které měly latentní toxoplazmózu se domácímu cvičení věnovaly s dítětem téměř o polovinu méně (domácí cvičení: TOXO negativní 26,16 %, TOXO pozitivní 11,76 %). Tato skutečnost by mohla být dalším důvodem zpomaleného psychomotorického vývoje, který je diskutován výše. Děti od matek s latentní toxoplazmózou neměly větší pravděpodobnost onemocnění určitou nemocí, která byla zjišťována v dotazníku. Neprokázali jsme ani větší četnost opakovaných onemocnění ani větší sklon k projevům alergií či kožním onemocněním. Z těchto výsledků je patrné, že imunitní stav dětí od matek s latentní toxoplazmózou není průkazně ovlivněn ve směru reakce na jiný antigen. V souvislosti se zdravotním stavem dítěte vyšla negativní závislost mezi toxopozitivitou matek a domácím cvičením. Důvodem proč matky s latentní toxoplazmózou méně cvičily doma se svými dětmi může být větší zájem o psychický rozvoj dítěte na úkor fyzického. Matka s latentní toxoplazmózou se může více věnovat psychickému stavu dítěte (odpovídalo by to tomu, že děti jsou více citlivé z pohledu matky), případně se tolik nebojí o dítě z hlediska růstu a fyzického vývoje.

### Chování dítěte do tří let

Chování dětí od matek s latentní toxoplazmózou se lišilo v tom, že děti od toxopozitivních matek jsou podle názorů matek signifikantně víc citlivé než děti od toxonegativních matek ( $p= 0,021$ ,  $F=5,389$ ). Otázkou je zda-li změny v chování dítěte do tří let jsou opravdu způsobené jiným chováním dítěte nebo zda se jedná o projev určité psychické změny matky, která potom své dítě vnímá subjektivně jinak. Těžko lze v současnosti spekulovat nad mechanismem změny psychiky dítěte způsobené latentní toxoplazmózou matky. Mohlo by se ale jednat o zachycení zpomaleného vývoje dítěte a projekcí tohoto

zpomaleného vývoje matkou jako citlivost v našem dotazníku. Dítě by mohlo být pokládáno za víc citlivé z důvodu větší potřeby mateřské péče. Pravděpodobnějším vysvětlením se nám jeví vliv psychiky matky s latentní toxoplazmózou na odpovědi v dotazníku týkající se chování dítěte. Matka je víc vnímavá, citlivá k dítěti, může se o dítě víc strachovat a to se následně odráží na jejím hodnocení dítěte.

### Vedlejší výsledky

Během naší práce jsme získali další vedlejší výsledky, které se přímo netýkají vlivu latentní toxoplazmózy matky na průběh těhotenství a dítě.

Potvrdil se nám všeobecně známý fakt, že pravděpodobnost umělého oplození (nutnost asistované reprodukce) roste s věkem matky ( $p=0,0003$ ,  $F=2,5895$ ). Věk matky a umělé oplození pozitivně korelovalo s pravděpodobností mít dvojčata (věk matky a dvojčata  $p=0,0011$ ,  $F=2,3439$ , umělé oplození a dvojčata  $p<0,0001$ ,  $F=37,2441$ ). Při odfiltrování vlivu umělého oplození se závislost „dvojčata“ na „věk matky“ nepotvrdila ( $p=0,1228$ ,  $F=2,393$ ).

Zajímavý je v našich výsledcích vliv pohlaví dítěte na zdravotní problémy matky. Ženy, které čekaly dítě ženského pohlaví měly statisticky signifikantně častější problém se zvracením po ránu v 1. trimestru (chí kvadrát=4,1695,  $p=0,0412$ ) a statisticky méně často bolest a napětí v prsou ve 3. trimestru (chí kvadrát=4,8255,  $p=0,028$ ) a trend k méně častému nutkání k močení ve 2. trimestru (chí kvadrát=3,699,  $p=0,0544$ ). V literatuře je opravdu popisován větší sklon ke zvracení u matek, které čekají dítě ženského pohlaví. Zvracení je závislé na hladině hormonu hCG (chorion-gonádotropní hormon) a tato hladina hormonu je vyšší u matek, které čekají dítě ženského pohlaví (Askling et al., 1999).

Před otěhotněním se ukázal signifikantní vliv kovariáty umělé oplození (nutnost asistované reprodukce) na citlivost ( $p=0,0146$ ,  $F=6,048$ ), starosti ( $p=0,004420$ ,  $F=8,25$ ), depresi ( $p=0,0171$ ,  $F=5,7587$ ), netrpělivost ( $p=0,0016$ ,  $F=10,2097$ ), optimismus ( $p=0,0139$ ,  $F=6,135$ ) a žárlivost ( $p=0,0055$ ,  $F=7,8378$ ). Ženy, které se účastnily programu asistované reprodukce (umělého oplození) měly větší sklon k citlivosti, starostem, depresi, netrpělivosti, žárlivosti a menší sklon k optimismu. Očekávaným výsledkem bylo, že umělé oplodnění (nutnost asistované reprodukce) mělo během těhotenství signifikantní vliv na starosti ( $p=0,0083$ ,  $F=7,049$ ) a veselost ( $p=0,0336$ ,  $F=4,554$ ). Ženy, které byly na umělém oplodnění



měly větší sklon mít starosti a menší sklon k veselosti. Lze to vysvětlit tím, že tyto ženy byly ve stresu, obávaly se o dítě a celý průběh těhotenství, což se zákonitě muselo projevit na jejich psychice.

Kovariáta vlivu věku matky na vysazení hormonální antikoncepce (t.j. časové období od vysazení hormonální antikoncepce do otěhotnění), byla signifikantní ( $p=0,0282$ ,  $F=4,9288$ ). S vyšším věkem se vysazení hormonální antikoncepce prodlužovalo, což bude souviset s menší pravděpodobností otěhotnění se zvyšujícím se věkem.

Dále bylo zjištěno, že hmotnost a výška dětí ve věku 6 týdnů, 3 měsíce, 6 měsíců, 1 rok, 1,5 roku a 3 roky byla vždy signifikantně odlišná u dívek a chlapců. Dívky zde byly vždy lehčí a menší. To je dáno rozdílným vývojem u obou pohlaví. Rychlejší růstu se projevuje u chlapců větší výškou a hmotností (Lampl et al., 2005).

V délce jednoho spánku přes den se ve věku 1,5 let se ukázal rozdíl mezi dívkami a chlapci ( $p=0,0402$ ,  $F=4,254$ ). Délka spánku byla u chlapců signifikantně větší než u dívek. V práci Guerin et al., 2001 udává autor, že spánkový režim u dětí odpovídá pohlaví zkoumaného dítěte.

Byly zjištěny pohlavní rozdíly v psychomotorickém vývoji u proměnné otočení na břicho, plazení, první slova a první zub. Chlapci se signifikantně později otáčejí na břicho ( $p=0,0144$ ), dříve se plazí ( $p=0,0233$ ), později používají první slova ( $p=0,004$ ) a dříve jim vyrostou první zub ( $p=0,0066$ ).

Při testování vzájemných vztahů sledovaných veličin jsme se také zajímali o vliv plného kojení (do 6ti měsíců) bez příkrmování na nemoci dítěte. V loglineární analýze byl testován model nemoc dítěte x plné kojení do 6ti měsíců x věk matky. Signifikantní vliv byl zaznamenán pouze u onemocnění angínou (chi kvadrát 5,677,  $df=1$ ,  $p=0,0172$ ), plně kojené děti do 6ti měsíců onemocněly méně často angínou než nekojené děti. Jinak plné kojení do 6ti měsíců věku dítěte bez příkrmování nemělo vliv na ostatní nemoci, kožní onemocnění a alergie, ačkoliv v literatuře je uváděn vliv kojení na prevenci alergií (Kull et al., 2005).

V chování dítěte byl signifikantní vliv kovariáty pohlaví dítěte na dominantní chování ( $p=0,0283$ ,  $F=4,859$ ) a vliv kovariáty věk matky na vyšší oblibu nových situací ( $p=0,0423$ ,

F=4,160). Pohlaví dítěte ovlivnilo chování tak, že dívky měly zvýšené dominantní chování. Tento výsledek odpovídá studii, která byla provedena na dětech (Rowe et al., 2004), ve které nebyla nalezena korelace mezi sociální dominancí a hladinou testosteronu. Je také možné, že matky mající dítě ženského pohlaví očekávají, že se bude dítě chovat submisivněji. Ve skutečnosti se děti obou pohlaví chovají stejně a matka tedy chování dívek vnímá jako relativně dominantnější.

## 6.2 Vliv latentní toxoplazmózy na potomstvo myši

### Hmotnosti mláďat

Hmotnost mláďat samičího pohlaví od toxo-pozitivních matek byla nižší ve všech případech vážení (tj. 43-102 dnů stáří mláďat). Samci od *toxoplasma*-pozitivních matek byli ve stáří 43-52 dnů, 53-62 dnů, 63-72 dnů, 93-102 dnů signifikantně lehčí než samci od toxoplasma-negativních matek. Ve stáří 83-92 dnů byli samci od toxo-pozitivních matek signifikantně těžší než kontrolní skupina. U mláďat od matek s latentní toxoplazmózou bude působit pravděpodobně nějaký mechanismus, proti kterému současně působí mechanismus ovlivňovaný pohlavními hormony. Pokud budeme uvažovat o pohlavních hormonech, přichází v úvahu především testosteron, který působí na růst. Například v publikaci Hastings a Hill, 1997 je popsán pokles hmotnosti samců po kastraci. Protože samice myši mají testosteronu výrazně méně, dochází k menšímu ovlivnění hmotnosti nebo mechanismus působí opačným směrem. Zpomalení růstu mláďat myši od toxo-pozitivních matek může být způsobeno negativním působením latentní toxoplazmózy matky na intrauterinním vývoj mláďete, které se projeví zpomaleným růstem potomstva v dospělosti. Zpomalení růstu může být též způsobeno působením přetrvávajících nízkých titrů protilátek u mláďat. Protilátky mohou vyčerpávat imunitní systém a tím zhoršovat kondici, což se projevuje na snížení hmotnosti. Vzhledem k tomu, že u samců myši může docházet ke sčítání dvou protichůdných vlivů (hladina testosteronu x. přítomnost toxo-protilátek u matky) není rozdíl v hmotnostech po celou dobu měření vychýlen jedním směrem. V případě, že by samci od toxo-pozitivních matek měli indukovanou vyšší hladinu testosteronu, mohli by tím kompenzovat pomalejší růst způsobený přítomností protilátek u matky. Dále by rozdíl ve vývoji hmotnosti mohl být ovlivněn jiným chováním samců a samic. Je též možné, že u myši nebyla rozpoznána

kongenitální infekce toxoplazmózou, která způsobila pomalejší vývoj. Přikláníme se však k názoru, že se nejednalo o kongenitální infekci, neboť u myši byly stanovovány titry protilátek v různých časových obdobích a hladiny byly nízké a došlo velmi rychle k poklesu na hraniční titer protilátek.

Při porovnání vlivu latentní toxoplasmosy matky na hmotnosti mláďat u myši a u člověka (kapitola 6.1) si můžeme povšimnout opačného směru. Mláďata od toxo-pozitivních matek jsou signifikantně lehčí, zatímco děti od toxo-pozitivních matek mají trend být větší a těžší. Důvodem tohoto výsledku je rozdílná etapa života u myši (hmotnost měřena po odstavu) a u člověka (hmotnost měřena do tří let). Důležitým jevem je také možnost ovlivnění hmotnosti podle termínu porodu. U člověka je dítě od toxo-pozitivní matky přenášeno (kapitola 6.1), u myši nedokážeme termín porodu posoudit, protože období březosti je příliš krátké. Je možné, že u myši dochází k opačnému jevu, březost se zkracuje a hmotnost mláďat může být tedy nižší. Pokud ale srovnáme hmotnost mláďat (samic) myši od toxo-pozitivních matek a výšku dívek od toxo-pozitivních matek můžeme si povšimnout stejného trendu růstu. Potomstvo od toxo-pozitivních matek má během ranného vývoje pomalejší růst (u myši hmotnost, u člověka výška). Potom se růst u člověka vyrovnává v obou skupinách (dcery toxo-pozitivních a toxo-negativních matek) a je možné, že pokud by byla mláďata myši sledována delší časové období, došlo by k vyrovnání v obou skupinách myši (samice od toxo-pozitivních a toxo-negativních matek).

### Behaviorální pokusy

V testu motoriky a koordinace (kladina) jsme nezaznamenali žádné signifikantní rozdíly mezi mláďaty od matek toxo-pozitivních a kontrolních. Pokud by byla experimentální zvířata nakažena kongenitálně, mohli bychom očekávat nějaké změny chování. Protože ale u mláďat od infikovaných matek došlo s největší pravděpodobností pouze k přenosu protilátek, nedošlo ani ke změnám v chování experimentálních zvířat. Doba otočení a přezení kladiny korelovala s hmotností (otočení  $p=0,0066$ ,  $F=7,5383$ , přezení  $p=0,0005$ ,  $F=12,716$ ). Samci byli signifikantně rychlejší než samice v čase otočky ( $p=0,0012$ ,  $F=10,8209$ ) a signifikantně pomalejší v čase přezení kladiny ( $p=0,0061$ ,  $F=7,688$ ). Pomalejší překonání kladiny může být způsobeno právě větší hmotností samců oproti samicím a sníženou motivací k úniku z neznámého prostředí či zvýšenou anxiétou, která může vést k inhibici chování. K rozdílu v chování na kladině mohou též přispívat změny v aktivitě testovaných zvířat (Contet et al., 2001).

V testu light-dark box nebyl rozdíl v chování u mláďat od *toxoplasma*-pozitivních a *toxoplasma*-negativních matek statisticky signifikantní. Samci strávili v porovnání se samicemi kratší časový úsek v tmavé části aparatury ( $p=0,0335$ ,  $F=4,5876$ ). Tento test byl zaměřen na zjišťování změny v anxietě závislé na lokomoční aktivitě. Vzhledem k předchozím výsledkům nebyla tato změna očekávána.

### 6.3 Vliv antitoxoplasmických protilátek na infekci toxoplazmózou

#### Hmotnost mláďat po infekci

Mláďata od toxo-pozitivních a toxo-negativních matek byla infikována cystami *Toxoplasma gondii*. Jak už bylo poznamenáno výše (kapitoly 2.1.1 a 2.1.2), patogenita parazita je ovlivněna virulencí určitého kmene, infekční dávkou, způsobem vstupu parazita do organismu hostitele a také druhem a kmenem meziphostitele (Darcy a Santoro, 1994). Během infekce hmotnost obou skupin myši klesala. U mláďat myši F1 od matek s latentní toxoplazmózou klesala hmotnost mnohem víc a byla signifikantně odlišná od infikovaných mláďat F1 od kontrolních matek ve 2., 5., 7., 9., 12., 16., 21. dnu po infekci. Žádné zvíře neuhynulo, jedno se nenakazilo a bylo proto z experimentu vyřazeno. U všech infikovaných zvířat došlo k poklesům hmotnosti. Větší pokles váhy u mláďat od matek s latentní toxoplazmózou byl pravděpodobně způsoben rychlejší reakcí imunitního systému, který patogena, proti němuž měly myši již předem určitou (relativně nízkou) hladinu protilátek, rozpoznal. Toto rozpoznání a rychlejší reakce imunitního systému bylo pro organismus patrně mnohem více vyčerpávající než přímé patologické působení *Toxoplasma gondii*. Další možností by mohla být snížená schopnost vyrovnat se se stresovými podmínkami (nemoc) nebo možnost méně aktivního přijímání potravy. Nejpravděpodobnější se ale jeví varianta, že imunitní systém myši od matek s latentní toxoplazmózou rychleji a v daleko větší míře zareaguje na infekci *Toxoplasma gondii*, zatímco u kontrolní skupiny dochází teprve k tvorbě protilátek. Pokud by se tato teorie zakládala na pravdě, byly by titry protilátek u myši od toxo-pozitivních matek po infekci vyšší a počet cyst v mozku naopak nižší.

## Titry protilátek

Jak vyplývá z výsledků, měla mláďata myši od toxo-positivních matek po infekci největší zastoupení nejvyššího titru. Tento rozdíl byl s použitím Kandallova neparametrického testu statisticky signifikantní ( $p < 0,001$ ). Výsledek stanovení titru protilátek potvrzuje teorii, že u myši, které měly matku s latentní toxoplazmózou, došlo k rychlejší reakci imunitního systému a k vytvoření většího množství protilátek než u kontrolních myši.

## Počet cyst v mozku

Rozdíl počtu cyst u mláďat od matek s latentní toxoplazmózou a od kontrolních matek se nepodařilo prokázat ( $p = 0,608$ ,  $F = 0,268$ ). Průměrný počet cyst byl 59 u myši od matky toxo-positivní a 66 od kontrolní matky. Z uvedených výsledků (a ze zkušeností získaných během pokusu) vyplývá, že metoda počítání cyst není pravděpodobně dostatečně citlivá ke stanovení rozdílu mezi dvěma skupinami myši. Nízký počet cyst v mozku představuje velmi slabou nákazu toxoplazmózou, která lépe odpovídá latentní fázi toxoplazmózy u myši, ale zároveň znemožňuje přesnější porovnání dvou skupin myši (výsledky jsou zatíženy velkou statistickou chybou). K důkazu ochrany velice nízkým titrem protilátek přenesených od matky před větší parazitací (doloženou počty cyst v mozku) by bylo nutné použít citlivější metodu anebo infikovat myši virulentnějším kmenem *Toxoplasma gondii*. Vhodnou metodou k přesnému stanovení množství DNA parazita by mohla být metoda Real-Time PCR (viz. kapitola 5.2.5), její použití pro kvantifikaci zastoupení parazita v mozkové tkáni se však ukázalo jako problematické.

## 7. Závěrečné shrnutí

Bylo prokázáno působení latentní toxoplazmózy matky na potomstvo u lidí i u myší.

### Člověk

V průběhu těhotenství se ukázal vliv latentní toxoplazmózy na matku:

- Matky s latentní toxoplazmózou by mohly mít menší výskyt těhotenské cukrovky ve druhém trimestru.
- Během těhotenství je nálada matky s latentní toxoplazmózou více posunutá směrem k depresi.
- Termín porodu byl u toxo-pozitivních matek posunut ve směru dítě přenášeno.

U dětí od matek s latentní toxoplazmózou byly zjištěny následující odchylky v porovnání s dětmi od kontrolních matek:

- Při sledování růstu dívek (výška) docházelo k rozdílnému působení vlivu latentní toxoplazmózy matky na tento růst. Výška dívek od toxo-pozitivních matek vykazovala vyšší nárůst do jednoho roku věku a posléze došlo k vyrovnání těchto rozdílů.
- Ve věku 1 a 1,5 let spaly děti od toxo-pozitivních matek méně často přes den.
- Dívky od toxo-pozitivních matek se později otáčejí na břicho.
- Chlapci od matek s latentní toxoplazmózou později zvedají hlavičku.
- Matky, které měly latentní toxoplazmózu, se domácím cvičení s dítětem věnovaly méně.
- Chování dětí od matek s latentní toxoplazmózou se lišilo v tom, že děti od toxo-pozitivních matek byly zpětně hodnocené jako víc citlivé než děti od toxo-negativních matek.

Vzhledem k tomu, že se jedná o explorační studii a nebyla provedena Bonferroniho korekce, bude třeba ověřit všechny tyto výsledky na nezávislém souboru.

## Laboratorní myši

- Mláďata samičího pohlaví od matek s latentní toxoplazmózou byla lehčí ve stáří 43-103 dnů.
- Mláďata samčího pohlaví od matek s latentní toxoplazmózou byla lehčí ve stáří 43-72 dnů a 93-102 dnů a těžší ve stáří 83-92 dnů.

Potomci myši s latentní toxoplazmózou infikovaní prvokem *Toxoplasma gondii*:

- Měli nižší hmotnost v průběhu akutního stádia infekce než kontrolní skupina myši.
- Dosahovali vyšších titrů protilátek než kontrolní skupina.

## 8. Seznam literatury

- Alexander J., Hunter C. A., (1998), Immunoregulation during toxoplasmosis, *Chemical Immunology* 70, 81-102
- Allain J.P., Palmer C.R., Pearson G., (1998), Epidemiological Study of Latent and Recent Infection by *Toxoplasma gondii* in pregnant Women from a Regional population in the U.K., *Journal of Infection* 36, 189-196
- Andrianarivo A. G., Anderson M. L., Rowe J. D., Gardner I. A., Reynolds J. P., Choromanski L., Conrad P. A., (2005), Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization, *Parasitology Research* 96, 24-31
- Arasu P., (2001), In vitro reactivation of *Ancylostoma caninum* tissue-arrested third-stage larvae by transforming growth factor- $\beta$ , *Journal of Parasitology* 87, 733-738
- Arasu P., (1999), Pregnancy and transmammary transfer of hookworm infection to puppies, In: *Canine Infectious Disease: From Clinics to Molecular Pathogenesis*, L. Carmichael (Ed.)
- Araujo F. G., Williams D. M., Grumet F. C., Remington J. S., (1976) Strain-Dependent Differences in Murine Susceptibility to *Toxoplasma*, *Infection and Immunity* 13, 1528-1530
- Askling J., Erlandsson G., Kaijser M., Akre O., Ekblom A., (1999), Sickness in pregnancy and sex of the child, *The Lancet* 354, 2053
- Beattie C. P., (1982), The ecology of toxoplasmosis, *Ecology of Disease* 1, 13-20



- Benderlioglu Z., Nelson R. J., (2004), Digit length ratios predict reactive aggression in women, but not in men, *Hormones and Behaviour* 46, 558-564
- Biedermann K., Flepp M., Fierz W., Joller-Jemelka H., Kleihues P., (1995), Pregnancy, immunosuppression and reactivation of latent toxoplasmosis, *Journal of Perinatal Medicine* 23, 191-203
- Bourin M., Hascoet M., (2003), The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology* 463, 55-65
- Brůnová B., Filouš A., (2002), Oftalmologie, In: Hrodek O., Vavřínek J. et al., *Pediatric*, 1. vydání, Galén, 495-502
- Buchanec J., (1990), Růst a vývoj, In: Houštěk a kol., *Dětské lékařství*, 3. vydání, Avicenum, 18-25, 32-40
- Čapková Š., (2002), Dermatologie In: Hrodek O., Vavřínek J. et al., *Pediatric*, 1. vydání, Galén, 473-489
- Čermáková Z., Rysková O. Plišková L., (2005), Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii* in human biological samples, *Folia microbiologica* 50, 341-344
- Contet C., Rawlins N., Deacon R. M. J., (2001), A comparison of 129S2/SvHsd and C57BL/6JolaHsd mice on a test battery assessing sensorimotor, affective, and cognitive behaviours: implications for the study of genetically modified mice, *Behavioural Brain research* 124, 33-46
- Contini C., Seraceni S., Cultrera R., Incorvaia C., Sebastiani A., Picot S. (2005), Evaluation of a Real-time PCR-based assay using the lightcycler system for detection of *Toxoplasma gondii* bradyzoite genes in blood specimens from patients with toxoplasmic retinochoroiditis, *International Journal for Parasitology* 35, 275-283
- Couvreur J., Desmons G., (1988), *Toxoplasmosis, Parasitic Infections in Pregnancy and the Newborn*, Edited by MacLeod C., Oxford University Press, 112-142

- Crawley J. N., Goodwin F. K., (1980), Preliminary report of simple animal behaviour for the anxiolytic effects of benzodiazepines, *Pharmacology Biochemistry and Behaviour* 13, 167-170
- Darcy F., Santoro F., (1994), Toxoplasmosis, In: Kierszbaum F. (Ed.): *Parasitic Infections and the Immune System*, Academic Press, San Diego, 163-201
- Dardé M. L., Bouteille B., Pestre-Alexandre M., (1990), Comparison of isoenzyme profiles of *Toxoplasma gondii* tachyzoites producer under different culture conditions, *Parasitology Research* 76, 367-371
- Deacon R. M. J., Croucher A., rawlins J. N., (2002), Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice, *Behavioural Brain Research* 132, 203-213
- Djurkovic-Djakovic O., Milenkovic V., (2001), Murine Model of Drug-induced Reactivation of *Toxoplasma gondii*, *Acta Protozoologica* 40, 99-106
- Dubey J., P., (2004), Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis, *Veterinary Parasitology* 126, 57-72
- Dunn D., Wallon M., Peyron F., Petersen E., Peckham C., Gilbert R., (1999), Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling, *Lancet* 353, 1829-1833
- Dupon M., Cazenave J., Pellegrin J. L., Ragnaud J. M., Cheyrou A., Fischer I., Leng B., Lacut J. Y., (1995), Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus- seropositive patients, *Journal of Clinical Microbiology* 33, 2421-2426
- Elenkov I. J., Wilder R. L., Bakalov V. K., Link A. A., Dimitrov M. A., Fisher S., Crane M., Kanik K. S., Chrousos G. P., (2006), IL-12, THF- $\alpha$ , and Hormonal Changes during Late Pregnancy and Early Postpartum: Implications for Autoimmune Disease Activity during These Times, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86, 4933-4938

- Fejstavr J., Vyhnánková L., (2002), Otorinolaryngologie In: Hrodek O., Vavřínek J. et al.,  
Pediatrie, 1. vydání, Galén, 245-247
- Flegr J., Hrdá Š., Kodým P., (2005), Influence of latent 'asymptomatic' toxoplasmosis on  
body weight of pregnant women, Folia Parasitologica 52, 199-204
- Flegr J., Preiss M., Klose J., Havlíček J., Vitáková M., Kodým P., (2003), Decreased level of  
psychobiological factor novelty seeking and lower intelligence in man latently infected  
with the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* Dopamine, a missing link between  
schizophrenia and toxoplasmosis?, Biological Psychology 63, 253-268
- Flegr J., Kodým P., Tolarová V., (2000), Correlation of duration of latent *Toxoplasma gondii*  
infection with personality changes in women, Biological Psychology 53, 57-68
- Frenkel J. K., (1948), Germal hypersensitivity to *Toxoplasma* antigens (toxoplasmins),  
Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine 68, 634-639
- Frenkel J. K. (1988), Pathophysiology of toxoplasmosis, Parasitology Today 4, 273-278
- Frenkel J. K., (1967), Adaptive immunity to intracellular infection, Journal of Immunology 98,  
1309-1319
- Fusková E., Bartošová D., Trnková M., (2003), Toxoplazmóza v dětském věku, Pediatrie pro  
praxi 6, 312-313
- Fuchs V., (1985), Nemoci v těhotenství, 1. vydání, Avicenum, 211-214
- Gagne S. S., (2001), Toxoplasmosis, Primary Care Update Ob/Gyns 8, 122-126
- Garweg J. G., Scherrer J., Wallon M., Kodjikian L., Peyron F., (2005), Reactivation of ocular  
toxoplasmosis during pregnancy, International Journal of Obstetrics and Gynecology  
112, 241-242

- Giorgino F. L., Mega M., (1981), Toxoplasmosis and habitual abortion. Our experience, *Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology* 8, 132-134
- Guerin N., Reinberg A., Testu F., Boulanguiez S., Mechkouri M., Touitou Y., (2001), Role of school schedule, age, and parental socioeconomic status on sleep duration and sleepiness of Parisian children, *Chronobiology international* 18, 1005-1017
- Hastings I. M., Hill W. G., (1997), The effect of testosterone in mice divergently selected on fat content or body weight, *Genetical research* 70, 135-141.
- Havlíček J., Gašová Z., Smith A.P., Zvára K., Flegr J., (2001), Decrease of psychomotor performance in subjects with latent „asymptomatic“ toxoplasmosis, *Parasitology* 122, 515-520
- Havlík J., (2002), Infektologie In: Hrodek O., Vavřínek J. et al., *Pediatric*, 1. vydání, Galén, 607-627
- Hejčmanová L., Průhová, Š., (2003), Růst a vývoj dítěte, Neuropsychický vývoj, In: Lebl J., Provazník K., Hejčmanová L., *Preklinická pediatrie*, 1. vydání, Karolinum, 35-40
- Hostomská L., Jírovec O., Horáčková M., Hrubcová M., (1957), Účast toxoplasmické infekce matky při vzniku mongoloidismu dítěte, *Československá pediatrie* 12, 713-723
- Howe D. K., Summers B. C., Sibley L. D., (1996), Acute Virulence in Mice with Markers on Chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*, *Infection and Immunity* 64, 5193-5198
- Hořejší V., Bartůňková J., (2002), *Základy imunologie*, 2. vydání, Triton, 68, 69, 181, 122-124, 189
- Hunter C. A., Chizzonite R., Remington J. S., (1995), IL-1beta is required for IL-12 to induce production of INF-gamma by NK cells: a role for IL-1beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens, *Journal of Immunology* 155, 4347-4354

- Chardes T., Bourguin I., Mevelec M., Dubremetz J., Bout D., (1990), Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in Sera, Intestinal Secretions, and Milk from orally Infected Mice and Characterization of Target Antigens, *Infection and Immunity* 58, 1240-1246
- Janků J., (1923), Pathogenesa a patologická anatomie tak zvaného vrozeného kolombu žluté skvrny v oku normálně velikém a mikrophthalmickém s nálezem parazitů na sítnici, *Časopis lékařů českých* 62, 1021-1027
- Jauregui L. H., Higgins J., Zarlenga D., Dubey J. P., Lunney J. K., (2001), Development of Real-Time PCR Assay for detection of *Toxoplasma gondii* in Pig and Mouse Tissues, *Journal of Clinical Microbiology* 39, 2065-2071
- Jenum P. A., Holberg-Petersen M., Melby K.K., Stray-Pedersen B., (1998), Diagnosis of congenital *Toxoplasma gondii* infection by polymerase chain reaction (PCR) on amniotic fluid samples. The Norwegian experience., *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 106, 680-686
- Jíra J., Rosický B., (1983), *Imunodiagnostika a epidemiologie toxoplasmosy*, Academia, Praha, 17-28, 80-88
- Jones J., Lopez A., Wilson M., (2003), Congenital Toxoplasmosis, *American Family Physician* 67, 2131-2138
- Jones-Brando L., Torrey E.F., Yolken R., (2003), Drugs used in the treatment of schizophrenia and bipolar disorder inhibit the replication of *Toxoplasma gondii*, *Schizophrenia research* 62, 237-244
- Jezyna C., Zajac W., (1983), Chronic toxoplasmosis in pregnant women - an epidemiological and social problem, *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale B, Hygiene* 177, 96-102
- Kaňková Š., (2005), Vliv latentní toxoplazmózy na průběh těhotenství, *Diplomová práce*, 49-52

- Kasper L. H., Buzoni-Gatel D., (1998), Some opportunistic parasitic infection in AIDS: Candidiasis, Pneumocystosis, Cryptosporidiosis, Toxoplasmosis, *Parasitology Today* 4, 150-156
- Kierszenbaum F., (1994), *Parasitic Infection and the Immune System*, Academic Press, Inc., 170-190
- Kimball A. C., Kean B. H., Fuchs F., (1971), The Role of Toxoplasmosis in Abortion, *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 111, 219-226
- Kodym P., (1996), Imunitní odpověď na kmeny *Toxoplasma gondii* o různé virulenci, *Disertační práce*, 152
- Kodym P., Blazek K., Maly M., Hrda S. (2002), Pathogenesis of experimental toxoplasmosis in mice with strains differing in virulence, *Acta Parasitologica* 47, 239-248
- Kodym P., Malý M., Švandová E., Lezatková H., Bažoutová M., Vlčková J., Beneš C., Zástěra M., (2001), *Toxoplasma* in the Czech republic 1923-1999: first case to widespread outbreak, *International Journal for Parasitology* 31, 125-132
- Kodym P., Tolarová V., (1998), Laboratorní diagnostika toxoplazmózy, *Remedia - Klinická mikrobiologie* 2, 224-226
- Koppe J. G., Rothova A., (1989), Congenital toxoplasmosis. A long-term follow-up of 20 years, *International Ophthalmology* 13, 387-390
- Kull I., Böhme M., Wahlgren C. F., Nordvall L., Pershagen G., Wickman M. D, (2005), Breast-feeding reduces the risk for childhood eczema, *The Journal of allergy and clinical immunology* 116, 657-661
- Lampl M., Thompson A. L., Frongillo E. A., (2005), Sex differences in the relationship among weight gain, subcutaneous skinfold tissue and saltatory length growth spurts in infancy, *Pediatric research* 58, 1238-1242

- Lebl J. (2003), Růst a vývoj dítěte, Rozdělení dětského věku, In: Lebl J., Provazník K., Hejmanová L., Preklinická pediatrie, 1. vydání, Karolinum, 3-5
- Lebl J., Krásničanová K., (2003), Růst a vývoj dítěte, Vývoj lidského jedince od narození do dospělosti, In: Lebl J., Provazník K., Hejmanová L., Preklinická pediatrie, 1. vydání, Karolinum, 7-15
- Lecomte V., Chumpitazi B. F. F., Paquier B., Ambroise-Thomas P., Santoro F., (1992), Brain-tissue cyst in rats infected with the RH strain of *Toxoplasma gondii*, Parasitology research 78, 267-269
- Letscher-Bru V., Pfaff A. W., Abou-Bacar A., Filisetti D., Antoni E., Villard O., Klein J., Candolfi E., (2003), Vaccination with oxoplasma gondii SAG-1 Protein Is Protective against Congenital Toxoplasmosis in BALB/c Mice but Not in CBA/J Mice, Infection and Immunity 77, 6615-6619
- Lin M. H., Chen T. Ch., Kuo T., Tseng Ch. Ch., Tseng Ch. P., (2000), Real-Time PCR for Quantitative Detection of *Toxoplasma gondii*, Journal of Clinical Microbiology 38, 4121-4125
- Lipp H. P., Wolfer D. P., (2003), Genetic background problems in the analysis of cognitive and neuronal changes in genetically modified mice, Clinical Neuroscience Research 3, 223-231
- Luft B. J., Kansas G., Engleman E. G., Remington J. S., (1984), Functional and quantitative alternations in T lymphocyte subpopulations in acute toxoplasmosis, Journal of Infection Diseases 150, 761-767
- Mack D. G., McLeod R., (1992), Human *Toxoplasma gondii*-specific Secretory Immunoglobulin A Reduces T. gondii Infection of Enterocytes In Vitro, The Journal of clinical investigation. 90, 2585-2592

- Marcolino P. T., Silva D. A., Leser P. G., Camargo M. E., Mineo J. R., (2000), Molecular Markers in Acute and Chronic Phases of Human Toxoplasmosis: determination of Immunoglobulin G Avidity by Western Blotting, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7, 384-389
- Meinecke Ch. K., Schottelius J., Oskam L., Fleischer B., (1999), Congenital Transmission of Visceral Leishmaniasis (Kala Azar) From An Asymptomatic Mother to Her Child, *Pediatrics* 104, 65-70
- Miller H. C., Seaman E., Remington J. S., (1967), The clinical spectrum of congenital toxoplasmosis. Problems in recognition, *Journal of Pediatric* 70, 714
- Montoya J. G., Liesenfeld O., (2004), Toxoplasmosis, *The Lancet* 363, 1965-1976
- Moore K. L., Persaud T. V. N., (2002), Zrození člověka – embryologie s klinickým zaměřením, 1. vydání, ISV, 27-32, 34-41, 107-105, 118-120
- Moore K. L., Persaud T. V. N., Shiota K., (1994), *Colour Atlas of Clinical Embryology*, Ed. Philadelphia, WB Saunders
- Moretti E., Basso B., Castro I., Paez M. C., Chaul M., Barbieri G., Feijoo D. C., Sartori M. J., Paez R. C., (2005), Chagas' disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection, *Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38, 53-55
- Mukhtar M. Y., Lesi F. E. A., Iroha E. U., Egri-Okwaji M. T. C., Mafe A. G., (2005), Congenital Malaria Among Inborn Babies at a Tertiary Centre in Lagos, Nigeria, *Journal of Tropical Pediatrics* 52, 19-23
- Nielsen H. V., Cristina M. D., Beghetto E., Spadoni A., Petersen E., Gargano N., (2006), *Toxoplasma gondii*: DNA vaccination with bradyzoite antigens induces protective immunity in mice against oral infection with parasite cyst, *Experimental Parasitology* 112, 274-279



- Oluseyi Oyedele O., Odemuyiwa S. O., Ammerlaan W., Muller C. P., Adu F. D., (2005), Passive Immunity to Measles in the Breastmilk and Cord Blood of Some Nigerian Subjects, *Journal of Tropical Pediatrics* 51, 45-48
- Ordinaire I., Simon A., Frealle E., Soula F., Valat A. S., Rouland V., Subtil D., Dei-Cas E., Camus D., Delhaes L., (2005), Real-time quantitative PCR for toxoplasmosis diagnosis, *Annales de biologie clinique* 63, 67-73
- Pfeffercorn E. R., (1984), Interferon  $\gamma$  blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan, *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* 81, 908-912
- Pinon J. M., Toubas D., Marx C., Mougeot G., Binnin A., Bohnhomme A., Villaume M., Foudrinier F., Lapan H., (1990), Detection of specific Immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis, *Journal of Clinical Microbiology* 28, 1739-1743
- Quablan H. S., Jumaian N., Abu-Salem A., Hamadelil F. Y., Mashagbeh M., Abdel-Ghani F., (2002), Toxoplasmosis and habitual Abortion, *Journal of Obstetrics and Gynecology* 22, 296-298
- Ramachi M., Weaver J. B., Joynson D. H. M., Murray P. I., (2002), Acquired ocular toxoplasmosis in pregnancy, *The British journal of ophthalmology* 86, 938-939
- Romand S., Chosson M., Franck J., Wallon M., Kieffer F., Kaiser K., Dumon H., Peyron F., Thulliez P., Picot S., (2004), Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*, *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 190, 797-802
- Rowe R., Maughan B., Worthman C. M., Costello E. J., Angolg A., (2004), Testosterone, Antisocial Behaviour, and Social Dominance in Boys: Pubertal Development and Biosocial Interaction, *Biological Psychiatry* 55, 546-552
- Rozotčil A., (2001), Šestinedělí, In: Rozotčil a kol., *Porodnictví*, 1. vydání, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 148-153, 166-167, 201-202

- Sabin A. B., Eichenwald H., Feldman H. A., Jacobs I., (1952), Present status of clinical manifestations of toxoplasmosis in man, indication and provisions for routine serologic diagnosis, *Journal of The American Medical Association* 150, 1063-1969
- Saxon S.A., Knight W., Reynolds D.W., Stagno S., Alford Ch.A., (1973), Intellectual deficits in children born with subclinical congenital toxoplasmosis: a preliminary report, *Journal of Pediatrics* 82, 792-797
- Sher A., Sousa C. R., (1998), Ignition of the type I response to intracellular infection by dendritic cell-derived interleukin-12, *Europe Cytokine Network* 9, 65-68
- Shiota K., (1991), Development and intrauterine fate of normal and abnormal human conceptuses, *Congenital Anomalies* 31, 67
- Schneider H., (1997), Těhotenské změny mateřského organismu, In: Breckwoldt M., Fabelová G., Martius G., Martius J., Pfeleiderer A., Schneider H., *Gynekologie a porodnictví, 1. české vydání, Vydavatelstvo Osveta*, 61-77
- Sibley L. D., Mordue D. G., Su Ch., Robben P. M., Howe D. K., (2002), Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*, *Philosophical transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological sciences*, 357, 81-88
- Silviera C., Muccioli C., Nussenblatt R., Belfort R., (2003), Toxoplasmosis Transmitted to a Newborn From the Mother Infected 20 Years Earlier, *American Journal of Ophthalmology* 136, 370-371
- Skallová A., Novotná M., Kolbeková P., Gašová Z., Veselý V., Sechovská M., Flegr J., (2005), Decreased level of novelty seeking in blood donors infected with *Toxoplasma*, *Neuro endocrinology letters* 26, 480-486
- Stepick-Biek P., Thulliez P., Aaujo F. G., Remington J. S., (1990), IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and aquired toxoplasmosis, *The Journal of Infection Diseases* 162, 270-273

- Streeter G. L., (1942), Developmental horizons in human embryos. Description of age group XI., 13 to 20 somites, and age group XII., 21 to 29 somites, Contributions to Embryology 30, 211
- Suzuki Y., Orellana M. A., Wong S., Conley F. K., Remington J. S., (1993), Susceptibility to Chronic Infection with *Toxoplasma gondii* Does not Correlate with Susceptibility to Acute Infection in Mice, Infection and Immunity 61, 2284-2288
- Suzuki Y., Remington J. S., (1988), Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2+ and Lyt-1+, L3T4+ T cells in mice, Journal of Immunology 140, 3943-3946
- Špičák V., (2002), Alergologie In: Hrodek O., Vavřinec J. et al., Pediatrie, 1. vydání, Galén, 159-192
- Tenter A. M., Heckerhoth A. R., Weiss L. M., (2000), *Toxoplasma gondii*: from animals to humans, International Journal for parasitology 30, 1217-1258
- Torrey E. F., Yolken R. H., (2003), *Toxoplasma gondii* and schizophrenia, Emerging infectious disease 9, 1375-1380
- Torrice F., Alonso-Vega C., Suarez E., Rodriguez P., Torrico M., Dramaix M., Truyens C., Carlier Y., (2005), Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia, The American journal of tropical medicine and hygiene 70, 201-209
- Van Os Galdos P, Lewis G, Bourgeois M, Mann A. (1993), Schizophrenia sans frontieres: concepts of schizophrenia among French and British psychiatrists, BMJ 307, 489-492
- Vercammen M., Scorza T., Huygen K., De Braekeleer J., Diet R., Jacobs D., Saman E., verschueren H., (2000), DNA vaccination with Genes Encoding *Toxoplasma gondii* Antigens GRA1, GRA7, and ROP2 Induces Partially Protective Immunity against Lethal Challenge in Mice, Infection and Immunity 68, 38-45

- Wang X., Kang H., Kikuchi T., Suzuki Y., (2004), Gamma interferon production, but not perforin-mediated cytolytic activity, of T cells is required for prevention of toxoplasmosis encephalitis in BALB/c mice resistant to the disease, *Infection and Immunity* 72, 4432-4438
- Williams D. M., Grumet F. C., Remington J. S., (1978), Genetic control of murine resistance to *Toxoplasma gondii*, *Infection and Immunity* 19, 416-420
- Wilson M., McAuley J.M., (1999), *Toxoplasma*, In: Murray P.R., *Manual of clinical microbiology*, Washington: American Society for Microbiology, 1374-1382
- Wolf A., Cowen D., Paige B. H., (1939), Toxoplasmic encephalomyelitis III, A new case of granulomatous encephalomyelitis due to a protozoon, *American Journal of Pathology* 15, 657
- Wulf M. W. H., Crevel van R., Portier R., ter Maulen C. G., Melchers W. J. G., van der Ven A., Galama J. M. D., (2005), Toxoplasmosis after Renal Transplantation: Implications of a missed Diagnosis, *Journal of Clinical Microbiology* 43, 3544-3547
- Zapletal A., (2002), Pneumologie In: Hrodek O., Vavřinec J. et al., *Pediatric*, 1. vydání, Galén, 205-211