

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Ústav klinické mikrobiologie**

**Molekulárně biologické vyšetřovací metody
praktická aplikace v diagnostice
parazitárních infekcí**

MVDr. Zuzana Čermáková

DIZERTAČNÍ PRÁCE

2005

♠

OBSAH

Seznam zkratk	3
Úvod	4-6
Přehled současného stavu problematiky	7-32
Cíle práce	33
Materiál a metody	34-74
<i>Toxoplasma gondii</i>	34-48
Odběr a uchování biologického materiálu	
Polymerázová řetězová reakce	
Sérologické metody v diagnostice toxoplazmózy	
<i>Entamoeba histolytica</i>	48-54
Vzorky biologického materiálu	
Polymerázová řetězová reakce	
<i>Leptospira</i> species	55-74
Odběr biologického materiálu	
Polymerázová řetězová reakce	
Sérologické metody v diagnostice leptospiroz	
Výsledky. Diskuse	75-100
1. Laboratorní diagnostika toxoplazmózy – sérologie	75-86
Detekce DNA <i>Toxoplasma gondii</i> metodou PCR	
2. Laboratorní diagnostika <i>Entamoeba histolytica</i>	87-91
Detekce DNA <i>E. histolytica</i> metodou PCR - kazuistiky	
3. Laboratorní diagnostika leptospiroz – sérologie	92-100
Detekce DNA patogenních leptospir metodou PCR	
Závěry pro praxi	101-102
Publikace dizertační práce	103-104
Seznam použité literatury	105-116
Poděkování	117

♠

SEZNAM ZKRATEK

A = adenin

C = cytozin

DNA = deoxyribonukleová kyselina

d NTPs = deoxyribonukleosidtrifosfát

ELISA = enzyme linked immunoassay

G = guanin

KRF = komplementfixační reakce

MAL = mikroaglutinace – lýza

MM = Master Mix (reakční směs pro PCR)

NRL = Národní referenční laboratoř

PCR = Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)

RNA = ribonukleová kyselina

RT PCR = reverse PCR (zpětná PCR) - reverzní transkripce
s následnou PCR

Real time PCR = kombinace PCR amplifikace s detekcí DNA specifickou sondou v reálném čase (ve všech cyklech reakce)

Sp. = species

SZÚ Praha = Státní zdravotní ústav v Praze

T = thymin

WHO = World Health Organization – Světová zdravotnická organizace

ÚVOD

Laboratorní úsek parazitologie ve velkých nemocničních zařízeních v naší republice zajišťuje jednak diagnostiku „tradičních parazitárních onemocnění“, ale i infekcí způsobených původci, kteří podle systematického zařazení používaného v lékařské mikrobiologii do parazitologie nepatří. Při rozhodování, kterým původcům onemocnění člověka budu při zavádění molekulárně biologických metod pro úsek parazitologie věnovat prvořadou pozornost, jsem se proto nakonec přiklonila k názoru, že rozhodující budou požadavky klinických pracovišť.

V průběhu 5 let jsme společně s laboratoří molekulárních biologických metod pro extrahování genomu Ústavu klinické mikrobiologie a Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové připravili, experimentálně ověřili a zavedli do rutinního provozu **metodu polymerázové řetězové reakce (PCR) pro detekci DNA *T. gondii*, pro detekci patogenních sérovarů *Leptospira species*, spirochéty *Borrelia burgdorferi* a patogenní a nepatogenní formy *Entamoeba histolytica***. Specificitu i senzitivitu metod polymerázové řetězové reakce pro průkaz deoxyribonukleové kyseliny testovaných patogenů jsme potvrdili experimentálně i pomocí statistické analýzy.

Vyšetření DNA *Toxoplasma gondii* polymerázovou řetězovou reakcí zajišťuje naše laboratoř od roku 2000 (jako jediná v České republice) v úzké spolupráci s Národní referenční laboratoří pro toxoplazmózu (vedoucí RNDr. Petr Kodým, CSc.) Státního zdravotního ústavu (SZÚ) v Praze pro celé území našeho státu.

V lékařské parazitologii je rovněž důležitá diagnostika patogenní améby *Entamoeba histolytica* (původce amébozy), která je celosvětově rozšířená, s nejvyšší prevalencí v tropických a subtropických oblastech (WHO uvádí promořenost lidské populace asi 10%). Vzhledem k občasné infekci návštěvníků vracějících se z tropů a subtropů a požadavkům na diagnostiku této nákazy, zavedli jsme laboratorní metodu přímé detekce DNA pro rozlišení patogenní a nepatogenní formy *E. histolytica*.

Přestože jsou leptospiry a borrelie bakterie zařazené do řádu *Spirochaetales*, jsou infekce jimi vyvolané diagnostikovány většinou v parazitologických laboratořích a to jak v České republice, tak i v zahraničí. Historickým důvodem pro zařazení diagnostiky těchto bakteriálních infekcí do úseku lékařské parazitologie byla především skutečnost, že se jedná o zoonózy a také obtížnost jejich rutinní laboratorní kultivace.

Metoda polymerázové řetězové reakce pro diagnostiku patogenních leptospir byla vypracována na podnět pana RNDr. Kamila Zitka, vedoucího Národní referenční laboratoře pro leptospiry při Státním zdravotním ústavu v Praze. Naše laboratoře jsou dosud jediným certifikovaným pracovištěm v ČR, které provádí přímou diagnostiku leptospir metodou PCR z klinických materiálů.

Na základě požadavku Kliniky infekčních nemocí Fakultní nemocnice v Hradci Králové jsme vypracovali také vlastní modifikaci polymerázové řetězové reakce na průkaz borrelií v klinickém materiálu. Současně jsme provedli porovnávací studii sérologické diagnostiky pomocí EIA metod a imunoblotu se soupravami pěti výrobců (Abbott, Euroimmun, Test-Line, Viroimmun, Bag-Med). Výsledky sérologické studie byly publikovány v Medical Science Monitor v roce 2005.

Ze sérologické studie vyplývá, že pro diagnostiku lymeské boreliózy nestačí ve všech případech pouze průkaz protilátek a je nutno provést přímou detekci DNA borelií. Proto jsme vypracovali metodu polymerázové řetězové reakce ze dvou oblastí genomu *Borrelia burgdorferi* a uvedli ji do rutinní diagnostické praxe. V průběhu posledních pěti let bylo vyšetřeno již více než 5 600 vzorků od nemocných se suspektní boreliózou několika metodami (PCR, sérologické testy, elektronová mikroskopie) což představuje rozsáhlý soubor výsledků. V zájmu objektivního zhodnocení je třeba provést důkladné zpracování souboru a podrobnou statistickou analýzu získaných výsledků, které připravujeme, vzhledem k velkému rozsahu přesahujícímu objem dizertační práce, do samostatné publikace.

Obsahem předkládané dizertační práce je popis experimentů, které vedly k vytvoření nových metodických postupů, prezentace výsledků testovaných souborů osob, včetně diskuse a závěrů, získaných po

zhodnocení výsledků i klinických nálezů v **diagnostice toxoplazmózy, infekcí vyvolaných leptospirami a patogenními amébami *E. histolytica***.

Výsledky získané při vyšetření metodou PCR jsem rozdělila v souborech vyšetřovaných osob podle typu testovaného biologického materiálu. Jednotlivé výsledky metod PCR u pacientů jsou porovnávány s titry sérových protilátek zjištěných metodami ELISA, KFR a mikroaglutinace-lýza. Soubory výsledků byly **statisticky testovány** s cílem vyhodnotit přínos nové metody detekce DNA v diagnostice infekcí způsobených závažnými patogeny z rodu *Toxoplasma*, *Entamoeba*, *Leptospira* a dalších.

Diskuse obsahuje objasnění významu a hodnocení výsledků použití molekulárních biologických metod v rychlé **diferenciální diagnostice toxoplazmózy, amébozy a infekcí vyvolaných leptospirami** se zaměřením na rizikové skupiny pacientů (toxoplazmóza v graviditě, imunosuprese, Weilova nemoc a epidemiologické riziko leptospirosy). Díky nové možnosti přímého specifického průkazu DNA patogenů ze vzorků biologického materiálu lze podstatně zrychlit a zpřesnit mikrobiologickou diagnostiku v závažných klinických případech včetně zahájení adekvátní léčby.

Polymerázová řetězová reakce umožňuje spolehlivě a rychle rozlišit patogenní a nepatogenní formu prvoka *E. histolytica*. Pozitivní průkaz patogenní formy améby umožní včas zahájit účinnou terapii.

Cílená a intenzivní léčba nákazy člověka bakterií *Leptospira icterohaemorrhagiae*, probíhající často pod obrazem tzv. Weilovy nemoci s hemoragickými projevy, respiratory distress syndromem a hepatorenálním selháním, vede k omezení fatálního průběhu onemocnění.

Při volbě tématu dizertační práce jsem měla na zřeteli všechny tyto faktory a společně se spolupracovníky jsme vybrali a rozpracovali nejvhodnější laboratorní postupy zajišťující poměrně rychlou a spolehlivou diagnostiku v parazitologické laboratoři.

PŘEHLED PROBLEMATIKY

Molekulární biologické metody v mikrobiologické diagnostice

Přímý průkaz infekčních agens pomocí molekulárních biologických metod je založen na výběru specifického úseku nukleové kyseliny mikroorganismu s takovým pořadím bází (adenin, guanin, thymin, cytosin popř. uracil, jenž se přirozeně nevyskytuje), které je pro hledaného původce typické. Přítomnost specifického úseku nukleové kyseliny v biologickém materiálu od pacienta lze považovat za průkaz příslušného mikroorganismu (10).

V mikrobiologické laboratorní diagnostice je jednou z nejčastěji používaných metod tzv. polymerázová řetězová reakce (PCR). Reakce byla popsána roku 1983 Kary Mullisem jako *in vitro* metoda pro enzymatickou syntézu definované sekvence DNA. Je považována za standardní metodu detekce některých nekultivovatelných nebo obtížně kultivovatelných patogenů a využívá se její rychlosti při urgentních vyšetřeních a při sledování léčby pacienta. Prvním krokem v PCR je uvolnění nukleových kyselin z buněk pomocí různých lyzačních postupů.

Nukleová kyselina mikroorganismu se může nacházet extracelulárně, intracelulárně nebo integrovaná do buněčného genomu hostitele. Není ve zpracovávaných vzorcích v čisté formě, ale většinou společně s nadbytkem buněčné nukleové kyseliny hostitele, proteinů, solí, lipidů a jiných chemických sloučenin i potenciálních inhibitorů reakce. Pro detekci a další analýzu je nutno ji alespoň částečně obnažit nebo dokonce oddělit od kontaminujících složek. Pro běžné diagnostické metody se oddělují pouze ostatní složky, není třeba nukleovou kyselinu patogenů oddělovat od další DNA (81). Existují různé postupy izolací. Orientačně je můžeme rozdělit na metody využívající fenol a metody bezfenolové.

Vlastním principem polymerázové řetězové reakce je in vitro namnožení (amplifikace) specifického úseku nukleové kyseliny (DNA nebo RNA). Praktické provedení reakce spočívá v cyklickém střídání denaturace dvouřetězcové nukleové kyseliny, připojení (annealing) specifických komplementárních oligonukleotidů (primerů) a jejich extenzi (prodloužení) termostabilní polymerázou (65).

Oligonukleotidové primery hybridizují s protichůdnými vlákny denaturované DNA, od jejichž 3'- konců je zahájena syntéza komplementárních řetězců. Syntéza nové DNA je zprostředkována DNA polymerázou, v reakčním prostředí jsou přítomny deoxyribonukleotidy, které představují stavební kameny pro nově syntetizovanou DNA (113).

Bylo popsáno velké množství metodik, které jsou potenciálně užitečné v různých diagnostických situacích. Každá z modifikací polymerázové řetězové reakce se odlišuje od ostatních v požadavcích na vzorek, v jeho přípravě, v pracnosti a náročnosti provedení, v citlivosti a specifitě.

Laboratorní postup začíná vždy denurací, tedy zvýšením teploty obvykle na 94 - 96°C po dobu 2 - 5 minut, kdy dojde k oddělení komplementárních řetězců dvouvláknové DNA. Důležitá je kompletní denaturace templátu, protože v případě, že se uskuteční pouze k částečná denaturace, molekuly DNA velice rychle renaturují a to vede k nespecifické vazbě primerů a možným falešným výsledkům.

Vlastní polymerázová řetězová reakce je tvořena opakovanými reakčními cykly. Každý cyklus se skládá ze tří kroků, které jsou charakterizovány odlišnými teplotními požadavky. **První krok je denurační**, při něm dochází k oddělení řetězců, trvá většinou 20 až 45 sekund při teplotě 94 - 95°C. Následuje tzv. **annealing**, to je komplementární připojení – při hybridizování – krátkých oligonukleotidů (primerů) k oběma denaturovaným vláknům DNA. Teplota annealingu se pohybuje v rozmezí 50 - 72°C, optimalizuje se v teplotním gradientu nebo se stanovuje empiricky. Tento krok trvá 30 až 120 sekund. **V posledním kroku cyklu - polymeraci** jsou syntetizovány nové komplementární řetězce DNA pomocí DNA polymerázy a všech čtyř deoxyribonukleosidtrifosfátových bází (dNTPs). Při standardní PCR probíhá tato polymerační reakce při teplotě přibližně 72°C po dobu 45 až 90 sekund. *Taq* DNA polymeráza syntetizuje

při této teplotě DNA rychlostí přibližně 60 bází za sekundu. Nově syntetizované řetězce slouží jako templáty pro další cyklus. Ten je pak zahájen denaturací zvýšenou teplotou, kdy opět dojde k oddělení nasyntetizovaných řetězců DNA. Během několika málo cyklů začnou v roztoku převažovat amplifikované molekuly o určité velikosti ohraničené z obou stran primery. Obvykle se pro amplifikaci využívá 20 až 35 cyklů, přičemž v každém cyklu se množství molekul oproti předcházejícímu zdvojnásobí. Z celé molekuly DNA, která je pro reakci použita, je tedy amplifikován pouze úsek mezi dodanými primery, protože DNA polymeráze pro iniciaci replikace na jiném místě chybí primery. Délka amplifikovaného úseku DNA je dána vzájemnou polohou primerů a dosahuje obvykle několika desítek až tisíc párů bází, běžně se amplifikují úseky 100 až 300 (600) bp (párů bází).

Závěrečná extenze se provádí po posledním cyklu (obvykle 72°C/5-20 minut) a slouží k dokončení syntézy a k renaturaci jednořetězcových produktů.

Reakční směs (Master Mix-MM) obsahuje pufr, primery, dNTPs, hořčičnaté ionty a *Taq* DNA polymerázu. Objem směsi je obvykle mezi 20 a 100 µl. K reakční směsi je přidán templát, kterým může být DNA nebo RNA. V případě RNA je nutno ribonukleovou kyselinu před vlastní amplifikací reverzně transkribovat do jednovláknové cDNA, ke které je druhé komplementární vlákno přidáno amplifikující DNA polymerázou. Množství DNA jako výchozího materiálu je velmi nízké, teoreticky postačuje jedna molekula. Množství templátu volíme obvykle podle jeho velikosti; kvalita templátu ovlivňuje výsledek PCR. Velké množství RNA může vázat Mg^{2+} ionty, znečištěný templát může obsahovat inhibitory PCR. Doporučovaná množství DNA podle velikosti templátu jsou: 100 - 500 ng lidské genomové DNA, 1 - 10 ng bakteriální DNA a 0,1 - 1 ng plazmidové DNA (81,113).

Primery jsou syntetické oligonukleotidy o velikosti 10 až 30 nukleotidů. Sekvence a koncentrace primeru významně ovlivňuje výsledek PCR. Optimální koncentrace je mezi 0,1 až 0,6 µM. U některých systémů může vyšší koncentrace zlepšit výsledky. Naopak nižší koncentrace vede k předčasnému vyčerpání primerů a snížení výtěžku. GC : AT poměr by měl být 1 : 1, primery by neměly obsahovat oblasti bohaté na AT a GC a neměly

by být mezi sebou komplementární. V PCR se někdy tvoří tzv. dimer primeru, což je reakční produkt složený primárně z primerů použitých v reakci a je dlouhý asi jako dvojnásobek délky jednotlivého primeru. Je velmi účinně amplifikován a může se stát převládajícím produktem. Může tedy snížit účinnost amplifikace specifických sekvencí, jinak jeho přítomnost neinterferuje s detekcí specifických sekvencí.

Deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTPs) se používají ve formě Na^+ nebo Li^+ solí. Výsledná koncentrace se může pohybovat v rozmezí 50 - 500 μM (pro každý nukleotid), nejběžnější koncentrace dNTP je 200 μM . Při zvýšení koncentrace dNTP je třeba zvýšit koncentraci Mg^{2+} iontů.

Mg^{2+} ionty tvoří rozpustný komplex s dNTP a vytvářejí substrát, který rozpoznává DNA polymeráza. Volné Mg^{2+} ovlivňují aktivitu enzymu. Pro dosažení nejlepšího výsledku se stanovuje koncentrace Mg^{2+} experimentálně. Optimální koncentrace může kolísat od 1 mM do 5 mM. Nejčastěji používaná koncentrace je 1,5 mM pro 200 μM dNTPs.

Termostabilní Taq DNA polymeráza pochází z termofilního mikroorganismu *Thermus aquaticus* žijícího v horkých pramenech. Její teplotní optimum je 75 - 80°C. Enzym však odolá teplotám nad 90°C, dokonce až 98°C. Díky tomu lze enzym dodat pouze na začátku a reakci automatizovat použitím termální cyklu. Obvyklá koncentrace je 0,5 - 2,5 jednotek/50 μl reakční směsi, ale v jednotlivých případech je vhodné vyzkoušet více koncentrací. Příliš nízká koncentrace polymerázy je příčinou nedostatečné tvorby produktu, příliš vysoká koncentrace způsobuje nespecifické reakce. Porfyriny, heparin, methanol, detergenty, některé kovy a jiné dosud nespecifikované inhibitory inhibují její aktivitu. Termostabilní DNA polymerázy byly izolovány i z dalších mikroorganismů, např. *Tth* DNA polymeráza z *Thermus thermophilus* nebo *Pwo* DNA polymeráza z *Pyrococcus woesei*.

Hodnota pH je dána reakčním pufrům. Obvykle odpovídá pH 8,3 - 9,0. Obsahuje 10 - 50 mM Tris-HCl, maximálně 50 mM KCl, případně další látky, které mohou v některých případech ovlivnit senzitivitu a specifitu PCR reakce. Jejich vliv se obvykle určuje experimentálně. Mohou to být například albumin bovinního séra (100 ng/50 μl), dimethylsulfoxid (2 - 10% v/v -

redukuje nespecifické vazby primeru), detergenty (Tween 20), betain (0,5 - 2 M), želatina nebo glycerol (81,113).

V rutinní diagnostice je účelné amplifikovat více úseků DNA najednou. Při této tzv. multiplex reakci je použito více párů specifických primerů. Dochází k amplifikaci více cílových sekvencí při jedné reakci. Toho je možno využít např. při testování vzájemně nesouvisejících oblastí na DNA nebo pro současnou amplifikaci vnitřní kontroly společně se vzorky. Výhodou jsou i nižší cenové náklady než při samostatných amplifikacích.

PCR technika proniká do všech oblastí molekulární biologie. Díky PCR není již limitována detekce dříve „nedostupné“ DNA jak v oblasti molekulárně biologického výzkumu, tak v diagnostice. Použití a možnosti PCR se rozšířily do všech oblastí i díky nejrůznějším modifikacím, jako jsou například zpětná tak zvaná RT-PCR, *in situ* PCR, inverzní PCR, asymetrická PCR, real-time PCR a další.

DNA fragmenty vzniklé PCR reakcí nebo štěpením restrikcími endonukleázami jsou běžně analyzovány pomocí elektroforézy v agarózovém gelu. Nukleové kyseliny migrují v agarózovém gelu vlivem působení stejnosměrného elektrického pole a rychlost této migrace je nepřímo úměrná dekadickému logaritmu počtu párů bází. Větší fragmenty se tedy pohybují pomaleji, menší rychleji. Při neutrálním pH je DNA negativně nabitá a migruje od katody směrem k anodě. Příčinou rovnoměrného rozložení negativních nábojů v molekulách DNA a RNA je sacharido-fosfátová páteř nukleových kyselin (113).

Elektroforéza se provádí v horizontální poloze submerzní formou. K jejímu provedení se používají elektroforetické vany a hřebeny různých rozměrů. Agarózové gely bývají 3-6 mm silné, pomocí hřebene se tvoří jamky pro nanášení produktu PCR. Produkt je před nanesením do jamky smíchán s nanášecím roztokem (loading buffer), který je těžký, viskózní a umožňuje vložení vzorku do jamky v gelu pod puřrem. Nanášecí roztok obsahuje také barvy (např. bromfenolovou modř) umožňující sledovat, v jaké části gelu se fragmenty nachází. Elektroforéza probíhá při pokojové teplotě, nejčastěji používané napětí je 100 V.

Pro **vizualizaci DNA fragmentů** se z fluorescenčních látek nejčastěji používá ethidium bromid, který vytváří komplex s DNA. Tento komplex

absorbuje UV světlo o vlnové délce 260 - 300 nm. Pro zvýšení citlivosti detekce DNA produktu lze použít SybreGreen. Tato fluorescenční látka je asi 8 - 10x citlivější než ethidium bromid.

Rozlišovací schopnost agarózových gelů závisí zejména na koncentraci agarózy a dále na použitém pufru. Koncentrace gelu musí být volena v závislosti na velikosti separovaných DNA fragmentů.

Separáčnı rozmezı agarózových gelů

Agaróza (%)	DNA (bp)
1%	800 bp a více
1,5%	600 - 800 bp
2%	200 - 800 bp
3%	80 - 200 bp

Kratší fragmenty je nutné dělit v polyakrylamidovém gelu nebo pomocí speciální agarózy (např. MetaPhore Agarose). Polyakrylamidový gel je druhým nejčastěji používaným elektroforetickým médiem v molekulární biologii. Může být denaturační, obvykle s ureou, nebo nedenaturační. Jedná se o vertikální elektroforézu (81,113).

Kontrola kvality PCR

Pro zajištění správnosti výsledků je v laboratoři prováděna pravidelná vnitřní kontrola kvality (18). V molekulárně biologických metodách se skládá z pozitivní, negativní a inhibiční kontroly (tzv. inhibiční zkoušky). Externí hodnocení kvality se používá pro porovnání vlastních výsledků s jinými laboratořemi.

Pozitivní kontrola amplifikace

Pozitivní kontrola amplifikace umožní kontrolovat řádný průběh amplifikační reakce a musí být řazena ke každému běhu PCR. Pro tento účel se používá izolovaná DNA (resp. RNA) z kultury příslušného mikroorganismu nebo z pozitivního biologického materiálu. Pozitivní kontrola amplifikace však nezaručuje správnost izolace.

Negativní kontrola amplifikace

Negativní kontrola musí být opět řazena ke každému běhu PCR, v případě většího počtu vzorků je vhodné použít dvě až tři negativní kontroly. Nejčastěji se používá destilovaná voda, je možné využít izolaci z negativního biologického materiálu. Přidává se k amplifikační směsi ve stejném množství jako templátová DNA. Její význam spočívá v kontrole toho, zda nedošlo ke kontaminaci templátu či amplifikační směsi PCR produktem.

Inhibiční zkouška

Ve vyšetřovaném materiálu se může vyskytovat řada látek způsobujících inhibici polymerázové řetězové reakce. Přítomnost nejrůznějších inhibitorů DNA polymerázy může vést k falešně negativním výsledkům. K nejčastěji se vyskytujícím inhibitorům patří hemoglobin, bilirubin, heparin, guanidin, dextransulfát sodný, triglyceridy, glukóza, kovy atd. V literatuře je uváděn (55) výskyt inhibitorů u 2 - 25 % vzorků v závislosti na typu odebraného materiálu. Je vhodné používat vnitřní kontroly jako indikátory procesu. Amplifikace vnitřní kontroly probíhá v jedné reakční zkumavce s testovanou DNA. Pokud nedojde k amplifikaci interní kontroly, lze předpokládat inhibici PCR. Použití interní kontroly amplifikace vyloučí vydávání falešně negativních výsledků při průkazu extrahumánního genomu v klinickém materiálu.

Amplifikace vnitřních standardů může být provedena různými způsoby. Do reakční směsi (MasterMixu) může být přidán, kromě páru primerů komplementárních k vyšetřovanému cíli, další pár primerů komplementárních pro vnitřní standard a reakce je pak prováděna jako multiplex PCR. Při vyšetření klinického materiálu, který obsahuje dostatek lidských buněk, se využívá přítomnost lidské DNA a probíhá amplifikace například genu pro β -aktin, β -globin, β -mikroglobulin, tzv. housekeepingových genů. U materiálu, který obsahuje minimum či neobsahuje žádnou lidskou DNA se do amplifikační směsi přidává cizorodá DNA nebo se může používat PCR směs obsahující pouze jeden pár primerů komplementárních pro diagnostický cíl i pro speciálně připravenou vnitřní

kontrolu. Použití shodných primerů umožňují identické 5'- koncové sekvence vnitřního standardu s cílovým úsekem vyšetřovaného agens. Tato reakce je založena na principu koamplifikace nukleových kyselin ve vzorku, a tudíž dochází ke kompetici o vložené primery.

Při kvalitativním průkazu vyšetřovaného agens musí být koncentrace primerů pro interní kontrolu velmi nízká, na hranici citlivosti, aby nemohlo dojít k amplifikaci „*vnitřní kontroly amplifikace*“ na úkor nukleové kyseliny infekčního agens, a to ani při jejím velmi nízkém množství ve vzorku (18).

Zřejmě nejvýznamnější změnou v technologii PCR se v posledních letech stala možnost provádět **kvantitativní PCR v reálném čase (tzv. Real time PCR)**. Zatímco klasické postupy kvantifikace nukleových kyselin mají poměrně malý dynamický rozsah, kvantitativní real-time PCR tento nedostatek odstraňuje. PCR v reálném čase je založena na kombinaci PCR amplifikace se současnou fluorescenční detekcí množství vzniklých ampikonů v každém cyklu PCR. Real-time PCR kombinuje amplifikaci pomocí PCR a detekci sekvencně specifickou sondou. Použití této sondy je prováděno v reálném čase PCR (v každém jejím cyklu), na rozdíl od možného použití sondy po ukončení PCR u konvenční reakce.

Kvantitativní real-time PCR v současnosti nachází široké použití ve vědeckých a stále více také v klinických laboratořích. Základní výhodou metody je rychlost stanovení bez přílišné manuální náročnosti. Pokud jsou dodrženy základní metodické pokyny pro provádění kvantitativní real-time PCR, je tato metoda také velmi přesná a spolehlivá.

Problémem diagnostické aplikace PCR technik je také riziko kontaminace a možná falešná pozitivita zapříčiněná vlastní vysokou citlivostí těchto metod. Nejčastějšími zdroji kontaminace jsou poměrně velká množství cílových molekul DNA nebo RNA přítomných ve vyšetřovaných vzorcích, popř. kontaminace reagensů pro PCR. Nejčastěji je to však kumulace produktů PCR reakcí v laboratoři při opakovaných amplifikacích těchto cílových sekvencí. K zamezení přenosu je nutné všechny reagenty používané v reakci fyzicky izolovat (nejlépe v oddělené laboratoři) od zařízení a nástrojů, jimiž se analyzují produkty, používat pipetovací špičky s filtrem, atd. Dodržování ochranných mechanismů je nedílnou součástí vnitřní kontroly kvality.

Vzhledem k možnostem přímého průkazu DNA mikroorganismů, které molekulární biologické metody poskytují pro laboratorní diagnostiku i u poměrně složitě detekovatelných infekčních agens, jako jsou *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica*, patogenní leptospiry a v neposlední řadě *Borrelia burgdorferi*, jsme zavedli a standardizovali vyšetření metodou PCR u těchto infekcí do rutinního provozu. Ve své dizertační práci jsem se zaměřila na zhodnocení výsledků přípravy a použití PCR metod v laboratorní diagnostice infekcí vyvolaných prvokem *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica* a patogenními sérovary bakterií zařazených do species *Leptospira*.

Toxoplasma gondii

Infekce parazitickým prvokem *Toxoplasma gondii* je ve světě jednou z nejčastěji se vyskytujících parazitárních nálezů, například ve Velké Británii se udává prevalence 20 – 40%, ve Francii 80 – 90% (85). V České republice je toxoplazmóza patrně rovněž nejčastěji se vyskytující parazitární nález. Výsledky sérologických vyšetření naznačují, že 25 – 40 % (77,125) naší populace přišlo do styku s antigeny prvoka *T. gondii*. Častost kontaktu však silně kolísá v závislosti na profesním a sociálním složení populace i životních zvyklostech obyvatelstva (31).

Původce onemocnění - *Toxoplasma gondii* (94) - poprvé popsali již v roce 1908 Nicolle a Manceaux u severoafričského hlodavce *Ctenodactylus gondii* z čeledi severoafričských pamyší hřebenoprstých. Rod *Toxoplasma* je taxonomicky řazen do podříše Protozoa, kmene Apicomplexa, podtřídy Coccidia a řádu Eucoccidia.

Definitivním hostitelem *Toxoplasma gondii* (kokcidie příbuzná malarickým plasmodiím) jsou kočkovité šelmy, u kterých dochází k sexuálnímu vývoji parazita. Ve střevních epitelových buňkách probíhá celý životní cyklus prvoka, zakončený sexuálním množením, jehož výsledkem je **oocysta** (infekční stadium *T. gondii* o velikosti asi 9 x 14 µm), která obsahuje *sporozoity* (2 x 8 µm). Oocysty jsou vylučovány s výkaly nakažené kočky,

obvykle po dobu 7 – 20 dnů, do prostředí (až 10^6 oocyst denně), kde dozrávají na vzduchu a teprve za 2 – 3 dny se stávají plně infekčními pro další kočku nebo jiného živočicha včetně člověka, který oocysty spolkne (130, 94, 99). Významnými mezihostiteli *T. gondii* jsou myšovití hlodavci. V posledních 10 letech byla i genetickými metodami potvrzena hypotéza, že populace prvoka *T. gondii* je v rámci druhu rozlišena na kmeny pro myši virulentní a avirulentní a není tedy geneticky uniformní (47, 56). Člověk je pouze jedním z mnoha známých mezihostitelů parazita (savci a zatím experimentálně i někteří ptáci).

Trofickým stadiem parazita jsou *sporozoiti* a *tachyzoiti* (tvaru rohlíčku o velikosti 5 – 7 μm), kteří kolují v akutním stadiu infekce v tělních tekutinách, jsou invazivní, pronikají do buněk infikovaného organismu a intenzívně se v nich množí. Z tachyzoitů se po průniku do cílové buňky a opakovaném dělení stávají *bradyzoiti*, kteří představují klidová, intracelulární stadia prvoka *Toxoplasma gondii*. Vytvořená „**tkáňová cysta**“ má velikost asi 60 μm (někdy 100 – 300 μm) a je vyplněná stovkami bradyzoitů. Tkáňové cysty se nejčastěji vyskytují v CNS a v kosterní svalovině. Při oslabení obranyschopnosti organismu může dojít v tkáňových cystách k přeměně *bradyzoitů* na *tachyzoity* a k novému vzplanutí infekce.

Cesty přenosu infekce *Toxoplasma gondii* na člověka jsou následující (94):

- **zralou oocystou** (obsahuje 8 sporozoitů) s fekáliemi kočky (definitivního hostitele). Infikovaná kočka vylučuje oocysty zhruba 7 – 20 dní. Člověk se nakazí pozřením zralé oocysty (kontaminace rukou, zeleniny apod).
- **tkáňovou cystou** vytvořenou v orgánech náhodného hostitele (mezihostitele). Nákaza člověka vzniká zřejmě nejčastěji po pozření nedostatečně tepelně upraveného masa obsahujícího tkáňové cysty toxoplazem (stadium bradyzoitů).

Z obou typů cyst se v tenkém střevě uvolní vývojová stadia *Toxoplasma gondii* - *sporozoiti* nebo *bradyzoiti*, ti pronikají epitelovými buňkami a mění se v tachyzoity, kteří migrují do různých orgánů (oko, mozek, játra, svalstvo apod.), kde se množí (akutní stadium infekce) a vytvářejí tkáňové cysty.

V zažívacím traktu koček dojde k sexuálnímu vývoji, vzniká oocysta, která odchází s fekáliemi a může infikovat nového hostitele; celý cyklus se opakuje.

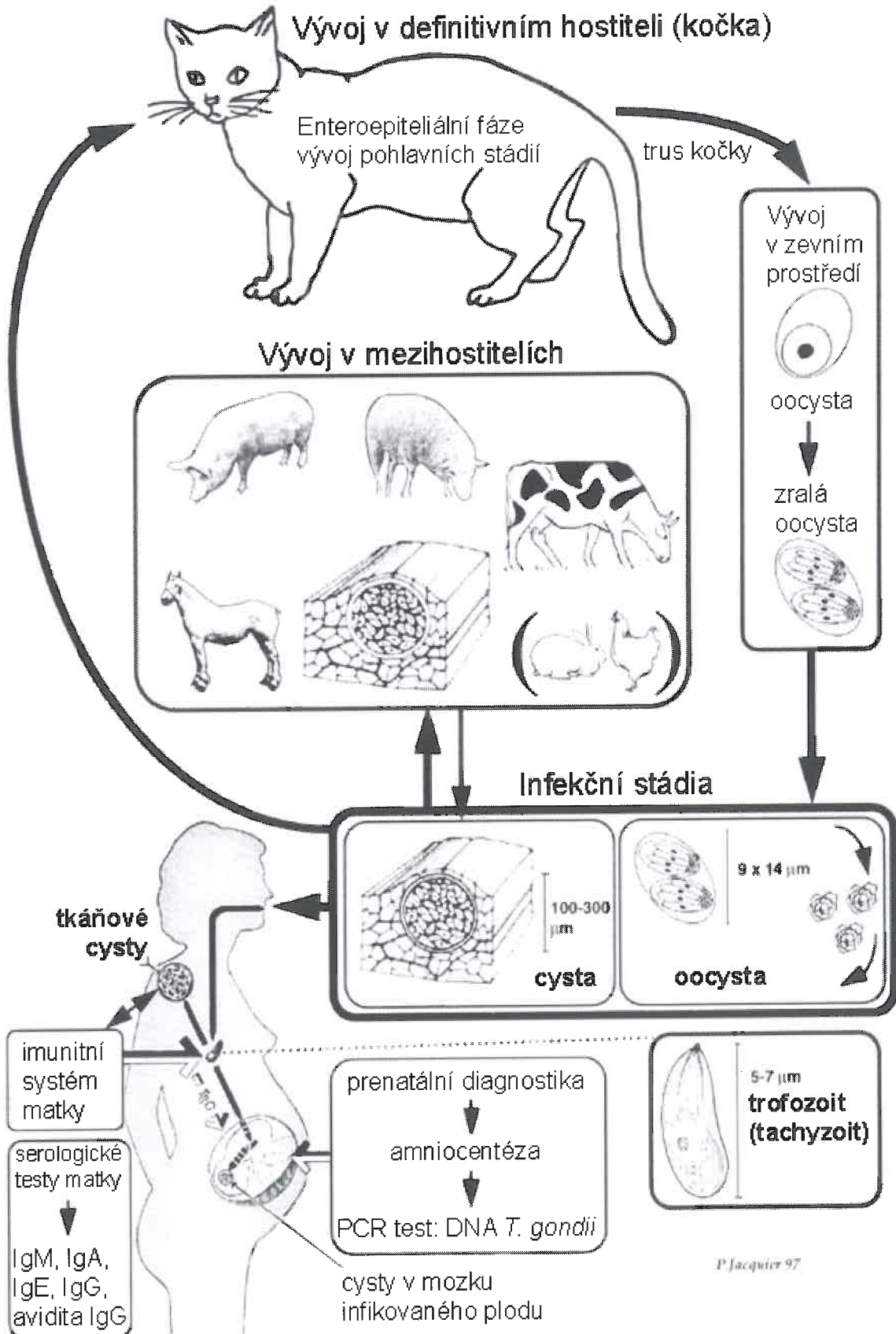
- **transplacentární přenos**

Toxoplasma gondii také může proniknout placentou při nákaze matky krátce před otěhotněním nebo v průběhu gravidity a způsobit poškození plodu. Tak vzniká vrozená forma toxoplazmózy (79,101). K přenosu nákazy na plod dochází asi ve 40 % případů. Frekvence přenosu souvisí s obdobím těhotenství, v prvním trimestru je to asi v 15 až 25%, ve 3. trimestru gravidity až v 65 %. Závažnost poškození plodu je tím vyšší, čím méně zralý byl plod v době infekce. Je popisován smrtelný průběh generalizované toxoplazmózy novorozence, u něhož došlo k infekci v posledním trimestru gravidity, pravděpodobně aktivací latentní toxoplazmózy matky (86). Po porodu bývá toxoplazmózou zjevně postiženo jen asi 10 % infikovaných novorozenců, ale téměř v 80 % u zbývajících novorozenců je později pozorována psychomotorická retardace, porucha sluchu nebo chorioretinitida (73,101,125).

Schéma na následující stránce znázorňuje vývojový cyklus prvoka *Toxoplasma gondii* od sexuálního vývoje v zažívacím traktu koček (definitivní hostitel) přes fázi v zevním prostředí a v mezihostitelích (tvorba tkáňové cysty) až po možné cesty přenosu infekce na člověka.

Vývojový cyklus *Toxoplasma gondii*.

Převzato a upraveno z Dr. Patrick Jacquier, Labor. ParaDiag, Bern. Copyright povolen.
<http://www.roche.com/pages/facets/2/toxmoplasma.jpg> 598x879 pixelů-109k



Toxoplazmózu jako chorobu popsal v roce 1923 pražský oční lékař, doktor Josef Janků u zemřelého dítěte s kongenitálním hydrocefalem, proto se označuje také jako morbus Janků (131). *Toxoplasma gondii* je typický oportunní parazit, takže většina infekcí člověka (80-90%) proběhne jako proces asymptomatický nebo pod obrazem nespecifických klinických příznaků (zduření lymfatických uzlin v oblasti šíje, horečka, bolesti hlavy a svalů, zvýšená únava). Výjimečně se u imunokompetentních jedinců projeví výrazné symptomy - generalizovaná lymfadenopatie (112), makulopapulózní exantém, hepatitida, encefalitida, případně myokarditida a další. Závažné jsou především intrauterinní infekce plodu získané v graviditě (k přenosu nákazy na plod dochází asi ve 40%), oční formy toxoplazmózy (78,110) a infekce imunokompromitovaných jedinců (11). Toxoplazmóza mozku patří k nejčastějším příčinám úmrtí u HIV pozitivních osob ve stadiu rozvinuté AIDS (11,16,30,72,99,82). Vysoká frekvence onemocnění je pozorována také u pacientů s maligními tumory (Hodgkinova choroba), po transplantacích orgánů a podobně (17,74,94).

Lidský plod (intrauterinní infekce) je nejvíce ohrožen onemocněním matky toxoplazmózou krátce před otěhotněním nebo v prvním trimestru gravidity, velmi vzácně jsou popisovány případy chronické toxoplazmózy nebo dokonce reinfekce matky a následné onemocnění plodu kongenitální toxoplazmózou (130). Infekce *Toxoplasma gondii* může způsobit potrat nebo porod mrtvého plodu, anebo se může dítě narodit s různým stupněm poškození – kalcifikacemi v mozku, hydrocefalem, poruchami zraku, malformacemi, postižením intelektu a dalšími poruchami. Při infekci v pozdní fázi těhotenství se často u dítěte neobjeví žádné časné klinické příznaky, ale zjišťujeme přítomnost humorální a buněčné imunitní reakce. Cysty *Toxoplasma gondii* však přetrvávají v retině, mozku, myokardu a eventuálně i v kosterních svalech. Později, zhruba ve 20. až 30. roce života takto infikovaného dítěte se mohou projevit následné klinické manifestace jako chorioretinitis (110,118) nebo různé neurologické poruchy (křeče, psychomotorická retardace a podobně) (101).

Ve výsledcích studie publikované v roce 1998 v Norsku (70) uvádí Jenum, že v souboru 35 940 vyšetřených gravidních žen byla kongenitální infekce *T. gondii* zjištěna u 0,03% novorozenců. Lécolier (85) v roce 1999

uvádí, že ve Francii se potvrzený výskyt akutní toxoplazmózy v graviditě pohybuje okolo 0,5% a vzhledem k počtu těhotenství ročně (750 000) lze tedy očekávat 500 – 1500 pravděpodobných přenosů toxoplazmové infekce z matky na plod. V České republice není vyšetření v graviditě na toxoplazmózu povinné a chybí tedy epidemiologické údaje z celého území. V roce 1998 publikoval Palička (101) výsledky studie provedené v okrese Karviná. Opakovaným sérologickým vyšetřením souboru 50 000 těhotných žen bylo prokázáno, že v tomto okrese je toxoplazmózou ohroženo 5,1‰ těhotenství. K nákaze žen krátce před graviditou (do 1 roku) dochází u 2,8‰ těhotných a k závažné primoinfekci v graviditě u 2,3‰ žen. U žen s primoinfekcí bylo v uvedené studii prokázáno, že k přenosu *T. gondii* na plod došlo ve 49% případů. Celkově autoři uzavírají, že ve sledované populaci je v důsledku nákazy toxoplazmózou poškozeno 2,25‰ těhotenství a z toho skončí spontánním abortem 1,02‰ a kongenitální toxoplazmózou 1,23‰ těhotenství.

V laboratorní parazitologické diagnostice se k potvrzení nebo vyloučení infekce prvokem *Toxoplasma gondii* využívají nejčastěji metody průkazu sérových protilátek (reakce vazby komplementu, ELISA testy pro průkaz markerů akutní infekce ve třídách IgM, IgA, IgE, průkaz protilátek ve třídě IgG) a popřípadě stanovení jejich avidity (120, 77). Metody přímého průkazu původce založené na infekci tkáňové kultury nebo vnímavého laboratorního zvířete (nejčastěji bílá laboratorní myš) jsou časově i metodicky náročné a výsledek získáme až za několik dní či dokonce týdnů (63,68,89,93,103,111).

Vzhledem ke skutečnosti, že protilátky ve třídách IgM, IgA a IgE proti *Toxoplasma gondii* přetrvávají v organismu člověka řadu měsíců a někdy dokonce i let, je většinou obtížné proces časově ohraničit a stanovit, zda se ještě jedná o akutní toxoplazmózu nebo již o přetrvávající protilátkovou odpověď. Vzestup titru protilátek svědčí o aktivní infekci (80), stabilně vysoké titry o nedávno proběhlé infekci a stabilně nízké titry o chronické infekci latentní (resp. o stavu nesterilní imunity). Imunoglobuliny IgM i další markery akutní infekce (IgE, IgA), jsou detekovány při akutně probíhající infekci a u vrozené toxoplazmózy (42), ale nejsou zvýšené u dospělých

s reaktivovanou oční formou nebo u imunodeficientních osob s diseminovanou infekcí.

Z důvodů poměrně obtížné interpretace výsledků sérologických vyšetření u různých forem toxoplazmózy jsme přistoupili k zavedení metody polymerázové řetězové reakce pro průkaz DNA prvoka *T. gondii* z klinického materiálu. Průkaz stávající parazitemie, resp. vyloučení přítomnosti DNA prvoka v organismu hostitele je důležitý především pro některé kategorie pacientů: gravidní ženy (41,43,51,53,70), imunokompromitované jedince (45), novorozence matek, které prodělaly infekci v těhotenství (44,69) a pacienty s významnými klinickými příznaky.

Abychom však získali validní laboratorní výsledky, je třeba pravidelně informovat zdravotníky o zásadách správného odběru a zasílání klinického materiálu od pacientů při různých formách onemocnění. Hodnocení výsledků sérologických vyšetření, metod detekce DNA *Toxoplasma gondii* i dalších, provádíme zásadně ve spolupráci s klinickými lékaři, kteří také indikují specifickou terapii.

Léčba musí být vždy přísně individuální a je indikována především při primární infekci v průběhu těhotenství, při aktivní chorioretinitidě, myokarditidě, hepatitidě nebo jiném orgánovém postižení. V terapii se používá kombinace pyrimethaminu se sulfadiazinem a kyselinou listovou. U HIV pozitivních a v případě očního postižení se přidává klindamycin. K prevenci transplacentárního přenosu toxoplazmózy se většinou používá spiramycin, od druhého trimestru gravidity kombinace pyrimethaminu se sulfadiazinem. U imunokompetentních osob není specifická terapie při nákaze *Toxoplasma gondii* většinou rutinně indikována (62,25).

Entamoeba histolytica

Entamoeba histolytica je patogenní invazivní parazit, jehož morfologie je identická s morfologií *Entamoeba dispar*. V běžné laboratorní praxi od sebe nelze odlišit améby *E. dispar* (neinvazivní) a *E. histolytica* (invazivní). Laboratorní metody umožňující rozlišit invazivní a neinvazivní formy améb jsou: kultivace, ELISA testy, izoenzymová analýza, polymerázová řetězová reakce.

V posledních letech byla publikována nová data o ultrastruktuře a molekulární biologii druhů zařazených do podříše Protozoa (prvoci). Z těchto důvodů byla Corlisseem navržena nová klasifikace améb (60,28):

- nadtřída *Rhizopoda*
- třída *Entamoebidea*
- řád *Entamoebida*
- čeleď *Entamoebidae*

Faktory sloužící k rozlišení *Entamoeba histolytica* a *Entamoeba dispar* od jiných druhů, definoval v roce 1988 Neal (48). Určující je především morfologie, typ rozložení chromatinu v jádru, typ pohybu, fyziologie, antigenní vlastnosti, DNA, variabilita izoenzymů a vnímavost vůči léčivům.

Primárním zdrojem nákazy *E. histolytica* je člověk vylučující cysty stolicí, nejnebezpečnější z hlediska přenosu jsou asymptomatictí nosiči. Klinicky manifestní nákaza amébami se vyskytuje mnohem častěji u mužů než u žen. Stolice infikovaná cystami *E. histolytica* může kontaminovat čerstvé potraviny a vodu.

Životní cyklus *E. histolytica*

V životním cyklu prvoka se střídají dvě stádia: stádium cysty a stádium trofozoita (vegetativní). Člověk je nakažen pozřením zralých čtyřjaderných cyst. Cysty putují do distální části terminálního ilea. Ve střevě dochází k excystaci a uvolnění améby a případně k transformaci do jednojaderných dceřinných trofozoitů, kteří se živí bakteriemi. V tlustém střevě probíhá vývoj přes stadium precysty (jednojaderná), vyžívání (maturaci), do stadia typických čtyřjaderných cyst, které jsou stolicí

vylučovány do zevního prostředí. Infekční jsou pouze plně zralé čtyřjaderné cysty (28, 60).

Trofozoit se vyskytuje ve dvou formách. Menší (minuta) je forma neinvazivní, větší (magna) je invazivní. Cysta se vždy vyvíjí ve formu minuta; v tlustém střevě může dojít k transformaci formy minuta ve formu magna. Předpokládá se, že k transformaci dochází vlivem faktorů prostředí: výkyvů teploty, změny bakteriální flóry, redox potenciálu, případně vlivem chemických látek (např. léčiv). *Entamoeba histolytica* reaguje na změnu prostředí stresovou reakcí s přeměnou v invazivní formu trofozoita.

Forma magna (dysenterická) je invazivní stadium trofozoita. Napadá sliznici tlustého střeva, zabíjí jaderné buňky a pohlcuje erythrocyty. Může vyvolat těžké extraintestinální komplikace již probíhajícího onemocnění. Forma magna je slepou linií ve vývoji améb neboť ztratila možnost zpětné konverze na formu minuta i možnost encystace (28).

Trofozoiti jsou pohyblivá améboidní stadia prvoka, která mohou přežívat jen velmi krátkou dobu mimo tělo hostitele. Améby získané z průjmových stolic obvykle obsahují pohlcené erythrocyty, což je považováno za znak jejich invazivity (38).

Obr.č.1: *Entamoeba histolytica* - invazivní pohyblivé stadium trofozoita z kultury, skenovací elektronový mikroskop, zvětšení neuvedeno, Collier (28)

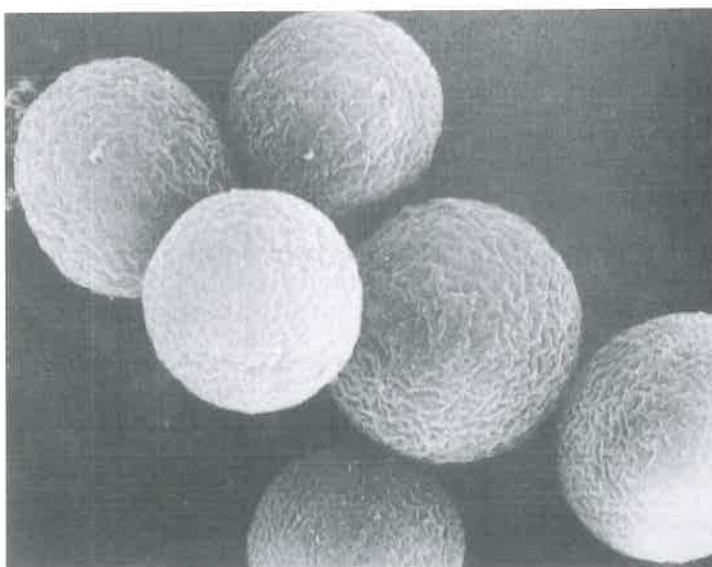


Lokomoce se uskutečňuje řízeným cytoplazmatickým prouděním a valivým pohybem s tvorbou pseudopodií, která slouží i k obklopení a pohlcení částeczek potravy.

Jádro *E. histolytica* má v průměru 4-7 μm s dvojitou jadernou membránou. Uvnitř jádra se kromě centrálně umístěného karyozomu nacházejí chromatinová granula, jejichž uspořádání je typické pro jádro prvoka *E. histolytica* a je při mikroskopii důležitým diagnostickým znakem.

Cysta je nepohyblivé (klidové), neinvazivní stadium parazita sloužící k šíření infekce na další hostitele. Cysty *E. histolytica* mají kulatá, až mírně oválná těla o průměru asi 12-15 μm a jejich cytoplazma obsahuje množství vakuol s depozity glykogenu, která přibývají s maturací cyst. V cytoplazmě jsou přítomna chromatoidní tělíska, u nichž není dosud přesně známo, zda jsou tvořena ribozomálními prekurzory nebo již funkčními ribozomy. Pouze zralé čtyřjaderné cysty jsou infekční (28). Cysty mohou mimo organismus hostitele přežívat velmi dlouhou dobu (týdny i měsíce), zvláště ve vlhkém prostředí, při teplotách od +5 ° C do +40 ° C. Jsou citlivé k nízkému pH a k vyschnutí.

Obr.č.2: *Entamoeba histolytica* - klidové stádium cysty - skenovací elektronový mikroskop, zvětšení neuvedeno, Collier (28)



Pohyblivé invazivní formy parazita, trofozoiti, adherují k intestinálním epiteliálním buňkám, napadají je a vyvolávají tzv. intestinální amébozu. Invazivní trofozoiti mohou penetrovat do střevní submukózy, odtud migrovat do ostatních orgánů a vyvolat tak extraintestinální formu onemocnění (38).

Pro vznik invazivního onemocnění musí *E. histolytica* překonat řadu obranných mechanismů hostitele (střevní mikroflóru, porušení mucinové vrstvy sliznice střeva). Klíčovým faktorem virulence *E. histolytica* je patrně lektin specifický pro galaktózu a N-acetylgalactosamin (Gal-GalNAc lektin). V posledních letech je tento lektin studován jako potenciální kandidát pro přípravu vakcíny proti améboze.

V cytoplazmatických vezikulech améb je lokalizován ionoforový protein amebapor, který je vylučován v místě kontaktu s cílovou buňkou a má cytolytický účinek. Důležitým činitelem v patogenezi pokročilejších fází infekce jsou proteinázy, které narušují mezibuněčnou hmotu a lyzují hostitelské buňky. V submukóze se následně tvoří charakteristické ulcerace lahvicovitého tvaru.

Invaze infekce mimo střevní trakt je vždy sekundární a předchází jí symptomatická či asymptomatická střevní infekce. Améby jsou většinou zaneseny do ostatních orgánů (nejčastěji jater) hematogenní nebo lymfatickou cestou. Invaze extraintestinálních tkání amébami vyvolá specifickou protilátkovou odpověď bez protektivního účinku, kterou však lze využít v sérologické diagnostice (28).

Střevní forma amébozy nejčastěji postihuje cékum a vzestupný tračník, méně často sigmoideum, vzácně příčný tračník. Symptomatické projevy mohou mít různé formy: symptomatická noninvazivní infekce, akutní kolitida (dysenterie), fulminantní kolitida s perforací střev, amébová apendicitida, toxické megakolon, chronická nedyzenterická kolitida a améboom (119, 121).

Extraintestinální formy amébozy se nejčastěji klinicky manifestují jako jaterní absces, méně často jako pleuropulmonální onemocnění, peritonitida, perikarditida, mozkové abscesy či kožní projevy.

Diagnostika střevní infekce *E. histolytica* spočívá ve vyšetření stolice následujícími metodami: nativní preparát, koncentrační metody k diagnostice prvoků (flotace v nasyceném roztoku síranu zinečnatého – dle Fausta), barvený preparát, histologie, identifikace izoenzymovou analýzou a

PCR. Diagnostika extraintestinální formy infekce se provádí nejčastěji průkazem protilátek (ELISA) a v současné době také průkazem DNA metodou polymerázové řetězové reakce, popřípadě kultivací (39, 48,49,91,95).

Lékem volby jsou u všech forem amébozy nitroimidazolové preparáty (metronidazol a ornidazol) (28,61,62).

Leptospira species

Leptospirové infekce zahrnují velkou skupinu horečnatých onemocnění zvířat i člověka, vyvolaných bakteriemi z rodu *Leptospira* (řád *Spirochaetales*) (87). Leptospiry (bakterie velikosti 4 – 20 μm x 0,10 μm s jedním bičíkem) jsou, podobně jako všechny spirochéty živě pohyblivé mikroorganismy spirálovitého tvaru. Mají jedinečnou buněčnou stavbu, jsou štíhlé, spirálovitě nebo šroubovitě stočené, pohybují se pomocí bičíků. Tělo bakterie je tvořeno protoplazmatickým válcem obklopeným mnohavrstevnou membránovou strukturou zvanou vnější obal (vnější membrána). Pod obalem je gramnegativní buněčná stěna s vlastní cytoplazmatickou membránou. Mezi buněčnou stěnou a vnějším obalem je lokalizováno perioplazmatické středové (axiální) vlákno, které je orgánem šroubovitého pohybu spirochet. Axiální vlákno leptospir se skládá z fibril, nazývaných také perioplazmatické bičíky. Protože tvoří klidová stadia, jsou leptospiry citlivé na vyschnutí (při zaschnutí substrátu rychle hynou), ale ve vlhkém zevním prostředí mohou přežívat i několik měsíců. Obtížně se barví běžnými bakteriologickými barvicími technikami, častěji se proto používá mikroskopie v zástínu nebo imunoflorescence a pro diagnostiku suspektní leptospirózy u pacientů, detekce protilátek (26). Leptospiry jsou obligátně aerobní bakterie s poměrně dlouhou generační dobou (kultivace proto obvykle trvá nejméně 1–2 týdny), jako zdroje energie využívají mastné kyseliny. Jejich kultivace z klinického materiálu je obtížná a vyžaduje speciálně obohacená kultivační media (například Korthoffovo medium s přidavkem králičího séra). Většina

leptospir tvoří katalázu, oxidázu, lipázy, fosfolipázu, hyaluronidázu a transamidázy (10,131).

Infekce vyvolané leptospirami jsou přenosné ze zvířat na člověka (zoonózy). Onemocnění je v určitých přírodních ohniscích rozšířeno prakticky po celém světě - v tropických a subtropických oblastech, ale i v mírném pásmu (12). Hlavními rezervoáry infekce jsou hlodavci, ale i některá domácí zvířata (psi, prasata, hovězí dobytek, koně). Člověk se infikuje při práci nebo sportu (83,115,122) kontaminovanou vodou (průnik drobnými poraněními kůže a sliznicemi), potravou nebo přímým kontaktem s nemocným zvířetem (129) (jako profesionální nákaza u ošetřovatelů zvířat, pracovníků v masném průmyslu, zemědělství, lesních dělníků, pracovníků v deratizační službě a podobně). Významným epidemiologickým faktorem je skutečnost, že spirochéty jsou schopny pronikat i neporušenou pokožkou a sliznicemi, takže k infekcím dochází nejčastěji při koupání, sportu, práci v kontaminované vodě, ve vlhkém prostředí a podobně (83,87,76). Onemocnění leptospirózou probíhá často subklinicky nebo pod obrazem lehkého „virového onemocnění“ a nebývá vždy správně diagnostikováno. Počáteční necharakteristické příznaky (horečka, bolesti svalů apod.) se objevují po inkubační době, která se pohybuje v rozmezí 5 – 21 dnů (116). Závažný průběh má zejména Weilova choroba (34), způsobená spirochétou *Leptospira icterohaemorrhagiae*, objevenou v roce 1915 Inadem a Idem. Rezervoárovým zvířetem *L. icterohaemorrhagiae* je infikovaný potkan (promořenost populace potkanů se uvádí 25-30 %), který vylučuje leptospiry především močí (67). Klinické příznaky lidského onemocnění popsal poprvé Weil v roce 1886. Weilova choroba mívá často typický dvoufázový průběh. Leptospiremická fáze má rychlý začátek, je provázena zvýšenou teplotou až vysokou horečkou s třesavkou, občas poruchami vědomí, bolestmi hlavy a svalů (7,62,126). Za několik dnů dochází k rozvoji druhé fáze, provázené v řadě případů příznaky meningeálního dráždění (vyšetření mozkomíšního moku vykazuje známky serózní meningitidy). Rovněž bývají diagnostikovány známky postižení parenchymu ledvin (intersticiální nefritida) (32) a jater provázené elevací jaterních testů. Vyskytuje se i postižení plic s respirační insuficiencí (23,90,123,), krvácivé projevy (intravaskulární hemolýza)

(23,117), oční komplikace (iridocyklitida, později uveitida) (107,108) a další příznaky. Nákaza v době gravidity může vést k potratu.

Taxonomie rodu *Leptospira* prodělala v posledních letech značný vývoj. Podle klasifikace v Bergey's manual of determinative bacteriology patří leptospiry do řádu *Spirochaetales*, který se dělí na dvě čeledi, *Spirochaetaceae* a *Leptospiraceae*. Do první uvedené čeledi patří čtyři rody: *Spirochaeta*, *Cristispina*, *Treponema* a *Borrelia*, do druhé čeledi rody *Leptospira* a *Leptonema* (88,135).

Studie RNA genů dokumentují, že leptospiry patří fylogeneticky k nejstarším bakteriím a zřetelně se odlišují od ostatních spirochet, s nimiž mají společný tvar, podobné proteinové složení a antigenní vlastnosti. Některé další komponenty bakteriálního těla, např. proteiny teplotního šoku, flagelární proteiny, vnější membránové proteiny, společné antigeny nebo určité sekvence DNA leptospir, jsou shodné s DNA ostatních bakterií.

V současné době se rod *Leptospira* dělí na základě genové analýzy na 17 genomospecies (88). Dříve bylo nejčastěji používáno dělení rodu *Leptospira* na tři druhy, a to nepatogenní *Leptospira biflexa* a *Leptospira parva* a patogenní *Leptospira interrogans*.

V roce 2005 uvádí Dario R.: Leptospira Reference Laboratory (<http://dfp.univ.trieste.it/spirolab/leptostrains.html>) 21 séroskupin leptospir. Další dělení leptospir do sérovarů (více než 300) je stále komplikované, protože genetická taxonomie není shodná se sérologickou. (131, 15).

V České republice byly dosud izolovány u člověka následující sérovary leptospir: *L. icterohaemorrhagiae*, *grippotyphosa*, *copenhageni*, *sejroe*, *pomona*, *sorex-jalná*, *canicola*, *bratislava* Jež Bratislava, *polonica*, *istrica*.

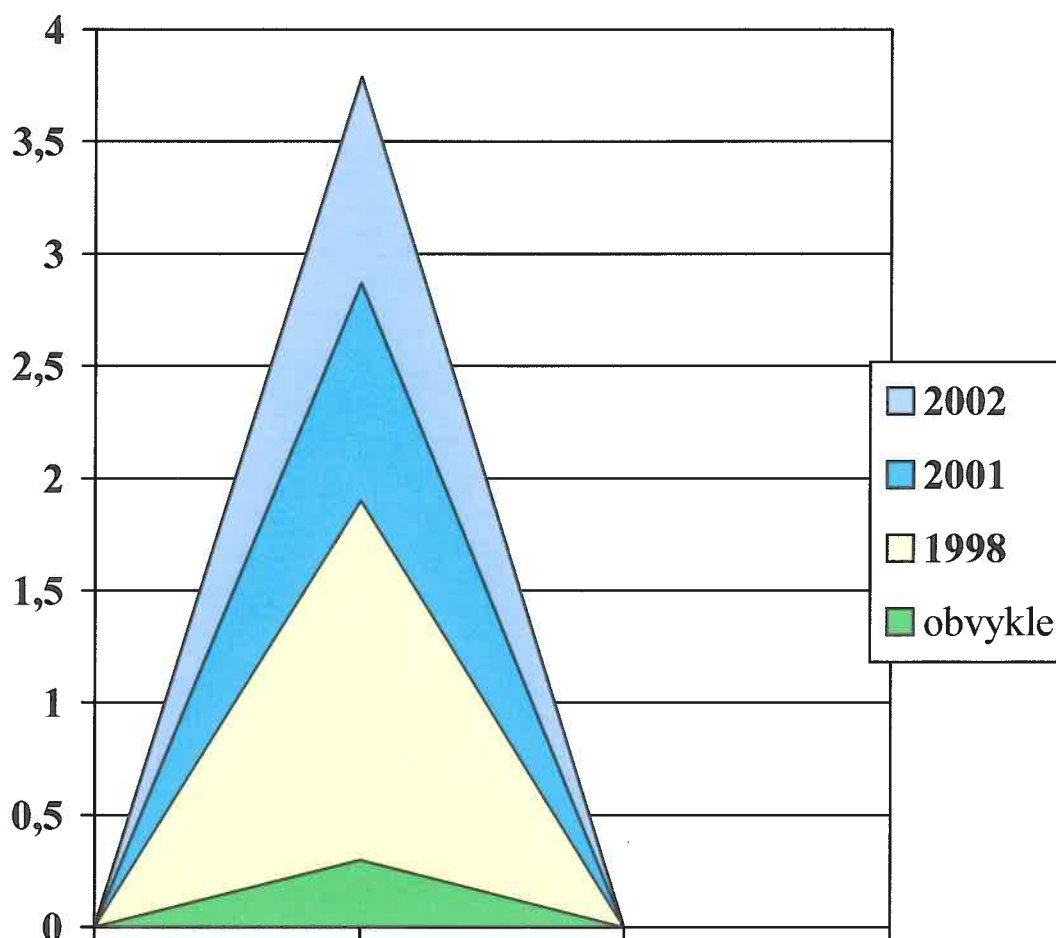
Sérovary leptospir vyskytujících se na území České republiky jsou podle současné klasifikace zařazeny do tří genomospecies:

1. ***Leptospira kirschneri***
2. ***Leptospira borgpetersenii***
3. ***Leptospira interrogans***

Sérovary leptospir používané pro screeningové sérologické vyšetření
v České republice

sérovar	genomospecies
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> Fryšava	<i>L. interrogans</i>
<i>L. copenhageni</i> Lebe	<i>L. interrogans</i>
<i>L. grippotyphosa</i> P 125	<i>L. kirschneri</i>
<i>L. grippotyphosa</i> Ž 6	<i>L. kirschneri</i>
<i>L. sejroe</i> M 84	<i>L. borgpetersenii</i>
<i>L. pomona</i> BP	<i>L. interrogans</i>
<i>L. sorex-jalna</i>	<i>L. borgpetersenii</i>
<i>L. bratislava</i> Jež Bratislava	<i>L. interrogans</i>
<i>L. canicola</i> S 392	<i>L. interrogans</i>
<i>L. polonica</i>	<i>L. borgpetersenii</i>
<i>L. istrica</i> J 20	<i>L. borgpetersenii</i>

Na území České republiky se leptospiróza vyskytuje sporadicky, obvykle s incidencí okolo 0,3 na 100 000 obyvatel. Vyšší výskyt onemocnění v některých letech je spojován s periodickým přemnožením hlodavců a záplavami postihujícími naše území. V roce 1998 byl podle údajů Národní referenční laboratoře zaznamenán pětinasobný vzestup (1,6/100 000) onemocnění leptospirózou po povodních, které v roce 1997 zasáhly území Moravy. Vysoký výskyt byl zaznamenáván i v dalších letech v souvislosti s přírodními katastrofami, které postihly území naší republiky (134,135,136, 137).



Výskyt leptospiróz v České republice

V naší parazitologické laboratoři Ústavu klinické mikrobiologie v Hradci Králové jsme zaznamenali šestinásobně vyšší výskyt laboratorně potvrzených diagnóz leptospirózy v roce 2001, následující po povodni, která postihla severovýchodní Čechy v roce 2000. Díky zvýšené pozornosti, kterou věnujeme i suspektním výsledkům obdržným při sérologických vyšetřeních (hraniční i podhraniční titry protilátek) a zavedení metody polymerázové řetězové reakce (124) do rutinní diagnostiky, pozorujeme zvýšený laboratorní průkaz leptospiróz i v současné době (23,24)

Molekulární biologické metody detekují s vysokou přesností i minimální množství kyseliny deoxyribonukleové patogenních leptospir (10 organismů

v 1 ml vzorku). Výsledky laboratorních metod je třeba vždy hodnotit ve spolupráci s klinickým pracovištěm a v případě potřeby doplnit dalšími vyšetřeními. Metoda polymerázové řetězové reakce prokazuje DNA patogenních leptospir v různých vzorcích (124) biologického materiálu (plazma, likvor, moč, bronchoalveolární laváž apod.) již v časných fázích onemocnění.

Sérologické vyšetření metodou mikroaglutinace-lýzy (mikroskopický aglutinační test) umožní sledovat dynamiku tvorby protilátek i přesné určení sérovaru leptospiry, která onemocnění vyvolala (87). **Protilátky jsou prokazatelné zhruba za týden až 14 dní po infekci.** Mikroskopický aglutinační test používá jako antigeny živé kmeny našich nejčastěji se vyskytujících patogenních leptospir. V přítomnosti protilátek v séru dochází ke shlukování jednotlivých leptospir, popř. k jejich lýze, často pak ke kombinaci obou projevů (131, SOP – úsek parazitologie, ÚKM). Na základě vlastních dlouholetých zkušeností s laboratorní diagnostikou leptospirových infekcí se domníváme, že řada onemocnění není diagnostikována včas, anebo se na leptospirozu nemyslí a onemocnění zůstane skryto pod jinou diagnózou („horečka nejasné etiologie“, „aseptická meningitida“, atypická pneumonie apod.).

Léčba leptospiroz spočívá, kromě terapie symptomatické, zaměřené na kompenzaci poruchy funkce jater, ledvin, srdce, plic a eventuálně dalších orgánů, v podávání antibiotik. Nejčastěji se pro léčbu používají preparáty beta-laktamové řady, eventuálně doxycyklin po dobu 2 – 3 týdnů. Při těžkém průběhu onemocnění jsou antibiotika podávána intravenózně.

I v období rekonvalescence je třeba provádět kardiologické a oční vyšetření vzhledem k možnosti výskytu pozdních následků (myokarditidy, uveitidy a iridocyklitidy) **a z těchto důvodů je také žádoucí správné určení etiologického agens onemocnění (62).**

Z důvodů mnoha obtíží (problémy při hodnocení sérologických reakcí, obtížná kultivace a další), které vznikají při diagnostice leptospirozy jsme zavedli do laboratorní praxe vysoce citlivou, specifickou a rychlou metodu detekce DNA patogenních leptospir pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) (6, 52, 92, 102).

Metoda PCR pro průkaz leptospir v biologickém materiálu byla vypracována a zavedena do rutinního provozu na společném pracovišti ÚKBD a ÚKM (Laboratoř molekulárně biologických metod) Fakultní nemocnice v Hradci Králové v roce 2002. Výsledek laboratorního vyšetření při leptospirové infekci je limitován správnou klinickou indikací včetně dodržení postupu při odběru biologického materiálu.

Důležité je dodržet pravidlo, že odběr biologického materiálu musí být proveden co nejdříve po začátku klinických příznaků, ještě před zahájením léčby antibiotiky a nebo co nejdříve po jejím zavedení.

V každém případě je nutná vzájemná spolupráce a informovanost klinických i laboratorních pracovníků o stavu pacienta a o možnostech i úskalích laboratorních metod a hodnocení jejich výsledků.

♠

CÍLE PRÁCE

- ❖ Zavedení a rozpracování molekulárních biologických metod (PCR) do diagnostiky v parazitologické praxi. Vypracování standardních operačních postupů.
- ❖ Modifikace a standardizace polymerázové řetězové reakce pro extrahumánní genom vybraných infekčních agens:
 - Toxoplasma gondii*
 - Entamoeba histolytica*
 - Leptospira sp.* (patogenní sérovary)
- ❖ Výběr oligonukleotidových primerů pro průkaz DNA *Toxoplasma gondii* (ze dvou oblastí genomu), *Entamoeba histolytica* a *Leptospira species* (patogenních sérovarů) metodou PCR.
- ❖ Vypracování, optimalizace a standardizace metodického postupu PCR pro *T. gondii*, *E. histolytica* a *Leptospira sp.* pro laboratorní diagnostiku na našem pracovišti.
- ❖ Vyhodnocení výsledků metod PCR a porovnání s klasickou sérologickou diagnostikou (KFR, ELISA metody, mikroaglutinace-lýza) pro jednotlivá infekční agens.
- ❖ Návrh optimálního laboratorního algoritmu (Standardní operační postup) pro diagnostiku infekcí vyvolaných *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica* a *Leptospira sp.* v jednotlivých skupinách pacientů.
- ❖ Zpracování a statistické zhodnocení přínosu molekulárních biologických metod (PCR) pro diagnostiku nálezů v parazitologické laboratoři Ústavu klinické mikrobiologie se zaměřením na diagnostiku toxoplazmózy, amebózy a leptospirových infekcí.

♠

MATERIÁL A METODY

Průkaz *Toxoplasma gondii*:

1. Odběr a uchování biologického materiálu:

Vyšetření polymerázovou řetězovou reakcí na průkaz DNA *T. gondii* se provádí z nesrážlivé krve (s přídavkem EDTA nebo citrátu sodného), u gravidních žen z plodové vody (eventuálně z fetální krve) a z krve nesrážlivé. PCR lze provést v jakémkoli biologickém materiálu, např. nitrooční tekutině, bioptickém materiálu, likvoru atd.

Na vyžádání se provádí rovněž biologický pokus na zvířeti, který zajišťuje Národní referenční laboratoř pro toxoplazmózu SZÚ v Praze. Pro biologický pokus odpipetujeme z celkového množství 5 ml plodové vody a ihned odešleme do NRL.

Vyšetření PCR je prováděno z 10 ml plodové vody a minimálně 2 ml nesrážlivé krve. Do provedení PCR reakce je materiál uchováván v chladu, a nezmrazuje se. Pokud není materiál zpracován do 24 hod, je nutné, aby byl skladován při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, protože při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zůstávají vzorky stabilní. Před uložením biologického materiálu do mrazícího boxu je z plné krve třeba odseparovat leukocyty, které jsou zmrazeny samostatně (2,3).

Ze všech vzorků biologického materiálu musí být před vlastním provedením PCR reakce nejprve izolována deoxyribonukleová kyselina prvoka *T. gondii* (47,54,55).

2. Polymerázová řetězová reakce pro průkaz DNA *Toxoplasma gondii* – vlastní modifikace

Izolace DNA *T. gondii* ze vzorků biologického materiálu:

Nesrážlivá krev:

- provede se separace leukocytů z plné krve (66)
- následuje izolace DNA z leukocytů, pouze v případě hemolytické krve nebo velmi malého množství se izoluje DNA z plné krve kitem QIAamp DNA mini Kit (firmy Qiagen) (37,35,57,66,71)

Fetální krev – většinou malé množství, proto je obvykle zpracována plná krev; - izolace DNA z plné krve kitem QIAamp DNA mini Kit (firmy Qiagen)

Plodová voda – min. 5 ml plodové vody je nutno centrifugovat (2000 ot./min, 10 minut), supernatant odstranit a vzniklou peletu (sediment) použít při izolaci DNA. V případě příměsi krve v sedimentu je třeba peletu 1-2x promýt 1 ml PBS a znovu za stejných podmínek centrifugovat. Izolace DNA se provádí kitem QIAamp DNA mini Kit (firmy Qiagen) (51).

Tkáň – izolace DNA z tkání se provádí metodou fenol-chloroformové extrakce (18,19,84,97).

T. gondii - tachyzoiti (k přípravě pozitivních kontrol PCR) - izolace DNA je možná lyzačním roztokem s proteinázou K, alkalickou lýzou nebo kitem QIAamp DNA mini Kit (firma Qiagen).

Laboratorní provedení PCR

Výběr primerů

Primery pro PCR reakci k detekci DNA *Toxoplasma gondii* jsme vybrali ze tří oblastí:

- ✘ gen, který kóduje významný povrchový protein P-30, v genomu *T. gondii* je v jedné kopii. Sekvence byly publikovány pod označením DS 29, DS 30, DS 38 a DS 39, reakce je provedena jako nested PCR (114).

Primery pro PCR reakce byly syntetizovány firmou Generi Biotech Česká republika a dodávány v lyofilizovaném stavu.

DS 29 5´TTG CCG CGC CCA CAC TGA TG (primer P 31)

DS 30 5´CGC GAC ACA AGC TGC GAT AG (primer P 32)

DS 38 5´CGA CAG CCG CGG TCA TTC TC (primer P 33)

DS 39 5´GCA ACC AGT CAG CGT CGT CC (primer P 34)

Délka amplifikovaného úseku (produktu) je 914 bp s primery DS 29 a DS 30; respektive konečný produkt s primery Ds 38 a DS 39 má 522 bp.

- ✘ gen B1 (neznámá funkce), repetitivní v genomu 25-50x (106,132), někteří autoři uvádějí 35x (105). Sekvence byly publikovány pro hemi - nested PCR pod označením TM1, TM2, TM3.

TM 1 5´ GAG AGG TCC GCC CCC ACA AG

TM 2 5´ CTG CTG GTG CGA CGG GAG TG

TM 3 5´ CAG GAG TTG GAT TTT GTA GA

Délka produktu je 619 bp, resp. konečná délka je 362 bp.

- ✘ gen TGR 1E – mnohonásobná repetitivní sekvence (30-35 x). Reakce byla publikována jako standardní PCR s oligonukleotidovými sekvencemi označenými T1 a T2 (29, 82)

Délka amplifikovaného úseku je 191 bp.

T1 5´ATG GTC CGG CCG GTG TAT GAT ATG CGA T – 3´

T2 5´TCC CTA CGT GGT GCC GCA TTG CCT – 3´

Optimalizace PCR metod pro průkaz DNA *Toxoplasma gondii*

Testování vybraných prumerů s virulentním kmenem *Toxoplasma gondii*

Pro přípravu PCR metody na detekci DNA *Toxoplasma gondii* z biologického materiálu od pacientů byl získán virulentní kmen *T. gondii* z Národní referenční laboratoře pro toxoplazmózu v SZÚ Praha. Virulentní kmen byl pasážován na vnímavých laboratorních zvířatech – bílé myši (36, 54, 63). Přibližně 0,3 ml ascitické tekutiny obsahující tachyzoity z předchozí pasáže bylo bezprostředně po odběru přeneseno do dutiny břišní další myši a vždy po 2-5 dnech byla myš usmrcena a z dutiny břišní odsáta sterilní injekční stříkačkou vytvořená ascitická tekutina s živými namnoženými tachyzoity *Toxoplasma gondii*.

Stanovení počtu tachyzoitů *T. gondii* použitých při přípravě PCR

Ascitická tekutina z dutiny břišní právě usmrcené myši byla naředěna PBS. Počet tachyzoitů v 1 ml testovaného vzorku byl stanoven počítáním v Bürkerově komůrce dle metodiky pro stanovení počtu leukocytů.

Izolace DNA z tachyzoitů *Toxoplasma gondii*

1. Fenol-chloroformová metoda izolace DNA
2. Kolonky firmy Qiagen s lýzou pomocí proteinázy K
3. Použití selekčního lyzačního pufru k odstranění erytrocytů – s perspektivou vyšetřování materiálu s krvinkami (plná krev) (3)

Stanovení poměrů objemů reakční směsi pro PCR (Master Mixu) a objemu vyizolované DNA, teplotní profil reakcí

A. Reakce pro oblast genu P 30.

1. stupeň nested PCR

Celkový objem reakční směsi (Master Mixu) a vyizolované DNA byl empiricky stanoven na 25 μl .

Složení reakční směsi (pro 1 vzorek):

- pufr obsahující 1,5 mmol Mg^{2+} : 2,5 μl pro 1 vzorek
- DNTPs 2,5 mmol/litr : 2,0 μl pro 1 vzorek
- primer P 31 v koncentraci 10 pmol/1 μl : 1,25 μl pro 1 vzorek
- primer P 32 v koncentraci 10 pmol/1 μl : 1,25 μl pro 1 vzorek
- Taq DNA polymeráza 1 U / 0,2 μl : 0,2 μl pro 1 vzorek

Reakční směs pro jeden vzorek obsahuje 7,2 μl „směsi“ a 12,8 μl destilované vody (dále jen voda) k doplnění objemu na 20 μl .

Směs byla testována nejdříve na izolované DNA (kolonky Qiagen) ve vysoké koncentraci (ascitická tekutina usmrčené infikované myši byla ředěna PBS 1 : 100), abychom vyzkoušeli, že směs amplifikuje oblast genu P-30.

Optimalizace množství templátu a reakční směsi pro PCR

Vz.č.	směs	templát	voda
1	20 μl	5 μl	-
2	20 μl	3 μl	2 μl
3	20 μl	1 μl	4 μl
4	20 μl	-	5 μl

Vysvětlivky: jednotné množství směsi a různá množství templátu (izolované DNA) vložené do reakce, (voda=doplnění jednotného objemu)

Cykler: 95 ° C po dobu 5 minut;(95 ° C / 1 min ; 60 ° C/ 1 min; 74° C / 3 min;)
30 cyklů; 4 ° C do vyndání z cyklu.

2. stupeň nested PCR

Složení reakční směsi:

- pufr 1,5 mmol Mg ²⁺ :	2,50 μl
- dNTP :	2,00 μl
- primery P 33 :	1,25 μl
- primery P 34 :	1,25 μl
- Taq DNA polymeráza 1U/0,2	0,20 μl

Stanovení množství templátu pro 2. stupeň nested PCR:

1. test s 5 μl templátu – silný specifický proužek a několik nespecifických
2. test se 3 μl templátu – silný specifický proužek a slabší nespecifické.
3. test s 1 μl templátu – slabý specifický proužek, bez nespecifických reakcí.

Výsledná reakční směs pro jeden vzorek obsahuje:

7,2 μl směsi + 12,8 μl vody.

Do všech PCR reakcí vkládáme 23 μl reakční směsi a 2 μl templátu z 1. stupně nested PCR.

Cykler: 95 ° C po dobu 5 minut (95 ° C / 1 min ; 60 ° C / 1 min; 74° C / 3 min;) 30 cyklů; 4 ° C do vyndání z cykleru.

Optimalizace reakčních teplot byla provedena standardním způsobem na teplotním gradientu. Výsledný teplotní profil reakce: 94 ° C / 4 minuty; - 30x (94° C / 30 sec; 62 ° C / 50 sec; 72° C / 60 sec); 72 ° C / 10 minut; 4 ° C do vyjmutí z cykléru.

Délky produktu: 1. stupeň nested PCR 914 bp

2. stupeň nested PCR 522 bp

B. Polymerázová řetězová reakce pro oblast genu TGR 1E

Standardní PCR

Celkový objem reakční směsi a vyizolované DNA jsme stanovili na 25 μ l.

Složení reakční směsi (pro 1 vzorek):

- pufr Gibco (bez Mg^{2+})	2,5 μ l
- roztok Mg^{2+}	2,5 μ l
- dNTPs	2,0 μ l
- primery T 1	1,0 μ l
- primery T 2	1,0 μ l
- polymeráza Gibco	0,2 μ l
- voda	10,8 μ l
- vyizolovaná DNA	5 μ l

Teplotní profil prvního testování : 94 ° C / 3 min; - 94° C / 30 sec; 60 ° C / 30 sec; 72 ° C / 30 sec; závěrečná extenze 72 ° C / 7 min; 4 ° C do vyjmutí z cykléru, 40 cyklů.

Ověření citlivosti PCR reakce bylo provedeno testováním DNA izolované z tachyzoitů *T. gondii* (počítáno v Bürkerově komůrce vždy 3x a stanoven průměr daného ředění) v následujících ředěních:

- a) 10^6 / 1 ml
- b) 10^5 / 1 ml
- c) 10^4 / 1 ml
- d) 10^3 / 1 ml
- e) 10^2 / 1 ml

Na téže ředicí řadě jsme provedli testování izolačních metod.

- Izolace lyzačním roztokem s proteinázou K
- Izolace extrakčním puftrem s NaOH
- Izolace pomocí izolačních kolon QIAamp Mini Kit firmy Qiagen

Výsledky testování ředění tachyzoitů a tří typů izolace DNA:

Pozitivní reakce byla prokázána při všech typech izolace DNA v ředící řadě do 10^2 tachyzoitů / 1 ml. Z tohoto důvodu jsme provedli další ředění tachyzoitů *Toxoplasma gondii*:

Ředící řada 10^2 tachyzoitů v 1 ml až 10^{-1} v 1 ml

Číslo Vzorku	Způsob izolace DNA	Ředění tachyzoitů	Výsledek PCR reakce
1.	A	10^2	++
2.	A	10^1	++
3.	A	1	++
4.	A	10^{-1}	-
Voda	Neg. kontrola	-	-
5.	B	10^2	++
6.	B	10^1	++
7.	B	1	++
8.	B	10^{-1}	-
Voda	Neg. kontrola	-	-
9.	C	10^2	++
10.	C	10^1	++
11.	C	1	+
12.	C	10^{-1}	-
Voda	Neg. kontrola	-	-

Vysvětlivky: A = lyzační pufr s proteinázou K, B = extrakční pufr s NaOH, C = izolace na kolonách firmy Qiagen.

Závěr testování: při použití izolace pomocí kolon firmy Qiagen dosahuje reakce meze detekce 1 tachyzoit v 1 ml tekutého biologického materiálu, tedy jednotlivé tachyzoity. Mez detekce, složení reakční směsi i teplotní profil reakce je vzhledem k povaze vyšetření dostačující.

Standardní operační postup pro oblast genu TGR1E

(zkráceno)

Po optimalizaci PCR reakce byla metoda zavedena a je používána pro rutinní diagnostiku *T. gondii* přímou detekcí DNA prvoka v následujícím provedení:

Izolace DNA:

DNA *T. gondii* je izolována z nesrážlivé krve, fetální krve a amniové tekutiny pomocí kolonek QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) a z bioptických materiálů fenol chloroformovou extrakcí.

Amplifikace TGR1E genu

(multiplex PCR s koamplifikací genu pro humánní beta globin)

Sekvence použitých primerů:

TGR1E-1 5'- ATG GTC CGG CCG GTG TAT GAT ATG CGA T- 3'

TGR1E-2 5' - TCC CTA CGT GGT GCC GCA TTG CCT – 3'

Pro kontrolu inhibice polymerázy byla použita koamplifikace části beta globinového genu.

Sekvence použitých primerů:

Primer beta-globin 1: IC329-1 5 ACA GAA CTG TGT TCA CTA GC-3

Primer beta-globin 2: IC329-2 5 CAT CAG GAG TGG ACA GAT CC-3

Rozpis amplifikační směsi pro PCR (gen TGR 1E)

Pufr GIBCO 10 x konc.	2.5 µl
Mg⁺² 25 mM	2.5 µl
dNTPs 2,5 mM	2 µl
Primer TGR1E 1 (10 pmol/µl)	1 µl
Primer TGR1E 2 (10 pmol/µl)	1 µl
Primer beta – globin 1 (10 pmol/µl)	1 µl
Primer - beta globin 2 (10 pmol/µl)	1 µl
Taq DNA polymeráza GIBCO 1 U (5 U/µl)	0.2 µl
Voda ad 20 µl	8.8 µl

Pro amplifikaci DNA je použito 20 µl reakční směsi a 5 µl roztoku vyizolované DNA. Reakce probíhá ve zkumavkách určených pro amplifikaci v cyklu.

Teplotní profil PCR:

- počáteční denaturace: 94°C/3 min;
- 40 cyklů (94°C/30 sec, 60°C/30 sec, 72°C/30 sec);
- konečná extenze 72°C/ 7 min;
- 4 °C do vyjmutí z cyklu.

C. Polymerázová řetězová reakce pro oblast genu B1

Heminested PCR (106)

Primer TM1 (1 pmol/1 μ l) a primer TM2 (10 pmol/1 μ l) se používají k předamplifikaci – v první PCR, proto je koncentrace primeru TM1 nižší. Primery TM2 a TM3 slouží jako primery ve druhé následné amplifikaci konečného produktu. Jejich koncentrace je již standardní. Uspořádání reakce: všechny primery jsou vloženy na začátku reakce a rozdílné teploty annealingu umožňují jejich postupné zapojení do reakce (1. stupeň TM1 a TM2 při 65 °C a TM2 a TM3 při 55 °C).

Polymerázovou řetězovou reakci pro detekci DNA *T. gondii* z oblasti genu B1 jsme připravili dle literárních pramenů (106,127) a na základě předchozích experimentů a získaných zkušeností. Oproti údajům v literatuře jsme zmenšili objem reakce na 25 μ l a postupně testovali polymerázu Taq DNA TaKaRa, Taq DNA TaKaRa s protilátkou pro „Hot start“ a polymerázu Gibco. Reakce s použitím Taq DNA TaKaRa polymerázy s protilátkou i bez ní vykazala stejné výsledky, při použití polymerázy Gibco byla detekce DNA *T. gondii* o řád nižší. Z těchto důvodů bylo rozhodnuto pracovat dále pouze s Taq DNA TaKaRa polymerázou.

Při testování tří postupů izolace DNA (lyzační pufr s proteinázou K, extrakční pufr s NaOH, izolace na kolonách firmy Qiagen) bylo dosaženo nejlepších výsledků s izolací DNA pomocí kolonek QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN).

Standardní operační postup pro oblast genu B1

(zkráceno)

Izolace DNA: laboratorní postup stejný jako v případě TGR1E genu.

Amplifikace B1 genu

Amplifikace probíhá formou one-tube hemi-nested PCR.

Sekvence použitých primerů:

TM1 5' -GAG AGG TCC GCC CCC ACA AG 3'

TM2 5' - CTG CTG GTG CGA GGG GAG TG 3' Produkt 619 bp

TM3 5' - CAG GAG TTG GAT TTT GTA GA 3' Produkt 362 bp

Reakce je prováděna s 20 μ l reakční směsi a 5 μ l vyizolované DNA v PCR zkumavce.

Rozpis amplifikační směsi:

Pufr TaKaRa 10 x konc. (včetně 15 mM Mg²⁺)	2.5 μl
dNTPs 2,5 mM	2 μl
Primery (1 pmol/ μl) TM1	0.25 μl
(10 pmol/ μl) TM2	0.25 μl
(10 pmol/ μl) TM3	2.5 μl
Taq DNA TaKaRa 1. U	0.2 μl
Voda ad 20 μl	12.3 μl

Teplotní profil PCR:

- počáteční denaturace: 95°C/3 min;
- 30 cyklů (94°C/30 sec, 65°C/30 sec, 72°C/60 sec);
- konečná extenze 72°C/ 10 min;
a reakce ihned pokračuje
- 30 cyklů (94°C/30 sec, 55°C/30 sec, 72°C/60 sec); konečná extenze 72°C 10 min;
- 4 °C do vyjmutí z cykléru

Detekce produktů PCR reakcí (P 30, TGR1E, B1):

TGR1E - elektroforetické rozdělení v 3 % agarózovém gelu; barvení ethidium bromid; vizualizace UV světlo; produkt o velikosti 191 bp.

Beta globin – společně s TGR1E; produkt o velikosti 329 bp.

B1 – elektroforetické rozdělení ve 2% agarózovém gelu; barvení ethidium bromid; vizualizace UV světlo, produkt o velikosti 362 bp.

P30 - elektroforetické rozdělení ve 2% agarózovém gelu; barvení ethidium bromid; vizualizace UV světlo, produkt o velikosti 522 bp.

Velikost fragmentů je určována srovnáváním s DNA standardou (Marker XIII, Roche).

Citlivost metod: mez detekce pro optimalizované PCR – metody označené A,B,C

1 – 10 tachyzoitů / ml

Interní kontrola kvality (pro všechny PCR reakce):

V každé provedené sérii musí být vzorek označený jako pozitivní kontrola „KO+“, který obsahuje vyizolovanou DNA kmene *Toxoplasma gondii* v přibližné koncentraci 10-100 tachyzoitů/ml. Tato pozitivní kontrola slouží jako kontrola amplifikace. Kontrola meze detekce je prováděna amplifikací DNA *T. gondii* izolované z množství 1-10 tachyzoitů. Další kontrola je vzorek, ve kterém je templátová DNA nahrazena sterilní vodou - negativní kontrola - „KO-“, a vkládá se rovněž do každé série vyšetření (prevence falešně pozitivních výsledků).

Inhibiční kontrola: používá se koamplifikace části beta globinového genu probíhající současně s amplifikací oblasti TGR1E genu (multiplex PCR).

Externí kontrola kvality pro průkaz DNA *Toxoplasma gondii* (46):

Evropská společnost pro Kontrolu kvality doporučuje od roku 2003 zavedení kontroly kvality v molekulární diagnostice (QCMD). V roce 2004 byla poprvé zavedena externí kontrola Quality Control for Molecular Diagnostics for DNA *Toxoplasma gondii*. Obdrželi jsme a zpracovali panel 6 vzorků o různých koncentracích od 1 000 do 5 Tg/ml (*T. gondii* v 1 ml) v plodové vodě.

3. SÉROLOGICKÉ METODY V DIAGNOSTICE **TOXOPLAZMÓZY**

Reakce vazby komplementu

Vyšetření je prováděno standardní metodou, dle SOP laboratoře, z krevního séra, popř. plodové vody v mikrotitračních destičkách. Sérum je ředěno veronalovým puftrem a inaktivováno při 56 ° C po dobu 30 minut. Postupně přidáme vytitrované složky reakce: antigen, komplement a hemolyzin dle návodu výrobce (Sevapharma Praha). Současně vkládáme do reakce kontrolu antikomplementarity séra, kontrolu antigenu, kontrolu komplementu a krvinek.

Vyšetřované sérum je ředěno geometrickou řadou od 1:2 do 1:1024. Po závěrečné inkubaci provedeme hodnocení: obecně za hraniční hodnotu považujeme titer 1:32.

Podle diagnózy, věku a pohlaví pacienta doplníme další ELISA vyšetření IgG, IgM, IgA, IgE, popř. aviditu ve třídě IgG imunoglobulinů.

EIA testy pro stanovení protilátek ve třídách IgM, IgA, IgE, IgG a aviditu ve třídě IgG.

Pro stanovení protilátek proti *T. gondii* byly použity EIA testy firmy Test – Line s.r.o., Clinical Diagnostics se sídlem v Brně.

EIA Toxoplasma IgM – stanovení imunoglobulinů ve třídě IgM

Princip testu: Na vnitřní povrch jamek mikrotitrační destičky jsou navázány zvířecí protilátky proti lidskému IgM. Pokud jsou ve vyšetřovaném vzorku přítomny imunoglobuliny třídy IgM, navážou se na protilátky zvířecí. V dalším kroku reakce jsou volné přebytečné protilátky vymyty promývacím roztokem. Následuje inkubace s roztokem traceru (antigen *T. gondii* + monoklonální protilátka proti povrchovému proteinu P 30 *T. gondii*, značená křenovou peroxidázou). V této části reakce se na protilátky proti *T. gondii* ze vzorku naváže antigen společně s antitoxoplazmovou protilátkou proti P 30 značenou peroxidázou (konjugát). Nenavázaný tracer je odstraněn

promýváním jamek a peroxidázová aktivita je detekována zbarvením roztoku aplikovaného substrátu. Pozitivita se projeví modrým zbarvením, které se po zastavení reakce (kyselina sírová) mění ve žlutou. Intenzita žlutého zbarvení je měřena fotometrem při 450 nm. Výsledek reakce je hodnocen po výpočtu Indexu positivity vzorku.

Index positivity (IP) = absorbance vyšetřovaného vzorku dělená průměrnou absorbancí cut-off kontrolního séra výrobce.

Vzorky s indexem positivity nižším než 0,9 jsou hodnoceny jako negativní, 0,9 – 1,1 jako hraniční a nad 1,1 jako pozitivní.

EIA Toxoplasma IgA, IgE – stanovení imunoglobulinů ve třídě IgA, IgE

Princip testů a jejich hodnocení jsou shodné s EIA testem pro stanovení protilátek ve třídě IgM, pouze na vnitřní povrch jamek jsou navázány zvířecí protilátky proti lidskému IgA, respektive IgE.

EIA Toxoplasma IgG – stanovení imunoglobulinů ve třídě IgG

Princip testu: Na vnitřní povrch jamek mikrotitrační destičky je navázán antigen *Toxoplasma gondii*. Po aplikaci vzorků a kontrolních sér dojde k navázání specifických IgG protilátek na antigen. Promýváním jsou přebytky nenavázaných protilátek odstraněny. Následuje aplikace konjugátu – zvířecí protilátka proti lidskému IgG značená křenovou peroxidázou, dochází k vazbě protilátky na lidské IgG. Nenavázaný konjugát je odstraněn promytím a peroxidázová aktivita je detekována po přidání substrátu zbarvením roztoku. Vybarvení je vzhledem k TMB (tetramethylbenzidinu) v roztoku kompletního substrátu modré, a po zastavení reakce se mění na žlutou. Intenzita zbarvení je měřena na fotometru pro mikrotitrační destičky při 450 nm. Index positivity je stanoven stejně jako u protilátek ve třídách IgM, IgA a IgE.

Hodnocení výsledků: IP nižší než 0,800 = negativní;
0,800 – 1,000 = hraniční;
vyšší než 1,001 = pozitivní.

Metody průkazu *Entamoeba histolytica*

1. Vzorky biologického materiálu

V případě intestinální formy onemocnění jsou odebírány vzorky od pacientů ze stolice, při ostatních formách onemocnění z postiženého orgánu (nejčastěji z jater). Vlastní příprava vzorků a provedení reakce se liší podle typu vyšetřovaného materiálu. V každém případě musí být ze vzorku materiálu provedena izolace DNA *E. histolytica* podle příslušného postupu.

2. Polymerázová řetězová reakce pro průkaz DNA *Entamoeba histolytica* – vlastní modifikace

Izolace DNA *E. histolytica*

DNA prvoka byla izolována z jaterního abscesu člověka (viz. kapitola Výsledky a diskuse pacient č. 8), u něhož byla stanovena diagnóza amébozy. K izolaci jsme použili jednak fenol-chloroformovou metodu a dále byla provedena izolace DNA *E. histolytica* pomocí kolonek QIA Amp DNA Minikit (250) firmy QIAGEN. Na základě porovnání obou způsobů extrakce bylo zjištěno, že pro získání DNA lépe vyhovuje postup „Tissue protocol“ komerčního kitu QIAampDNA Mini Kit (250) firmy QIAGEN.

Provedení reakce Multiplex nested PCR podle Evangelopoulose (40)

- optimalizace metody pro rozlišení *E. histolytica* a *E. dispar*.

Primery (Generi Biotech):

Vnější primery pro 1. stupeň (společná oblast pro *E. histolytica* i pro *E. dispar*):

E₁ (5' -TGC TGT GAT TAA AAC GCT 3'),

E₂ (5' -TTA ACT ATT TCA ATC TCG G 3')

Amplifikace fragmentu délky 1076 bp.

Vnitřní primery pro 2. stupeň (specifické pro *E. histolytica*):

Eh-L (5' -ACA TTT TGA AGA CTT TAT GTA AGT A 3')

Eh-R (5' -CAG ATC TAG AAA CAA TGC TTC TCT 3')

Amplifikace fragmentu délky 427 bp.

Vnitřní primery pro 2. stupeň (specifické pro *E. dispar*):

Ed-L (5' -GTT AGT TAT CTA ATT TCG ATT AGA A 3')

Ed-R (5' -ACA CCA CTT ACT ATC CCT ACC 3')

Amplifikace fragmentu délky 195 bp.

Pracovní koncentrace primerů: 10 pmol/μl

Reakční směs (MasterMix-MM) pro 1. stupeň PCR: 3 μl vyizolované DNA + primery po 1,25 μl + 2,5 μl 10x koncentrovaného PCR pufru Invitrogen 2,5 μl + 1,5 mM Mg²⁺ + dNTPs (2,5 mM) 2 μl + 0,1 μl Taq DNA polymerázy (5 U/μl) - GIBCO BRL, Rockville, voda 11 μl.

Úvodní denaturace 5 min 94 ° C; 45 cyklů (1 min 94 ° C/1,5 min 47 ° C/ 2,5 min 72 ° C); finální elongace 72 ° C 7 min; v cykléru DYAD – 200.

Reakční směs (MasterMix-MM) pro 2. stupeň PCR: DNA 3 μl + primery 2,5 μl + 10x koncentrovaný pufr Invitrogen 2,5 μl + 1,5 mM Mg²⁺ + dNTPs (2,5 mM) 2 μl + 0,1 μl Taq DNA polymerázy (5 U/μl) - GIBCO BRL + voda 14 μl.

Podmínky reakce: úvodní denaturace 5 min 94 ° C; 45 cyklů (1min 94 ° C/ 1,5 min 58 ° C/ 2,5 min 72 ° C); finální elongace 72 ° C 7 min; v cykléru DYAD – 200.

DNA izolovaná z jaterního abscesu byla ředěna desítkovou řadou. V multiplex nested PCR pro DNA *E. histolytica* jsme dosáhli výsledků uvedených v následující tabulce.

Tab. Průkaz DNA *Entamoeba histolytica* (izolace z jaterního abscesu) metodou multiplex nested PCR

Ředění DNA	Konc.	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	voda
Výsledek PCR	++++	++++	+++	+++	++	-	-	-

Závěr: DNA *Entamoeba histolytica* byla detekována ještě v ředění 10⁻⁴.

Optimalizace teploty annealingu v prvním stupni PCR (pro zvýšení citlivosti): teplotní rozmezí 43,8 - 45,3 - 47,0 - 48,4 - 49,5 - 50,2 ° C. V prvním stupni PCR se nejlépe osvědčila teplota annealingu 49,5 ° C.

Optimalizace teploty annealingu ve druhém stupni PCR pro DNA *Entamoeba histolytica*: k testování jsme použili produkty z prvního stupně PCR (annealing 47 °C, i optimalizovaný na 49,5 °C); a zkoušeli teplotní rozmezí 56,3 - 58,0, - 59,4 °C. Změna teploty anealingu ve druhém stupni PCR neovlivnila výsledky a proto byla v reakci použita teplota 58 °C.

Porovnání působení Taq DNA polymerázy (Gibco) a Platinum Taq DNA polymerázy; 2. stupeň multiplex nested PCR DNA *Entamoeba histolytica* je uvedeno v následující tabulce.

Ředění DNA	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	voda
Gibco	+++	+++	--	--	--	--
Platinum	++++	++++	++++	--	--	--

Srovnání působení Taq DNA polymerázy (Gibco) a Platinum Taq DNA polymerázy s protilátkou firmy Invitrogen („hot start“ PCR); 2. stupeň multiplex nested PCR DNA *Entamoeba dispar* je uvedeno v následující tabulce.

Ředění DNA	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	voda
Gibco	+++	+++	--	--	--	--
Platinum + protilátka	++++	++++	--	--	--	--

Standardní operační postup pro detekci DNA

Entamoeba histolytica / dispar (zkráceno)

Při prvním stupni PCR se používá do reakce celkové množství 25 μ l: 22 μ l reakční směsi + 3 μ l vyizolované DNA. Pro reakci se nejlépe osvědčila Platinum Taq DNA polymeráza.

Složení reakční směsi pro 1. stupeň PCR *E. histolytica / dispar* :

10x konc. pufr Invitrogen 2,5 μ l; Mg^{2+} (25 mM) 1,5 μ l; dNTPs (2,5 mM) 2,0 μ l; Platinum Taq DNA polymeráza (5U/ μ l) 0,1 μ l; primer E₁(10 pmol/ μ l) 1,25 μ l; primer E₂(10 pmol/ μ l) 1,25 μ l; voda 14,0 μ l.

Teplotní profil pro 1. stupeň PCR:

Počáteční denaturace 95 ° C 5 min.; vlastní PCR 45 cyklů: denaturace 95 ° C 1 min.; annealing 49,5 ° C 1,5 min.; elongace 72 ° C 2,5 min.
Závěrečná extenze: 72 ° C 10 minut.

Při druhém stupni PCR se používá 22 μ l reakční směsi + 3 μ l produktu z 1. stupně PCR.

Složení reakční směsi pro 2. stupeň PCR *E. histolytica / dispar*. Pufr Invitrogen 10x koncentrovaný 2,5 μ l; Mg^{2+} (25 mM) 1,5 μ l; dNTPs (2,5 mM) 2,0 μ l; Taq DNA polymeráza (5 U / μ l) 0,1 μ l; primer Eh – L (10pmol/ μ l) 1,25 μ l; primer Eh – R (10pmol/ μ l) 1,25 μ l; primer Ed – L (10pmol/ μ l) 1,25 μ l; primer Ed – R (10pmol/ μ l) 1,25 μ l; voda 11,0 μ l.

Teplotní profil pro 2. stupeň PCR: počáteční denaturace 95 ° C 5 min. Vlastní PCR - 45 cyklů: denaturace 95 ° C 30 sec; annealing 58 ° C 60 sec; elongace 72 ° C 1,5 min. Závěrečná extenze 72 ° C 7 min.

Detekce je prováděna metodou submerzní elektroforézy v 2 % agarózovém gelu za použití velikostního markeru à 50 bp lader a barvení ethidiumbromidem.

Pozitivní kontrola PCR reakce pro *E. histolytica*: DNA v koncentraci 10⁻³

Pozitivní kontrola PCR reakce pro *E. dispar*: DNA v koncentraci 10⁻¹

Negativní kontrola: destilovaná voda

Příprava cyst *Entamoeba dispar* (*E. histolytica*)

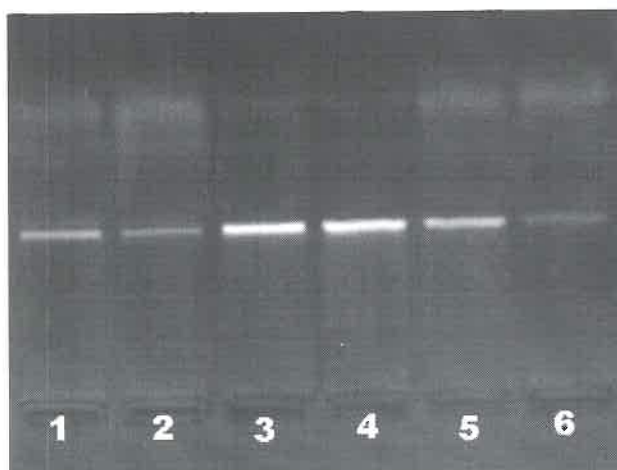
Pro zvýšení citlivosti reakce a odstranění inhibitorů, které se vyskytují ve vzorcích stolic, **jsme zavedli vlastní postup získávání cyst améb ze vzorku vyšetřované stolice a jejich promývání.** Vzorek stolice získaný od pacienta dlouhodobě vylučujícího cysty *Entamoeba dispar* byl zpracován koncentrační metodou dle Fausta. Supernatant se síranem zinečnatým v množství asi 4-5 ml jsme opakovaně promývali (3x-4x) fyziologickým roztokem, centrifugovali při 2500 ot/min po dobu 5 minut, až byl roztok viditelně čirý.

DNA *E. dispar* jsme vyizolovali z cyst pomocí QIAamp DNA MiniKit dle tkáňového protokolu.

Promývání cyst jsme testovali na vzorku stolice s obsahem 2×10^2 cyst.

DNA z cyst po promytí

číslo vzorku	1	2	3	4	5	6
výsledek PCR	+	+	++	++	++	+



Popisy k tabulce č.19 a k obrázku č.20:

1. vzorek č.1 - DNA vyizolovaná ze stolice 1x promyté (2×10^2 cyst)
2. vzorek č.1 - DNA vyizolovaná ze stolice 2x promyté (2×10^2 cyst)
3. vzorek č.1 - DNA vyizolovaná ze stolice 3x promyté (2×10^2 cyst)
4. vzorek č.1 - DNA vyizolovaná ze stolice 4x promyté (2×10^2 cyst)
5. vzorek č.2 - DNA vyizolovaná ze stolice 3x promyté (2×10^2 cyst)
6. pozitivní kontrola ($1,2 \times 10^2$ cyst)

Promývání se osvědčilo k odstranění inhibitorů z povrchu cyst a z fyziologického roztoku, ve kterém jsou cysty vkládány do kolonek k izolaci, proto jsme i nadále postupovali tímto způsobem. Izolace pomocí kolonek se ukázala dostatečně vhodná a jednoduchá.

Ověřili jsme rovněž, jak dlouho a za jakých podmínek lze uchovávat cysty ve fyziologickém roztoku. Testovali jsme uchování při teplotách +4° C a při -20° C, kdy byla výtěžnost DNA o jeden řád nižší.

Určení senzitivity a specificity reakce

Senzitivitu reakce jsme určovali dvěma metodami :

- počítáním cyst ze stolice v Bürkerově komůrce: nejmenší detekovatelné množství je 30-50 cyst v 1 ml F1/1

- určením nejmenšího detekovatelného množství DNA spektrofotometricky
Spektrofotometricky jsme naměřili, že nejmenší detekovatelné množství získané DNA je 7×10^{-4} ng/ml.

Čistota DNA vzorku: *E. histolytica* 2,0 a *E. dispar* 2,2.

Specificitu reakce jsme potvrdili negativním výsledkem detekce DNA s následujícími druhy střevních protozoí: *Giardia lamblia*, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, *Entamoeba hartmanii*, *Iodamoeba bütschlii*.

Inhibiční zkouška: amplifikace beta globinového genu (obvyklým způsobem, viz. SOP laboratoř pro extrahumánní genom).

Metody průkazu *Leptospira species*

1. Odběr biologického materiálu

Při podezření na leptospirovou infekci jsou od pacientů odebírány vzorky biologického materiálu: především moč, krevní plazma a likvor. Důležité je dodržet, pokud je to možné, zásadu odběru vzorků před zahájením antibiotické terapie nebo co nejdříve.

Vyšetření se provádí nejčastěji z krevní plazmy a z moči. V prvních dnech onemocnění lze leptospiry prokázat v krvi. Při průniku do CNS i v mozkomíšním moku.

K vyšetření je nutno poslat alespoň 10 – 15 ml moče, 2 – 5 ml nesrážlivé krve (EDTA nebo citrát), tj. 0,5 – 1,5 ml plazmy, nebo alespoň 1 ml likvoru. Materiál je nutno uchovávat v chladu, příp. při -20°C a zpracovat do 48 hodin, nejlépe však do 24 hodin.

2. Polymerázová řetězová reakce pro průkaz DNA *Leptospira sp.* - vlastní modifikace

Laboratorní provedení:

Výběr primerů

Primery jsme volili pro polymerázovou řetězovou reakci tak, aby bylo možno stanovit v biologickém materiálu přítomnost DNA všech sérovarů patogenních leptospir, které byly dosud izolovány na území České republiky.

Pro sérovary, které patří do genomospecies *L. interrogans* a *L. borgpetersenii* jsme použili dle dostupných literárních pramenů (52,102) primery G1 a G2, které mají tyto sekvence bazí:

G1 (5' -CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT 3')

G2 (5' -GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG 3')

Pro patogenní leptospiry patřící do genomospecies *L. kirschneri*, v našich podmínkách sérovary *L. grippotyphosa* P 125 a *L. grippotyphosa* Ž 6, jsme použili primery B 64-I a B 64 II s následujícími sekvencemi:

B 64-I (5´ -CTG AAT TCT CAT CTC AAC TC 3´)

B 64-II (5´-GCA GAA ATC AGA TGG ACG AT 3´)

Deoxyribonukleová kyselina genomospecies *L. kirschneri* není primery G1 a G2 amplifikována.

Délka fragmentů DNA amplifikovaných pomocí primerů G1 a G2 je 285 bp a délka fragmentů amplifikovaných pomocí primerů B 64-I a B 64-II je 360 bp.

Pro kontrolu inhibice polymerázy používáme amplifikaci části beta globinového genu ve vedlejší reakci.

Sekvence primerů:

IC989-A 5´- ATT TTC CCA CCC TTA GGC TG-3´

IC989-S 5´ - TGG TAG CTG GAT TGT AGC TG-3´

Optimalizace PCR metody pro průkaz DNA patogenních leptospir

Testování primerů na určených laboratorních kmenech *Leptospira species*.

Laboratorní kmeny *Leptospira species*:

K testování zvolených primerů a k optimalizaci metody jsme používali laboratorní kmeny leptospir, které jsou na našem pracovišti (Ústav klinické mikrobiologie, úsek parazitologie) kultivovány pro běžnou diagnostiku metodou mikroaglutinace-lýza. Kvalita kmenů je kontrolována 2x týdně prohlížením v zástinu a kmeny jsou minimálně 1x ročně kontrolovány účastí laboratoře v systému externího hodnocení kvality zajišťovaného Národní referenční laboratoří Státního zdravotního ústavu v Praze.

Laboratorní kmeny patogenních leptospir jsou kultivovány a udržovány v Korthofově mediu obohaceném 5% králíčím séra testovaného

na nepřítomnost protilátek proti patogenním leptospirám. Kmeny jsou pasážovány přibližně jednou za 10 dní. Kultivační teplota je 28° C.

Pro testování specificity připravované PCR reakce jsme z NRL pro leptospiry obdrželi 2 kmeny nepatogenních leptospir: *Leptospira saopaulo* a *Leptospira patoc* I., které jsou kultivovány obvyklým způsobem.

Příprava vzorků testovaných kmenů v biologickém materiálu

Jako základní biologický materiál pro optimalizaci metody jsme zvolili moč, protože při infekci patogenními leptospirami jsou bakterie již po několika dnech v moči přítomny (po kolonizaci ledvin).

Pro průkaz bakterií metodou PCR je moč obecně materiálem, jehož zpracování činí větší potíže (biochemicky agresivní prostředí) a může být limitující pro mez detekce. Z výše uvedených důvodů jsme se rozhodli od počátku testovat průkaz DNA patogenních leptospir v moči (6).

Stanovení počtu leptospir v biologickém materiálu pro PCR reakci.

K počítání spirochét v tekutém mediu se používá Petrof-Hauserova komůrka (k počítání v zástině). Komůrku se nám nepodařilo získat, museli jsme proto zvolit jiné řešení stanovení počtu spirochét v 1 ml tekutého media.

Vyzkoušeli jsme počítání v 10 mikrolitrech media s leptospirami na podložním sklíčku. Kapka media rychle vysychala a 10 mikrolitrů bylo velké a v zorném poli mikroskopu nepřehledné množství. Nakonec bylo přistoupeno k řešení, které při přípravě pozitivních kontrol využíváme i nyní. Do 9 ml pufovaného fyziologického roztoku (PBS) pipetujeme asi 10 - 20 mikrolitrů Korthofova media s dobře narostlým kmenem leptospir a zkumavka je dobře zazátkována gumovou zátkou. Poté je obsah zkumavky mnohonásobně promíchán otáčením dnem vzhůru a zpět. Poloautomatickou pipetou s jednorázovou špičkou pipetujeme 5 mikrolitrů PBS s ředěným kmenem na podložní sklo a lehce rozestřeme do ploché kapky. V této kapce

počítáme spirochéty v jednotlivých zorných polích. Postup je opakován z jedné zkumavky minimálně 5x. Vypočítáme průměr v 5 mikrolitrech a přepočítáme na 1 ml. Tím je získáno výchozí ředění kmene leptospir, a další ředění už je provedeno v PBS ředěním 1:10. Ve zkumavce, kde předpokládáme počet $1 \times 10^2 - 1 \times 10^3$, to znamená asi 1 - 10 leptospir v 5 mikrolitrech, je provedeno kontrolní počítání výše uvedeným způsobem.

Laboratorní kmeny patogenních a nepatogenních leptospir (viz. následující tabulka) byly naředěny v PBS popsáním postupem, spočítána jejich denzita (počet) a dále ředěny 1:10 v čerstvě odebrané moči zdravého člověka.

č. vz.	sérovar	Leptospiry/ 1ml moči	Patogen	Použité primery	výsledek + až +++
1.	<i>L. grip.</i> P 125	280	+	B 64-I/II	++
2.	<i>L. grip.</i> P 125	28	+	B 64-I/II	-
3.	<i>L. grip.</i> P 125	280	+	B 64-I/II	++
4.	<i>L. grip.</i> P 125	28	+	B 64-I/II	-
1.	<i>L. copen.</i> Lebe	600	+	G1 / G2	+++
2.	<i>L. copen.</i> Lebe	60	+	G1 / G2	-
3.	<i>L. copen.</i> Lebe	600	+	G1 / G2	+++
4.	<i>L. copen.</i> Lebe	60	+	G1 / G2	-
5.	<i>L. patoc.</i>	10 000	-	B 64-I/II	-
6.	<i>L. patoc.</i>	10 000	-	G1 / G2	-
7.	<i>L. saopaulo</i>	10 000	-	B 64-I/II	-
8.	<i>L. saopaulo</i>	10 000	-	G1 / G2	-

Použité zkratky: *L. grip.* P 125 = *L. grippotypcosa* P 125

L. copen. Lebe = *L. copenhageni* Lebe

Vysvětlivky: +++ silná reakce, ++ střední reakce, - negativní výsledek

Při tomto pokusu byly primery použity odděleně ve dvou reakčních směsích. Citlivost dosud neoptimalizované reakce byla nízká.

Amplifikace DNA různých kmenů *Leptospira spp.* metodou PCR s oddělenými primery (1. část)

primery	1	2	3	4	5	6
B64-I/II	-	-	++	-	-	+++
G1/2	-	++++	-	++++	++++	-

Amplifikace DNA různých kmenů *Leptospira spp.* PCR s oddělenými primery (1. část)



Vysvětlivky k tabulce a obrázku (1. část): Pro primery B64-I/II, G1/2:

1. negativní kontrola
2. *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava (260 lept./ml moče)
3. *L. grippotyphosa* Ž 6 (320 lept./ml moče)
4. *L. sejroae* M 84 (200 lept./ml moče)
5. *L. copenhageni* Lebe (280 lept./ml moče)
6. *L. grippotyphosa* P 125 (280 lept./ml moče)

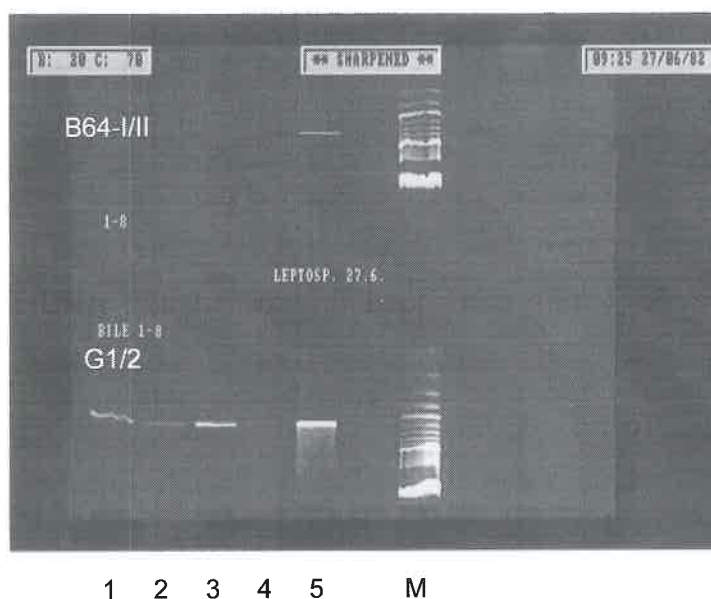
M velikostní marker ā 50 bp (Roche, M XIII)

- ++++ velmi silná pozitivita vzorku
- +++ silná pozitivita vzorku
- ++ střední pozitivita vzorku
- negativní výsledek

Amplifikace DNA různých kmenů *Leptospira* spp. PCR s oddělenými primery (2. část)

primery	1	2	3	4	5
B64-I/II	-	-	-	-	+++
G1/2	+++	++	+++	-	++++

Amplifikace DNA různých kmenů *Leptospira* spp. PCR s oddělenými primery (2. část)



Vysvětlivky k tabulce a obrázku (2. část): Primery B64-I/II, G1/2:

1. *L. istrica* J 20 (520 lept./ml moče)
 2. *L. pomona* Šimon (580 lept./ml moče)
 3. *L. sorex-jalná* (180 lept./ml moče)
 4. negativní kontrola
 5. pozitivní kontrola G1/G2 (*L. copenhageni* Lebe 600 lept/ml PBS)
B64 I/II (*L. grippotyphosa* P 125 (280 lept/ml PBS))
 6. M velikostní marker ā 50 bp (Roche, M XIII)
- ++++ velmi silná pozitivita vzorku
+++ silná pozitivita vzorku
++ střední pozitivita vzorku
- negativní výsledek

Stanovení poměrů objemů reakční směsi pro PCR a objemu vyizolované DNA (optimalizace metody)

V literatuře jsou popsány postupy, kde množství DNA výrazně převyšuje množství reakční směsi, nejčastěji v poměru 40 μ l DNA : 10 μ l reakční směsi (81). Vyzkoušeli jsme PCR reakce s poměry DNA a směsi od 10 μ l DNA + 40 μ l směsi až po 40 μ l DNA + 10 μ l směsi. Optimální výsledek PCR reakce byl dosažen pokud množství DNA převažovalo. Nejvhodnější poměr byl 17 μ l vyizolované DNA a 8 μ l reakční směsi. Další optimalizace reakce už byla prováděna vždy tímto způsobem.

Optimalizace teploty annealingu

Při optimalizaci teploty annealingu byl použit gradientový cyklér DNA Engine DYAD firmy M.J.Research a testovány teploty od 52 do 56°C. Výsledky optimalizace teploty annealingu jsou uvedeny v tabulkách.

Optimalizace teploty annealingu pro PCR s primery G1 a G2

	52 ° C	53 ° C	54 ° C	55 ° C	56 ° C
<i>L.copenhageni</i> Lebe 10 ³	++++	+	++	+++	++
<i>L.copenhageni</i> Lebe 10 ²	++	+	+	+	+

Optimalizace teploty annealingu pro PCR s primery B64-I a B 64-II

	52 ° C	53 ° C	54 ° C	55 ° C	56 ° C
<i>L. grippotyphosa</i> P 125 10 ³	++++	-	++	+++	+++
<i>L. grippotyphosa</i> P 125 10 ²	+++	-	+	+	++

Pro PCR reakci k detekci patogenních leptospir jsme vybrali teplotu annealingu 52 ° C.

Výběr Taq DNA polymerázy pro PCR reakci k detekci DNA patogenních leptospir

V první fázi testování vhodné Taq DNA polymerázy jsme použili polymerázu firem Invitrogen a TaKaRa. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách.

Tab. PCR reakce s Taq DNA polymerázou Invitrogen a TaKaRa, primery B-64-I a B64-II, testovací kmen *L. grippotyphosa* P 125.

Taq DNA polymeráza	Počet leptospir v 1 ml moče				
	10 ⁴	10 ³	10 ²	10-20	0-10
TaKaRa	++	-	-	-	-
Invitrogen	++	++	-	-	-

PCR reakce s Taq DNA polymerázou Invitrogen a TaKaRa, primery G1 a G2, testovací kmen *L. copenhageni* Lebe.

Taq DNA polymeráza	Počet leptospir v 1 ml moče				
	10 ⁴	10 ³	10 ²	10-20	0-10
TaKaRa	++++	+	+	+	-
Invitrogen	+++	++	+	+	-

vysvětlivky k tabulkám

++++ velmi silná pozitivita, +++ silná pozitivita, ++ střední pozitivita, + slabá pozitivita, - negativní výsledek

Ve snaze o zvýšení citlivosti reakce byla dále testována Platinum Taq DNA polymeráza firmy Invitrogen a Taq DNA polymeráza firmy Invitrogen.

Dle výsledků provedených pokusů je citlivost reakce vyšší s Platinum Taq DNA polymerázou.

primery	Taq DNA polymeráza			Platinum Taq DNA polymeráza			
	1	2	3	4	5	6	7
B 64 –I / II	++	+	-	+++	++++	++	-
G1 / G2	++++	++++	+	++++	++++	++	-

Vysvětlivky:

Pro primery B 64 – I / II

1. *L. grippotyphosa* P 125 v počtu cca 2 000 leptospir / 1 ml PBS
2. *L. grippotyphosa* P 125 v počtu cca 100 leptospir / 1 ml likvoru
3. *L. grippotyphosa* P 125 v počtu cca 200 leptospir / 1 ml moči
4. *L. grippotyphosa* P 125 v počtu cca 2 000 leptospir / 1 ml PBS
5. *L. grippotyphosa* P 125 v počtu cca 100 leptospir / 1 ml likvoru
6. *L. grippotyphosa* P 125 v počtu cca 200 leptospir / 1 ml moči
7. negativní kontrola – destilovaná voda

Pro primery G1 / G2

1. *L. copenhageni* Lebe v počtu cca 2 000 leptospir v 1 ml PBS
2. *L. copenhageni* Lebe v počtu cca 200 leptospir v 1 ml likvoru
3. *L. copenhageni* Lebe v počtu cca 250 leptospir v 1 ml moči
4. *L. copenhageni* Lebe v počtu cca 2 000 leptospir v 1 ml PBS
5. *L. copenhageni* Lebe v počtu cca 200 leptospir v 1 ml likvoru
6. *L. copenhageni* Lebe v počtu cca 250 leptospir v 1 ml moči
7. negativní kontrola – destilovaná voda

Pro další možné zvýšení citlivosti PCR reakce jsme testovali Platinum Taq DNA polymerázu společně s protilátkou proti polymeráze (Sigma), tedy tzv „hot start“. V takto sestavené reakci vytvoří protilátka s polymerázou komplex, z něhož se uvolní až při teplotě denaturace. Polymeráza nepůsobí nežádoucím způsobem při nižší teplotě, to znamená před začátkem denaturace. Použití protilátky proti polymeráze nepřineslo lepší výsledky než PCR provedená bez přidání protilátky.

Závěry optimalizace metody PCR pro průkaz patogenních leptospir

Metoda polymerázové řetězové reakce pro průkaz DNA patogenních leptospir byla optimalizována za následujících podmínek:

- Platinum *Taq* DNA polymeráza firmy Invitrogen v koncentraci 1 U na reakci s přidáním hořčíku v obvyklé koncentraci 2 mM.
- Primery G1, G2 a B64-I, B64-II použité v koncentraci 1 μ M každého primeru ve dvou oddělených reakcích.

Složení reakční směsi při použití primerů G1 a G2 pro průkaz sérovarů patogenních leptospir řazených do genomospecies *Leptospira interrogans* a *Leptospira borgpetersenii*

Pufr Invitrogen 10x koncentrovaný	2,5 μ l
Mg ² 25 mM	2,0 μ l
dNTPs 2,5 mM	2,0 μ l
Primer G1 100 pmol / 1 μ l	0,25 μ l
Primer G 2 100 pmol / 1 μ l	0,25 μ l
Platinum <i>Taq</i> DNA polymeráza Invitrogen 5 U / μ l	0,2 μ l
Voda ad 8 μ l	0,8 μ l

Složení reakční směsi při použití primerů B64-I a B 64-II pro průkaz sérovarů patogenních leptospir řazených do genomospecies *L. kirschneri*.

Pufr Invitrogen 10x koncentrovaný	2,5 μ l
Mg ² 25 mM	2,0 μ l
dNTPs 2,5 mM	2,0 μ l
Primer B 64-I 100 pmol / 1 μ l	0,25 μ l
Primer B 64-II 100 pmol / 1 μ l	0,25 μ l
Platinum <i>Taq</i> DNA polymeráza Invitrogen 5 U / μ l	0,2 μ l
Voda ad 8 μ l	0,8 μ l

Do PCR reakce pro detekci DNA patogenních leptospir se k 8 μ l reakční směsi přidává 17 μ l vyizolované DNA leptospir a celkové množství tak tvoří

25 µl. Množství je možné zdvojnásobit a pracovat s poměrem 34 µl DNA a 16 µl směsi. Používali jsme primery o koncentraci 100 pmol/1 µl, aby byl objem směsi co nejmenší.

Optimální teplotní profil PCR:

- počáteční denaturace = 94 ° C po dobu 5 min

- vlastní PCR = 34 x

1. denaturace při 94° C po dobu 45 sec

2. annealing při 52 ° C po dobu 50 sec

3. elongace při 72 ° C po dobu 1 min

- závěrečná extenze = 1. 94° C po dobu 45 sec

2. 52 ° C po dobu 2 min

3. 72 ° C po dobu 20 min

Detekce produktu PCR reakce

Produkty amplifikace oblasti G1/2 genu o velikosti 285 bp, oblasti B64-I/II genu o velikosti 360 bp a oblasti genu pro beta globin o velikosti 989 bp jsou elektroforeticky vizualizovány na 3% agarozovém gelu při barvení ethidium bromidem. K určení délky fragmentů se používá vhodný velikostní marker (např. Marker XIII, firma Roche).

Testování optimálního způsobu uchování biologických vzorků a izolace DNA patogenních leptospir

Materiál

Pro testování PCR reakce k detekci DNA patogenních leptospir jsme používali moč zdravé osoby z našeho pracoviště. Krevní plazma a likvory byly získány z laboratoří ÚKM a vyšetřeny na přítomnost protilátek proti leptospirám metodou MAL a kultivačním průkazem na přítomnost *Leptospira* sp. Výsledky byly v obou případech negativní.

Uchování biologického materiálu

Zjišťovali jsme, jak dlouhou dobu je možno biologický materiál před vlastní izolací uchovávat, aby nedošlo k degradaci DNA v nevhodném tekutém prostředí a tím ke snížení citlivosti PCR reakce.

Materiálem, který je z výše uvedeného hlediska nejproblematictější je moč, v jejímž agresivním prostředí, často kontaminovaném rychle rostoucími bakteriemi jsou leptospiry a popřípadě uvolněná DNA nejvíce ohroženy.

Izolaci DNA patogenních leptospir a následně její detekci metodou PCR jsme z těchto důvodů prováděli ze vzorku moči s přidanými kmeny leptospir ihned, a dále po skladování 12, 24, 48 a 72 hodin při teplotě 5 °C. Za 48 hodin byly vzorky ještě pozitivní, ale za 72 hodin již negativní.

Zkoušeli jsme rovněž peletizaci vzorků moči a uchování pelety (sediment po odstředění) při –20 °C. Moč (5 ml) jsme centrifugovali 20 minut při 2 000 ot/min, odstranili supernatant a k peletě přidali 500 µl PBS. Takto zpracovaný materiál jsme zmrazili při – 20 °C a izolaci prováděli za týden.

Likvor a plazmu jsme s kmeny leptospir uchovávali při chladničkové teplotě 5 °C i po zmražení při – 20 °C.

V tabulce jsou výsledky PCR prováděné po uchování vzorků 24, 48 a 72 hodin při 5 °C.

	1	2	3	4	5
<i>L. grippityphosa</i> P 125	++	++	+	-	-
<i>L. copenhageni</i> Lebe	++	+	+++	-	-

Vysvětlivky:

Kmen *L. grippityphosa* P 125 (primery B 64-I a B 64-II)

1. 280 leptospir / 1 ml moči, uchované 48 hodin
2. 238 leptospir / 1 ml moči, uchované 24 hodin
3. 280 leptospir / 1 ml moči, čerstvé – ihned zpracováno
4. 238 leptospir / 1 ml moči uchované 72 hodin
5. negativní kontrola – destilovaná voda

Kmen *L. copenhageni* Lebe (primery G1 a G2)

1. 280 leptospir / 1 ml moči, uchované 48 hodin
2. 120 leptospir / 1 ml moči, uchované 24 hodin
3. 280 leptospir / 1 ml moči, čerstvé – ihned zpracováno
4. 120 leptospir / 1 ml moči uchované 72 hodin
5. negativní kontrola – destilovaná voda

Závěry testování optimálního způsobu skladování biologického materiálu před izolací DNA susp. patogenních leptospir

Optimální je zpracovat moč odebranou od pacientů pro vyšetření na přítomnost DNA patogenních leptospir do 24 hodin, při skladování v chladničkové teplotě 5 °C. Vzorek je možno dle výsledků pokusů vyšetřit ještě po 48 hodinovém skladování při 5 °C. Peletizace moči s následným uchováním při – 20 °C se v našich pokusech neosvědčila. Likvor a plazmu je možno uchovávat při teplotě 5 °C i ve zmraženém stavu při – 20 °C.

Testování způsobů izolace DNA patogenních leptospir z biologických materiálů

Materiál pro detekci DNA patogenních leptospir:

1. moč:

- neupravený vzorek moči 200 µl
- úprava vzorku o objemu 2 ml centrifugací při 2 000 ot./min po dobu 10 min
- úprava vzorku o objemu 5 ml centrifugací při 2 000 ot./min po dobu 10 min
- úprava vzorku o objemu 10 ml centrifugací při 2 500 ot./min po dobu 10 minut vždy při laboratorní teplotě, po odstředění jsme odstranili supernatant.

Izolace DNA leptospir byla provedena ze vzniklé pelety (sedimentu).

2. plazma, likvor:

- neupravený vzorek plazmy nebo likvoru 200 µl
- úprava vzorku o objemu 1 ml centrifugací při 2 000 ot./min po dobu 10 min

- úprava vzorku o objemu 1-2 ml: plazmu (likvor) jsme podle literárních údajů (92) centrifugovali 15 minut při 13 000 ot./min, odstranili supernatant, vzniklou peletu promyli 200 µl destilované vody a znovu centrifugovali 8 minut při 13 000 ot./min. Takto upravenou peletu jsme použili k izolaci DNA patogenních leptospir.

Izolace DNA byla prováděna komerčním kitem QIAampDNA Mini Kit (250) firmy QIAGEN následujícími postupy:

- tzv. „Blood and body fluid spin protocol“ (protokol pro krev a tělní tekutiny)
- tzv. „Tissue protocol“ (tkáňový protokol)

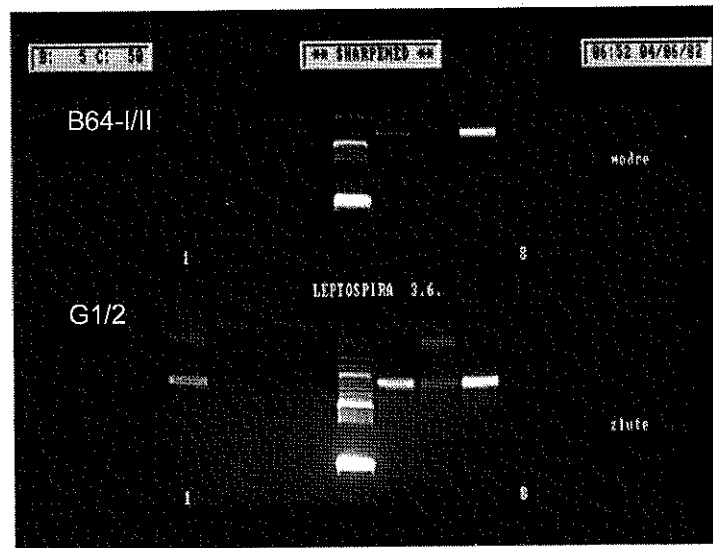
Při použití tkáňového protokolu byla zjištěna vyšší citlivost metody. „Tissue protocol“ se liší od „Blood and body fluid spin protocol“ provedením počáteční lýzy v prostředí lyzačního pufru za přítomnosti proteinázy po dobu 1-3 hodiny.

Pro zvýšení citlivosti vyšetření moči od pacientů se susp. leptospirozou jsme testovali vzorky moči s patogenními leptospirami po úpravě odstředěním. V další etapě práce jsme vyzkoušeli izolaci DNA patogenních leptospir dle Blood and body fluid spin protocol a Tissue protocol.

Závěry testování jsou uvedeny v tabulkách a pro ilustraci doplněny fotografií gelu s vizualizovanými produkty PCR reakcí.

Amplifikace DNA leptospir (*L. copenhageni* Lebe, *L. grippityphosa*) izolované z moči upravené odstředěním

Primery	1	2	3	4	5	6	7	8
B64-I/II	+	+	-	-	++	+	+++	-
G1/2	++	+	-	-	+++	++	++++	-



1 2 3 4 M 5 6 7 8

Vysvětlivky k tabulce a fotografii gelu

Primery B64-I/II (kmen *L. grippityphosa* P 125):

1. 200 lept./ml moče - neupravený vzorek
2. 20 lept./ml moče - neupravený vzorek
3. 20 lept./ml moče - neupravený vzorek
4. 2 lept./ml moče - neupravený vzorek
5. 20 lept./ml moče - před izolací DNA centrifugace 2 ml moče po dobu 10 minut při 2000 ot./min
6. 2 lept./ml moče - před izolací DNA centrifugace 2 ml moče po dobu 10 minut při 2000 ot./min

Primery G1/2 (kmen *L. copenhageni* Lebe):

1. 250 lept./ml moče - neupravený vzorek
2. 25 lept./ml moče - neupravený vzorek
3. 25 lept./ml moče - neupravený vzorek
4. 2,5 lept./ml moče - neupravený vzorek
5. 25 lept./ml moče - před izolací DNA centrifugace 2 ml moče po dobu 10 minut při 2000 ot./min
6. 2,5 lept./ml moče - před izolací DNA centrifugace 2 ml moče po dobu 10 minut při 2000 ot./min

Primery B64-I/II a G1/2:

7. pozitivní kontrola
8. negativní kontrola

- M velikostní marker ā 50 bp (Roche, M XIII)
- ++++ velmi silná pozitivita vzorku
- +++ silná pozitivita vzorku
- ++ střední pozitivita vzorku
- + slabá pozitivita vzorku
- negativní výsledek

Amplifikace DNA patogenních leptospir (*L. copenhageni* Lebe, *L. grippotyphosa*) získaných z moči sedmi různými izolačními postupy.

primery	1	2	3	4	5	6	7
B64-I/II	++	-	++	+	++	+	-
G1/G2	+	++	+++	++	+++	+++	-

Vysvětlivky:

- izolace DNA Blood and body fluid spin protocol ze 200 µl neupravené moči pro primery B64-I/II i G1/G2 : počet leptospir = 100 organismů / 1 ml moči
- izolace DNA podle Blood and body fluid spin protocol ze 200 µl neupravené moči pro primery B64-I/II i G1/G2 : počet leptospir = 10 organismů / 1 ml moči
- izolace DNA podle Tissue protocol z pelety získané odstředěním 2 ml moči po dobu 10 minut / 2 000 ot./min:
 - primery B64-I/II : počet leptospir = 20 organismů / 1 ml moči
 - primery G1/G2 : počet leptospir = 25 organismů / 1 ml moči
- izolace DNA podle Tissue protocol z pelety získané centrifugací 2 ml moči po dobu 10 minut / 2 000 ot./min:
 - primery B64-I/II : počet leptospir = 2 organismy / 1 ml moči
 - primery G1/G2 : počet leptospir = 2,5 org. / 1 ml moči
- izolace DNA podle Tissue protocol z pelety získané odstředěním 10 ml moči po dobu 10 minut / 2 500 ot./min
 - primery B64-I/II : počet leptospir = 48 org./1 ml moči
 - primery G1/G2 : počet leptospir = 50 org./1 ml moči

6. izolace DNA podle Tissue protocol z pelety získané odstředěním 10 ml moči po dobu 10 minut / 2 500 ot./min
 - primery B64-I/II : počet leptospir = 1,4 org. / 1 ml moči
 - primery G1/G2 : počet leptospir = 16 org./ 1 ml moči
7. negativní kontrola = destilovaná voda

Amplifikace DNA leptospir (*L. copenhageni* Lebe) získaných různými izolačními postupy z plazmy (vzorky 1 až 4).

	1	2	3	4
<i>L. copenhageni</i> Lebe (24 leptospir / 1 ml)	-	-	++	-

Vysvětlivky:

1. izolace DNA podle Tissue protocol z 200 µl plazmy – neupravená krevní plazma
2. izolace DNA podle Tissue protocol z pelety získané odstředěním 1 ml plazmy po dobu 10 min. / 2 500 ot./min
3. izolace DNA podle Tissue protocol z pelety získané odstředěním 1 ml plazmy po dobu 15 min./ 13 000 ot /min, plazma promytá 200 µl destilované vody.
4. negativní kontrola = destilovaná voda

Postup izolace DNA (vybraný na základě předchozího testování)

Moč : 10 - 15 ml moči odstředit po dobu 10 min při 2 500 ot./min, supernatant odstranit a izolaci DNA provést ze vzniklé pelety. Při nedostatku materiálu (moči) lze použít stejným způsobem i menší množství moči (5ml).

Krevní plazma, likvor: 1 - 2 ml materiálu odstředit po dobu 15 minut při 13 000 ot./min, odstranit supernatant, vzniklou peletu promýt 200 µl destilované vody a opět odstředit 8 minut při 13 000 ot./min. Promytá peleta je použita k izolaci DNA.

Pro izolaci DNA z moči, plazmy i likvoru je nejvhodnější použít Tissue protocol komerčního kitu QIAampDNA Mini Kit (250) firmy QIAGEN.

Stanovení citlivosti metody (meze detekce)

Průběžné testování různých koncentrací leptospir v biologickém materiálu

Při zkoušení jednotlivých částí metodiky pro detekci patogenních leptospir z biologického materiálu jsme postupně se stoupající citlivostí PCR reakce snižovali množství spirochét vkládaných do biologického materiálu (zkušební vzorky). Z počáteční denzity řádově 10^{3-5} jsme postupně snížili detekovatelné množství až k jednotlivým organismům.

Závěry stanovení citlivosti (meze detekce) metody

Nejnižší množství patogenních leptospir, které jsme metodou schopni detekovat je 10-20 organismů v 1 ml biologického materiálu. Uvedené koncentrace leptospir prokazuje metoda PCR i po uložení materiálu na 48 hodin při 5° C.

Ověření specifity metody bylo provedeno postupně se všemi kmeny používanými při sérologické diagnostice (reakce MAL) v České republice.

V následující tabulce jsou uvedeny pozitivní výsledky testování jednotlivých kmenů leptospir. Nepatogenní kmeny *Leptospira biflexa* Patoc I a *Leptospira saopaulo* Sao Paulo (Genomospecies 5) nereagovaly s primery uvedenými v tabulce (15). Reakce patogenních sérovarů byly přísně specifické, to znamená, že kmen vykazoval pozitivní výsledek pouze s primery specifickými pro genomospecies, do kterého je zařazen.

Sérovar	Genomospecies	Výsledek testování
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> Fryšava	<i>L. interrogans</i>	Pozitivní G1/G2
<i>L. copenhageni</i> Lebe	<i>L. interrogans</i>	Pozitivní G1/G2
<i>L. grippotyphosa</i> P 125	<i>L. kirschneri</i>	Pozitivní B64 I/II
<i>L. grippotyphosa</i> Ž 6	<i>L. kirschneri</i>	Pozitivní B64 I/II
<i>L. sejroe</i> M 84	<i>L. borgpetersenii</i>	Pozitivní G1/G2
<i>L. pomona</i> BP	<i>L. interrogans</i>	Pozitivní G1/G2
<i>L. sorex-jalna</i>	<i>L. borgpetersenii</i>	Pozitivní G1/G2
<i>L. bratislava</i> Jež Bratislava	<i>L. interrogans</i>	Pozitivní G1/G2
<i>L. canicola</i> S 392	<i>L. interrogans</i>	Pozitivní G1/G2
<i>L. polonica</i>	<i>L. borgpetersenii</i>	Pozitivní G1/G2
<i>L. istrica</i> J 20	<i>L. borgpetersenii</i>	Pozitivní G1/G2

Na závěr přípravy metodiky detekce DNA patogenních leptospir byl vypracován Standardní operační postup (SOP 04/molbiol/patogeny). Metoda byla zavedena do laboratorní diagnostiky na společném pracovišti ÚKM a ÚKBD v úseku molekulární biologie.

3. SÉROLOGICKÉ METODY V LABORATORNÍ DIAGNOSTICE LEPTOSPIRÓZ

Antigeny: živé kmeny leptospir kultivované v Korthofově médiu po dobu 7-14 dnů za standardních podmínek, při teplotě 28 ° C.

Antigeny sérovarů používané v České republice:

Leptospira icterohaemorrhagiae Fryšava

1. *L. copenhageni* Lebe
2. *L. grippotyphosa* p 125
3. *L. grippotyphosa* Ž 6
4. *L. sejroe* M 84
5. *L. istrica* J 20
6. *L. bratislava* Jež Bratislava
7. *L. pomona* Šimon
8. *L. polonica* Poland
9. *L. sorex-Jalná*
10. *L. canicola* S 392

Princip reakce:

Vybrané antigeny v množství 50 mikrolitrů reagují s vyšetřovaným krevním sérem (předředěným 1:50) ve sterilní mikrotitrační destičce, a dávkovaným rovněž v množství 50 µl. Výsledné ředění pro screeningové základní vyšetření je tedy 1:100. Inkubace probíhá 60 minut při teplotě

28 °C. Reakce je hodnocena mikroskopicky v zástinu, při zvětšení 160-200x. Za pozitivní výsledek je považována mikroaglutinace nebo lýza více než 30% živých spirochét, popř. kombinace obou reakcí (26,SOP-ÚKM) .

Séra, která jsou pozitivní v základním ředění v titru 1:100, vyšetřujeme titrací se všemi pozitivními sérotypy, popřípadě i s dalšími sérotypy téže serologické skupiny – do konečného titru.

Hodnocení:

Reakce je hodnocena vizuálně na + až +++, za pozitivní je považován konečný titr odečtený na ++.

VÝSLEDKY A DISKUSE

1. Laboratorní diagnostika toxoplazmózy: výsledky s diskusí

V naší laboratoři provádíme sérologickou diagnostiku toxoplazmózy nejenom pro klinická pracoviště Fakultní nemocnice v Hradci Králové, ale i pro další nemocnice v Hradeckém kraji. Přímý průkaz nukleové kyseliny *Toxoplasma gondii* v biologickém materiálu je zajišťován v současné době od roku 2000 dokonce pro celé území České republiky. V letech 2000 – 2005 bylo vyšetřeno celkem (n=22 427) vzorků krevních sér (a vzorků plodové vody) od 15 117 pacientů a těhotných žen metodou KFR na přítomnost antitoxoplazmových protilátek. Sérologické vyšetření rozšiřujeme podle kategorie pacienta o imunoglobuliny IgM, IgA, IgE (markery akutní infekce) a protilátky ve třídě IgG, popřípadě včetně vyšetření schopnosti jejich avidity (celkem provedeno 43 542 testů). Protilátky proti *Toxoplasma gondii* v různých třídách imunoglobulinů byly detekovány v krevních sérech 7 998 pacientů, to je v 52,91% případů.

V roce 2000 jsme zavedli a standardizovali metodu polymerázové řetězové reakce pro detekci DNA prvoka *Toxoplasma gondii* v klinickém materiálu od nemocných s různými diagnózami – suspektní toxoplazmóza, toxoplazmóza v graviditě, novorozenci matek, které prodělaly toxoplazmózu v těhotenství, osoby po transplantaci, imunoalterovaní nemocní apod. Polymerázovou řetězovou reakcí bylo do data zpracování souboru vyšetřeno 441 vzorků různých biologických materiálů od 347 pacientů: 318 žen, 27 mužů a dvou novorozenců; (nesrážlivá krev, fetální krev, plodová voda, bioptický materiál atd.). Přehled osob vyšetřených metodou polymerázové řetězové reakce je uveden v následující tabulce č. 1.

Tab.1 Soubor osob vyšetřených PCR na přítomnost DNA *T. gondii*

Vyšetřené osoby	Muži	Ženy gravidní	Ženy negravidní	Novorozenci
347	27	120	198	2
Věk - průměr 26,22 (+/- 10,87)	30,56	26,45	27,13	0

Kromě přímého průkazu DNA *Toxoplasma gondii* v krevních leukocytech, plodové vodě a v kmenových buňkách kostní dřeně jsme dle požadavků jednotlivých pracovišť vyšetřovali vzorky séra a plodové vody také na přítomnost protilátek – imunoglobulinů ze třídy IgM, IgA, IgE a IgG metodou EIA a KFR.

Z 347 vyšetřených osob byl průkaz DNA metodou PCR pozitivní v 21 případech (tj.6,0%). V celkovém souboru 441 vzorků od vyšetřených osob jsme detekovali DNA *Toxoplasma gondii* ve 23 případech (tj. 5,2 %).

Tab. 2 Vyšetření biologických vzorků (krev, biopsie, plodová voda, progenitorové buňky, likvory) metodou PCR k detekci DNA *T. gondii*

	Počet vyšetření	pozitivní	%
Biologický materiál	441	23	5,21
Vyšetřené osoby	347	21	6,05

Ze souboru 347 vyšetřených pacientů jsme vyčlenili 120 gravidních žen, u nichž bylo provedeno metodou PCR vyšetření plodové vody (n=61), plodové vody a krve (n=53 dvojic), fetální krve samostatně (n=2), fetální krve a krve matky (n=2 dvojice) a fetální krve a plodové vody (n=2 dvojice). Popis souboru, výsledky detekce DNA *T. gondii* a výsledky provedených sérologických vyšetření jsou uvedeny v tabulkách č. 3 a 4.

Tab. 3 Vzorky materiálů od gravidních žen testované metodou PCR

Plodová voda	Fetální krev	Plodová voda + krev matky	Plodová voda + fetální krev	Krev matky + fetální krev	Celkem vzorků
61	2	53	2	2	177

Metodou PCR byla DNA prvoka *T. gondii* zjištěna v biologických materiálech od deseti těhotných žen se susp. toxoplazmózou, to je v 8,33%.

Tab. 4 Detekce DNA *T. gondii* v krvi a plodové vodě u gravidních žen vyšetřených pro suspektní toxoplazmózu

Počet gravidních žen	Celkem pozitivních	Krev	Plodová voda	Krev + plodová voda	Procento Pozitivity
120	10	5	4	1	8,33 %

V tabulce č.5 jsou uvedeny výsledky PCR reakce a sérologického vyšetření metodami KFR a EIA dvou novorozenců narozených matkám, u nichž v těhotenství proběhla laboratorně potvrzená akutní toxoplazmóza.

Tab. 5 Vyšetření protilátek a detekce DNA *T. gondii* u novorozenců s vrozenou toxoplazmózou

PCR		Sérologické metody					
TGR1E	B1	KFR	IgM	IgA	IgE	IgG	IgG AV
+	+	128*	3,010*	4,295*	nd	2,556*	nd
+	-	1024*	1,687*	3,744*	1,442*	2,418*	v

Vysvětlivky: **KFR** = komplement fixační reakce, * = pozitivní, **nd** = netestováno, **IgG AV** = avidita ve třídě IgG, **v** = vysoká avidita

Ve vzorcích biologického materiálu od obou novorozenců s kongenitální toxoplazmózou byla zjištěna pozitivní detekce DNA *T. gondii* i pozitivní průkaz protilátek sérologickými metodami.

V následující tabulce č.6 jsou uvedeny výsledky detekce DNA *T. gondii* u všech pacientů s pozitivním průkazem DNA (PCR+) společně s titry sérových protilátek (Ab).

Tab. 6 Výsledky PCR v krvi, plodové vodě a v buňkách PKB, titry protilátek v séru u PCR+ pacientů a hodnocení shody

Č./pohl.	Věk	odběr	TGR 1E	B1	KFR	IgM	IgA	IgE	IgG	IgG AV	Shoda PCR/Ab	
1	♂	0	Krev	Poz	Poz	128	3,010	4,295,	nd	2,556	nd	Ano
2	♂	0	Krev	Poz	Neg	1024	1,687	3,744	1,442	2,418	V	Ano
3	♀	35	PV	Poz	Poz	512	4,517	5,871	2,567	3,281	N	Ano
4	♀	32	Krev	Neg	Poz	256	3,056	1,295	nd	3,109	Hh	Ano
5	♀	31	Krev	Poz	Neg	16	0,156	0,453	0,148	3,159	V	Ano
6	♀	23	Biop.	Poz	Poz	512	0,811	1,016	0,954	4,496	V	Ano
7	♀	28	Krev	Poz	Poz							
8	♂	40	PKB	Poz	Neg	512	1,876	1,967	1,489	4,191	N	Ano
9	♀	29	PV	Poz	Poz							
10	♀	24	PV	Neg	Poz	64	1,203	0,837	nd	2,101	nd	Ano
11	♀	29	PV	Poz	Poz							
12	♀	29	PV	Hh	Poz							
13	♀	28	Krev	Poz	Poz							
14	♀	26	Krev	Neg	Poz	8	0,222	0,235	0,081	2,236	nd	Ano
15	♀	33	PV	Poz	Poz		0,107	2,041	nd	2,902	nd	Ano
			Krev	Poz	Poz	64						
16	♀	30	Krev	Neg	Poz							
17	♀	23	Krev	Poz	Poz							
18	♀	32	Krev	Neg	Poz	128	3,076	0,537	0,405	2,169	V	Ano
19	♀	56	Krev			32	0,117	0,155	nd	2,760	nd	Ano
			Biop.	Poz	Poz							
20	♀	9	PKB	Poz	Poz	512	0,691	7,526	nd	8,163	V	Ano
21	♀	28	Krev	Neg	Poz	64	1,117	0,421	nd	3,639	V	Ano

Vysvětlivky:

Ab = protilátky **IgG AV** = avidita IgG (N≤30-35≤V)
PV = plodová voda **Biop.** = biopsie z jater, **PKB** = progenitorové kmenové buňky
N = nízká avidita **V** = vysoká avidita; **nd** = netestováno
Poz = pozitivní **Neg** = negativní; **Hh** = hraniční hodnota

Hranice positivity EIA IgM, IgA, IgE:

negativní ≤0,900 - 1,100≤ pozitivní

IgG:

negativní ≤0,800 - 1,000≤ pozitivní.

Pozitivní výsledek detekce DNA *T. gondii* metodou PCR jsme obdrželi rovněž ve dvou vzorcích progenitorových kmenových buněk před transplantací (v tabulce označeny čísla 8 a 20).

Ověření specifity nově zaváděné metody polymerázové řetězové reakce do diagnostiky toxoplazmózy, bylo provedeno porovnáním výsledků PCR s nálezem protilátek v krevním séru. Analyzovali jsme výsledky vyšetření nejdříve v celém souboru, včetně dvou novorozenců s kongenitální toxoplazmózou, bez rozdělení do skupin podle věku, či diagnóz pacientů, z důvodu zachování dostatečně velkého souboru všech vyšetření, která byla v naší laboratoři provedena současně.

Na základě výsledků laboratorního vyšetření metodou PCR byl soubor vzorků rozdělen na skupiny PCR pozitivní (PCR+) a PCR negativní (PCR-).

Do statistického zpracování (program NCSS 2000) bylo zařazeno celkem 294 vzorků u nichž byla současně provedena detekce DNA *T. gondii* metodou PCR a sérologické vyšetření. Vzhledem k tomu, že soubor neměl normální rozložení, nemohl být použit klasický Studentův dvouvýběrový t-test, proto jsme ke statistické analýze zvolili Mann Whitneyův neparametrický test.

Tab. 7 Testování hypotézy

H₀: Není statisticky významný rozdíl v hladinách protilátek mezi skupinami pozitivních a negativních PCR vyšetření

Pozitivní / Negativní	Hladina významnosti $\alpha = 0,05$	Hypotéza H ₀
IgM	0,489	přijímá se
* IgA	0,049	zamítá se
IgE	0,174	přijímá se
IgG	0,461	přijímá se
IgG avidita	0,543	přijímá se

Hladina významnosti: $\alpha = 0,05$

Závěr testování hypotézy H₀:

Neprokázali jsme statisticky významný rozdíl ($p=0,05$) ve výšce titrů protilátek IgM, IgE, IgG a aviditou IgG mezi vzorky v nichž byla detekována

DNA *Toxoplasma gondii* (PCR+) oproti vzorkům bez prokázané přítomnosti DNA *T. gondii* (PCR-).

Statisticky významný rozdíl byl zjištěn pouze ve třídě imunoglobulinů IgA ($p=0,05$ *) mezi souborem vzorků PCR+ (průměr titrů 2,24) a PCR- (1,32).

Výsledky jsou shrnuty do tabulek č. 8 a 9 a grafů č. 1, 2 a 3.

Tab. 8 Výsledky vyšetření protilátek ve vzorcích s prokázanou DNA *Toxoplasma gondii* (PCR+)

Protilátky	Pozit.	Průměr titrů	Směrodatná odchylka	Min.	Max.
IgM	14	1,15	1,27	0,10	3,08
IgA *	14	2,24	2,04	0,15	7,52
IgE	4	0,80	0,82	0,15	1,50
IgG	14	5,44	8,24	1,35	33,80
IgG avidita	6	42,07	11,15	23,40	53,30

Vysvětlivky:

Hranice positivity EIA:

IgM, IgA, IgE: *negativní* $\leq 0,900-1,100 \leq$ *pozitivní*;

IgG: *negativní* $\leq 0,800-1,000 \leq$ *pozitivní*; **Avidita IgG** nízká $\leq 30-35 \leq$ vysoká

Tab. 9 Výsledky vyšetření protilátek ve vzorcích bez průkazu DNA *Toxoplasma gondii* (PCR-)

Protilátky	Pozit.	Průměr titrů	Směrodatná odchylka	Min.	Max.
IgM	252	1,15	1,37	0,05	10,50
IgA*	234	1,32	1,66	0,05	9,59
IgE	104	0,66	0,63	0,08	3,62
IgG	208	2,67	1,70	0,00	7,55
IgG avidita	123	51,98	19,88	12,70	94,70

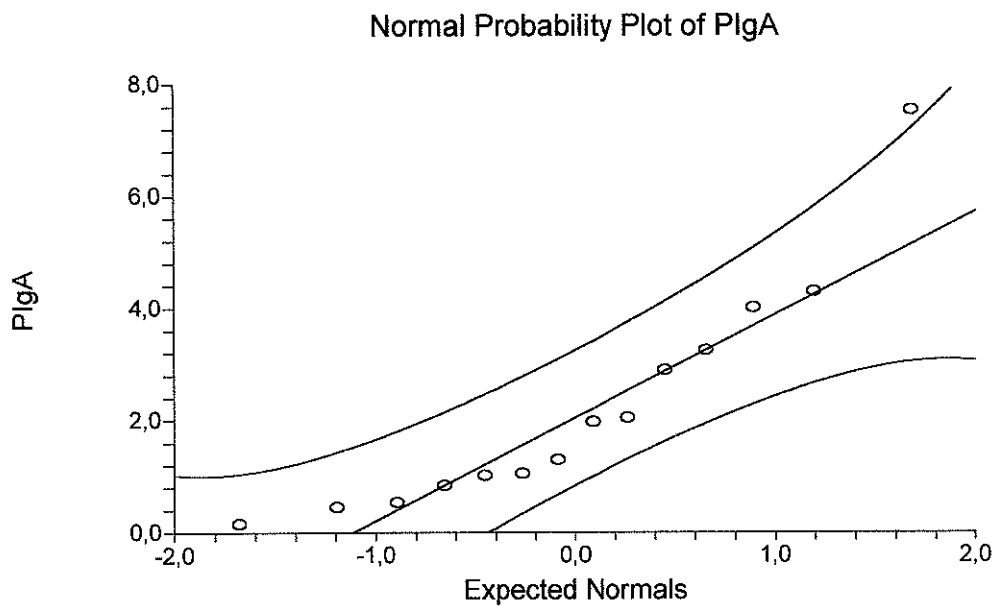
Vysvětlivky:

Hranice positivity EIA:

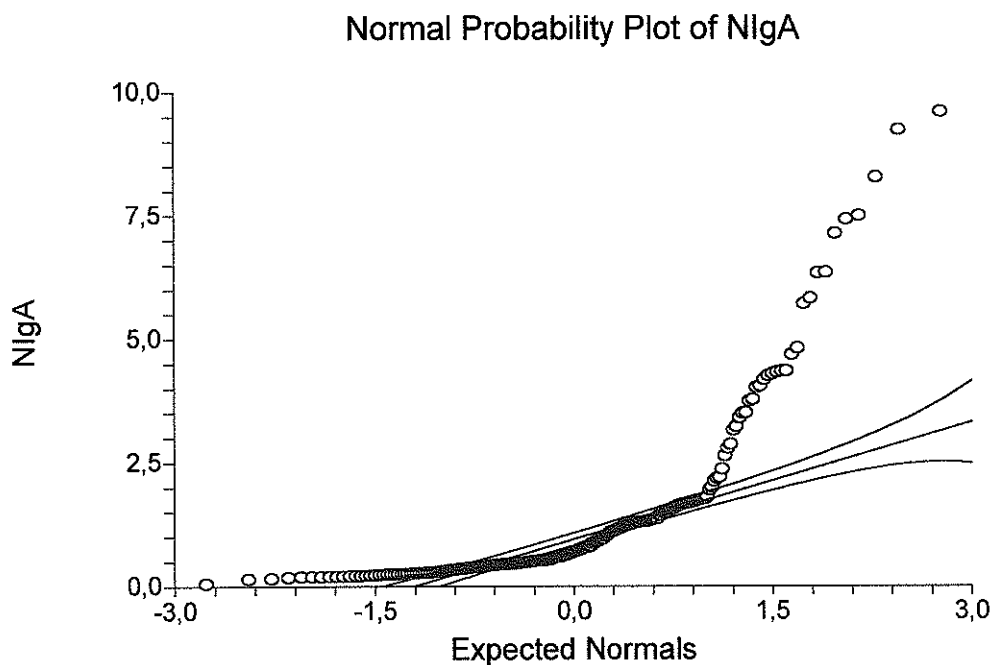
IgM, IgA, IgE: *negativní* $\leq 0,900-1,100 \leq$ *pozitivní*;

IgG: *negativní* $\leq 0,800-1,000 \leq$ *pozitivní*;

Avidita IgG nízká $\leq 30-35 \leq$ vysoká



Obr. 1 Rozložení titrů IgA antitoxoplazmových protilátek v souboru PCR +

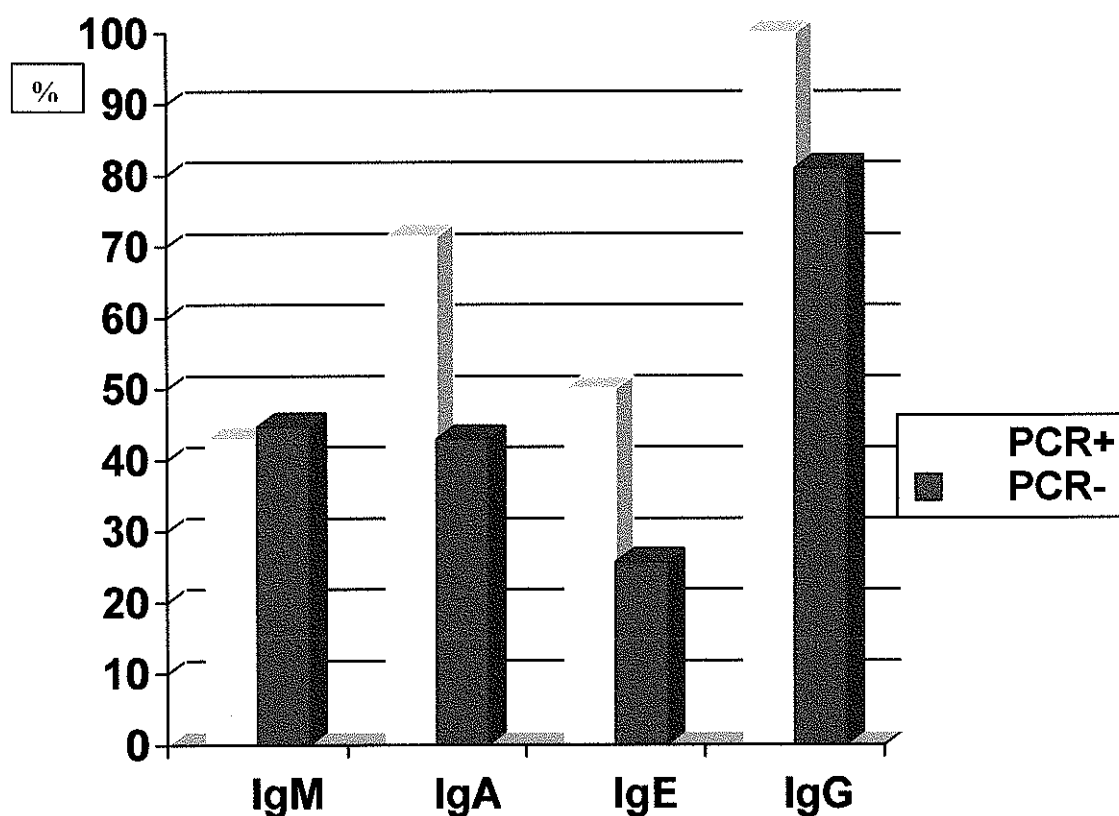


Obr. 2 Rozložení titrů IgA antitoxoplazmových protilátek v souboru PCR -

Ve 100% PCR pozitivních vzorků byly prokázány imunoglobuliny ze třídy IgG a ve více než 50% imunoglobuliny ostatních tříd (IgA, IgM, IgE), což potvrzuje vysokou specifitu průkazu DNA *T. gondii* metodou PCR (tab. 10).

Tab.10 Procenta výskytu antitoxoplazmových protilátek ve vyšetřených biologických vzorcích (PCR+, PCR-)

%	IgM	IgA	IgE	IgG
PCR +	42,9	71,4	50,0	100,0
PCR -	44,7	43,0	25,7	81,0



Obr. 3 Výskyt protilátek (v %) v souborech biologických vzorků s pozitivní detekcí (PCR+) a bez průkazu DNA (PCR-) *Toxoplasma gondii*

Odběr biologického materiálu při podezření na onemocnění toxoplazmózou je zpravidla prováděn za několik dnů až týdnů po vzniku klinických příznaků a u gravidních žen v rámci prevence; to je v době, kdy se v infikovaném organismu tvoří nejen protilátky akutní fáze infekce *Toxoplasma gondii*, ale také většinou i imunoglobuliny třídy IgG.

Diagnózu akutní toxoplazmózy tedy nelze potvrdit či vyloučit pouze na základě průkazu protilátek, které často v organismu dlouhodobě přetrvávají (ani detekcí markerů akutní infekce – IgM, IgA, IgE, včetně avidity IgG)(120). V odůvodněných případech je proto nutné ověřit aktuální parazitémii pomocí průkazu DNA prvoka *Toxoplasma gondii* (20,9).

Prokázali jsme a ověřili, že vzhledem k obtížné interpretaci výsledků sérologických vyšetření, je zařazení metody PCR pro přímý průkaz DNA *Toxoplasma gondii* nezbytnou součástí laboratorní diagnostiky, především pro rizikové skupiny pacientů (gravidní ženy, novorozenci se suspektní kongenitální toxoplazmózou (22), pacienti immunosuprimovaní, v transplantačním programu, pacienti onkologie, HIV pozitivní apod.) (1,4,5,100).

Včasné stanovení diagnózy pomocí polymerázové řetězové reakce a okamžité zahájení příslušné léčby (33) zabrání generalizaci infekce *T. gondii* a fatálnímu průběhu infekce v ohrožených skupinách osob.

V tabulkách a grafech uvedených ve výsledcích jsou znázorněny postupy, které jsme použili pro ověření specificity a senzitivity metody polymerázové řetězové reakce pro detekci DNA prvoka *Toxoplasma gondii*. Porovnávali jsme výsledky polymerázové řetězové reakce s průkazem protilátek (tříd imunoglobulinů) u jednotlivých vyšetřených osob v celém souboru současně testovaných vzorků materiálů. Hodnoty titrů imunoglobulinů IgM, IgE a IgG se statisticky významně nelišily mezi skupinami vzorků bez průkazu *Toxoplasma gondii* (PCR-) oproti skupině PCR+.

Ve čtrnácti případech vzorků s pozitivní detekcí DNA *T. gondii* (PCR+), kdy byly současně vyšetřeny i imunoglobuliny IgA jsme pozorovali statisticky významně vyšší titry imunoglobulinů IgA (\emptyset 2,24) ve srovnání se skupinou vzorků materiálů PCR negativních (\emptyset 1,32). Data však bude třeba ověřit ve větších počtech vyšetřených biologických vzorků (PCR a imunoglobuliny IgA

současně) od pacientů s toxoplazmózou a znovu zhodnotit význam nálezu vyšších titrů imunoglobulinů IgA ve vzorcích materiálů s pozitivní detekcí DNA *Toxoplasma gondii*.

Na základě podrobné analýzy našeho testovaného souboru jsme potvrdili, že aktivitu onemocnění toxoplazmózou u pacientů nelze přesně stanovit jenom na základě výsledků sérologického vyšetření. Hodnocení jednotlivých nálezů je ztíženo variabilitou odbourávání IgM a IgA protilátek v organismu, vysokou prevalencí titrů protilátek proti *T. gondii* u normální populace (anamnestické titry IgG) i širokým spektrem klinických příznaků toxoplazmózy imitujících řadu jiných onemocnění (33,77,80). Akutní a aktivní toxoplazmovou infekci spolehlivě potvrzuje především přímá specifická detekce DNA *Toxoplasma gondii* v biologickém materiálu od nemocného, v některých případech také časově náročný průkaz infekce pokusem na bílé myši.

Ve 100% PCR pozitivních vzorků byly prokázány imunoglobuliny ze třídy IgG a ve více než 50% imunoglobuliny ostatních tříd (IgA, IgM, IgE), viz. tabulka č. 10. Odběr biologického materiálu při podezření na onemocnění toxoplazmózou je zpravidla prováděn za několik dnů až týdnů po vzniku klinických příznaků a u gravidních žen bez symptomů v rámci prevence. V této době se již většinou v infikovaném organismu tvoří protilátky proti *T. gondii* včetně imunoglobulinů IgG.

Průkaz protilátek ve všech vzorcích biologického materiálu s pozitivní detekcí DNA prvoka (PCR+), potvrzuje vysokou specifitu námi připravené a laboratorně i klinicky ověřené metody.

Správně ordinované vyšetření metodou PCR je důležitou součástí laboratorní diagnostiky toxoplazmózy, především pro určení aktuální parazitémie v graviditě, u novorozenců matek, u nichž v těhotenství proběhla akutní infekce *T. gondii* a rovněž u pacientů s imunosupresí (11,57). Palička a kol. (1998) konstatují, že počet dětí narozených každoročně s kongenitální toxoplazmózou převyšuje obecně kombinovaný počet dětí s vrozenou rubeolou, syfilisem a infekcí herpes simplex, což může vést rovněž k pozdním následkům kongenitální toxoplazmózy. (101). V roce 1998 uvádí rovněž Lécolier v přednášce na Konzultačním dni NRL pro toxoplazmózu v Praze systém povinného vyšetřování gravidních žen ve

Francii, jehož součástí je i opakované vyšetření na přítomnost protilátek proti *T. gondii*. V případě positivity markerů akutní infekce je žena informována o možnosti prenatální diagnostiky kongenitální infekce. K průkazu DNA prvoka z plodové vody je využívána metoda PCR (85).

Vyšetření krve a plodové vody jsou indikována zejména v případech gravidních žen s pozitivními sérologickými markery akutní infekce (protilátky ve třídách IgM, IgE a IgA). Ashburn 1998 uvádí, že vyšetření imunoglobulinů IgA je velmi citlivá metoda, která může detekovat sérokonverzi u gravidních žen (4). Přesto však uzavírá, že ani prokázaná sérokonverze ve třídě IgA imunoglobulinů nemůže rozlišit mezi akutní a již proběhlou toxoplazmózou.

Zjištění vysoké avidity ve třídě IgG protilátek v krevním séru ve většině případů pomáhá vyloučit akutní infekci *T. gondii*, avšak u cca 5% pacientů zůstává index avidity dlouhodobě nízký (1).

Greco (2003) uvádí 5 kategorií pro posouzení rizika primární infekce toxoplazmózou v graviditě. Po vyšetření souboru 82 žen suspektních pro akutní toxoplazmózu v těhotenství doporučuje opakované sérologické vyšetření doplnit přímým průkazem DNA prvoka z plodové vody (53).

Po zavedení detekce DNA *T. gondii* z plodové vody bylo možno snížit na minimum kordocentézu pro vyšetření protilátek z pupečnickové krve (1,2,22,58). Metoda je vhodná rovněž v případech vyšetření mozkomíšního moku u novorozenců při podezření na kongenitální toxoplazmózu.

Polymerázová řetězová reakce je nezastupitelná také pro detekci DNA *T. gondii* v séru a mozkomíšním moku u symptomatických pacientů v hlubokém stupni defektu buněčné imunity k vyloučení mozkové toxoplazmózy, kdy vyšetření protilátek nemá příliš velký praktický význam. Pozitivita či negativita výsledků PCR usnadňuje rozhodování o volbě specifické terapie (44). V případě pozitivní detekce DNA parazita podáváme vybraným skupinám pacientů sulfadiazin a pyrimethamin, při negativním výsledku volíme spíše zajišťovací terapii spiramycinem (25).

Vzhledem k výsledkům dosaženým při laboratorním vyšetření doporučujeme odebírat u gravidních žen s pozitivními sérologickými markery akutní infekce nejen plodovou vodu, ale současně i vzorek nesrážlivé žilní krve. I v případě negativního výsledku průkazu DNA *T. gondii* v plodové vodě může přetrvávat parazitémie v organismu matky. Bez specifické

terapie matky (na základě negativního výsledku PCR v plodové vodě) by mohl nastat i v pozdějším období gravidity transplacentární prostup tachyzoitů *T. gondii* a ohrožení zdraví plodu toxoplazmózou. Riziko transplacentárního přenosu infekce *T. gondii* na plod stoupá s pokročilostí gravidity, přičemž nejvyšší riziko je ve třetím trimestru (64).

K vyloučení falešně negativních výsledků PCR metody pro průkaz DNA *T. gondii* je vhodné indikovat vyšetření před začátkem antibiotické terapie nebo co nejdříve po jejím zahájení (51,69). Ve sdělení z roku 1995 popisuje Bretagne případ pacienta, u něhož se 12 měsíců po transplantaci progenitorových krevních buněk rozvinula akutní toxoplazmóza. Po třídenní účinné terapii již pozitivní signál v PCR reakci z krve zcela vymizel, ačkoliv klinické symptomy přetrvávaly přibližně 15 dnů (17).

Biologický materiál odebraný od pacientů je třeba co nejrychleji dopravit k vyšetření (nejlépe do 24 hodin), neboť vlivem biochemických změn ve vzorcích dochází k poškození DNA a výsledek není spolehlivý.

Při dodržení podmínek indikace vyšetření, odběru a transportu vzorků, poskytuje metoda PCR pro detekci DNA *T. gondii* vysoce senzitivní a specifické výsledky (9,104). Polymerázová řetězová reakce optimalizovaná v podmínkách našeho pracoviště dosahuje citlivosti 1-10 tachyzoitů v 1 ml tekutého biologického materiálu. Guy (1996) uvádí srovnávací studii pěti evropských center pro laboratorní parazitologickou diagnostiku, v níž čtyři pracoviště byla schopna detekovat DNA méně než 10 organismů. Námí optimalizovaná metoda je v citlivosti srovnatelná s uvedenou studií (58).

Výhodou polymerázové řetězové reakce v diagnostice toxoplazmózy je také skutečnost, že vyšetření je možné provádět v různých biologických materiálech (tělní tekutiny, buňky), včetně vzorků bioptických. Podobně jako v dalších případech je využití molekulárních biologických metod v diagnostice infekcí závislé na dokonalém přístrojovém, materiálovém, personálním i prostorovém vybavení specializovaných laboratoří. Obzvláště důležité je zamezit možné kontaminaci vyšetřovaných vzorků nukleovými kyselinami z prostředí a zabránit tak vzniku falešně pozitivních výsledků.

Laboratoř pro extrahování genomu splňuje požadavky na vyšetření PCR (pracoviště s certifikátem jakosti dle normy ISO 9001/2000).

2. Laboratorní diagnostika *Entamoeba histolytica*: výsledky s diskusí

Metodu průkazu DNA jsme zavedli do rutinního diagnostického laboratorního provozu dne 30.3.2005 a do 20.8.2005 bylo vyšetřeno 11 vzorků cyst od 7 pacientů.

DNA nepatogenní *Entamoeba histolytica* var. *dispar* byla prokázána ve třech vzorcích stolice od dvou pacientů. DNA patogenní *Entamoeba histolytica* nebyla nalezena.

Ověření specifity výsledků detekce DNA *Entamoeba histolytica/dispar* nebyla zaznamenána nespecificky pozitivní (zkřížená) reakce s *Iodamoeba bütschlii*, *Endolimax nana*, *Entamoeba Hartmanii* a *Giardia lamblia* (prvoci nejčastěji určovaní ve stolici pacientů, resp. u osob vracejících se ze zahraničí).

Laboratorní kazuistiky vyšetřených pacientů

Pacient č. 1

Muž, věk 29 let, pobyt v Rusku, první vzorek stolice a krve vyšetřen po návratu ze zahraničí pro opakované zažívací potíže provázené průjmovitou stolicí:

25.7.2005 *Giardia lamblia* (nalezeny cysty). Plasmodia v krvi neprokázána.

27.7.2005 *Giardia lamblia* (cysty)

3.8.2005 ve stolici nalezeny cysty susp. Pro *E. histolytica*, cysty ze stolice byly upraveny pro detekci DNA a 11.8. 2005 byla prokázána DNA nepatogenní *Entamoeba histolytica* /*dispar*.

22.8.2005 – při kontrolním vyšetření stolice po léčbě nebyly morfologicky prokázány cystické útvary susp. pro určované střevní prvky. Pacient již neudává klinické obtíže.

Pacient č. 2

Muž, věk 57 let, pobyt v Indii, vzorky stolice a krve byly vyšetřeny v rámci prevence:

19.5.2005 ve stolici nalezeny cystické útvary?, možná susp. kvasinky?
Nález jsme ověřili metodou PCR. DNA *E. histolytica/dispar* nebyla prokázána.

19.5.2005 Plasmodia v krvi nebyla nalezena.

Pacient č. 3

Muž, věk 32, návrat z Indie, preventivní parazitologické vyšetření:

13.5.2005 vyšetřením krve nebyla prokázána malarická plasmodia

18.5.2005 byly nalezeny ve stolici cysty *Endolimax nana*

20.5.2005 ve stolici byly nalezeny cysty *Endolimax nana* a podezřelé cystické útvary susp. pro *Entamoeba histolytica/dispar* o velikosti 9-10 μ .

26.5.2005 metodou PCR nebyla z podezřelých cystických útvarů detekována DNA *E. histolytica/dispar*.

Výsledek byl uzavřen jako nález nepatogenní *Entamoeba Hartmanii*.

Pacient č. 4

Muž, 31 let, pobyt v Brazílii, vyšetření stolice a krve provedeno v rámci prevence:

3.5.2005 vyšetřena krev – Plasmodia neprokázána

11.5.2005 ve stolici byly nalezeny cystické útvary o velikosti menší než 10 μ
– susp. pro *Entamoeba Hartmanii*.

25.5.2005 DNA *Entamoeba histolytica/dispar* neprokázána

Pacient č. 5

Muž, 60 let, pobyt v Indonésii, vzhledem ke skutečnosti, že pacient udával po návratu mírné dyspeptické obtíže, bylo parazitologické vyšetření stolice provedeno 4x.

Od 30.3.2005 do 29.4.2005 byl od pacienta 4x morfologicky ve stolici prokázán *Endolimax nana*. K ověření nálezu jsme provedli 2x PCR ze stejných vzorků. DNA *E. histolytica/dispar* nebyla prokázána. Dyspeptické obtíže v průběhu 14 dnů vymizely bez léčby.

Pacient č. 6

Muž, 42 roků, pobyt v Brazílii, preventivní parazitologické vyšetření vzorků stolice:

11.4.2005 byly ve vzorku stolice nalezeny susp. cystické útvary

15.4.2005 metodou PCR byla detekována DNA nepatogenní
E. histolytica/dispar.

25.4.2005 byly opět nalezeny ve stolici susp. cystické útvary

30.4.2005 metodou PCR byla opět detekována DNA nepatogenní
E. histolytica/dispar.

Pacient č. 7

Muž, 29 let, vyšetření stolice jsou provedena pro opakované intenzivní průjmy po návratu z Jižní Afriky.

V termínu od 9.4. do 25.4.2005 byly morfologicky ve třech odlišných vzorcích stolice prokázány *Iodamoeba bütschlii*, *Endolimax nana* a *Giardia lamblia*.

Ze stejných tří vzorků stolice nebyla detekována metodou PCR DNA *E. histolytica/dispar.*

20.5.2005 při morfologickém vyšetření stolice po dokončení léčby již nebyli prokázáni střevní prvoci: *Iodamoeba bütschlii*, *Endolimax nana* ani *Giardia lamblia*. Pacient bez klinických obtíží.

Pacient č. 8

Muž, 24 let, v říjnu roku 2003 a v lednu a únoru 2004 pracoval jako montér v Indii. V průběhu pobytu, v únoru 2004, prodělal průjmové onemocnění.

Od 28.4.2004 udává bolesti v pravém podžebří s propagací do zad a teploty 38-39 °C. I přes intenzivní antibiotickou terapii (Amoxiklav, Gentamycin, Deoxymykoin) přetrvávaly teploty a průjem. CT vyšetření jater prokázalo nález dvou abscesů velikosti asi 9 a 7 cm v průměru.

5.5.2004 byl pacient v septickém stavu přeložen na infekční kliniku v Hradci Králové a odtud na chirurgickou kliniku k operačnímu řešení. Ještě týž den byla provedena drenáž (pod zajištěním ATB a Entizolu) obou amébových jaterních abscesů.

Dne 7.5.2004 byla pro přetrvávající septický stav provedena operační revize a další drenáž. Byla potvrzena peritonitida a nález dalšího subfrenického abscesu.

Dne 7.5.2004 potvrzena v NRL pro tropické parazitární nemoci v Praze sérologicky infekce *Entamoeba histolytica*: HIT 1:256 a ELISA 1:4 096 (silně pozitivní).

Závěr: pacient byl po měsíční hospitalizaci na infekční klinice FN v Hradci Králové propuštěn do domácího ošetření ve stabilizovaném stavu. Rekonvalescence pacienta po proběhlé těžké extraintestinální formě amébozy trvala přibližně 1 rok.

Význam PCR v diagnostice amébozy

Stále se zvyšující počet osob cestujících do oblastí tropů a subtropů přináší vyšší nároky na parazitologickou laboratorní diagnostiku včetně diagnostiky střevních prvoků.

Entamoeba histolytica zahrnuje dva morfologicky identické parazity, a to invazivní *E. histolytica* (patogenní) a neinvazivní *E. dispar* (nepatogenní). Rozlišení obou forem prvoka je nezbytné z důvodů diagnostických a terapeutických. Rivera a kol. 1999 (109) uvádí celosvětový výskyt *E. histolytica* u 500 milionů osob, ovšem pouze 10% z toho, to je 50 milionů případů na patogenní *E. histolytica* a zbývajících 90 % je nepatogenní *Entamoeba dispar*. I když soubor vyšetřených vzorků stolic (průkaz DNA améb) na našem pracovišti je dosud velmi malý, neboť metoda byla zavedena v březnu roku 2005, první výsledky naznačují, že výskyt nepatogenní *Entamoeba dispar* bude značně převyšovat průkaz patogenní améby. Předpoklad podporují i nálezy polských autorů (95), kteří prokázali přítomnost *E. histolytica sensu lato* ve stolici (mikroskopicky, PCR a sérologicky - IHA) u 0,19% osob, které nikdy necestovaly za hranice Polska a u 0,63% Poláků s udávaným pobytem v zahraničí. V souboru 38 vzorků stolic Myjak a kol. (95) našli pouze 4 patogenní *E. histolytica*, 31 nepatogenních *E. dispar* a 2 smíšené infekce.

Pobyt v oblastech tropů a subtropů výrazně zvyšuje riziko infekce patogenními střevními amébami. Kubánští autoři (98) uvádějí v souboru 49 vyšetřených osob žijících trvale na Kubě nález 24,5 % patogenní *E. histolytica* a 75,5% nepatogenní *E. dispar*. K vyšetření použili metodu multiplex PCR, u níž uvádějí specifitu 1,00 a senzitivitu 0,94. Soubor v naší

laboratoři dosud vyšetřených vzorků je v současné době příliš malý na posouzení obou výše uvedených ukazatelů, ale dosavadní výsledky ukazují dostatečnou specifitu i senzitivitu.

Výsledky zahraničních autorů a námi výše popsany případ těžké extraintestinální formy amébozy u pacienta uvedeného pod číslem 8, vedl k urychlenému zavedení přímého průkazu DNA *Entamoeba histolytica* a *Entamoeba dispar* na našem pracovišti. Metoda ELISA není k rozlišení *Entamoeba histolytica* a *Entamoeba dispar* podle některých autorů (109) dostatečně citlivá a proto doporučují detekci DNA metodou PCR.

Detekce DNA metodou PCR je také pro naše pracoviště vhodnější i z ekonomických důvodů protože jsou vyšetřovány jednotlivé vzorky od pacientů dle požadavků kliniků. Výchozím materiálem pro izolaci DNA k přípravě vlastní modifikace metody PCR byl obsah jaterních abscesů získaných ze zavedených drenů.

Průkaz DNA mikroorganismů ze stolice je složitější než izolace z jiných biologických materiálů, neboť je zda obsaženo velké množství inhibitorů. Pro zvýšení senzitivity námi zaváděné metody jsme se pokusili zvýšit počet prvoků (především cyst) ve vzorku připraveném k izolaci DNA. Nejprve jsme provedli koncentraci metodou dle Fausta a poté k eliminaci případných inhibitorů trojnásobné promývání fyziologickým roztokem. Vyšetřený soubor je dosud velmi malý, ale přesto jsme zatím nezaznamenali žádnou inhibici PCR reakce.

Metoda PCR je výhodná také z důvodu, že DNA lze izolovat i z obsahu suspektních abscesů obsahujících již pouze rozpadlé améby a potvrdit tak rychle diagnózu extraintestinální amébozy, i když mikroskopicky v těchto případech nelze v buněčném detritu (např. materiál z drenu) intaktní améby prokázat.

Rychlý a specifický průkaz DNA a rozlišení améb *Entamoeba histolytica sensu lato* ve stolici považujeme za důležité především z hlediska včasné léčby intestinální formy onemocnění, abychom tak předešli invazi améb do extraintestinálních orgánů a vzniku infekce se závažným průběhem.

3. Laboratorní diagnostika patogenních

Leptospir: výsledky s diskusí

V parazitologické laboratoři Ústavu klinické mikrobiologie je prováděna sérologická laboratorní diagnostika leptospirových infekcí metodou mikroaglutinace-lýza pro Hradecký a Pardubický kraj a pro část kraje Vysočina. V tabulce č. 11 je uveden přehled pozitivních výsledků detekce protilátek proti sérovarům patogenních leptospir od roku 1999 až do konce prvního pololetí roku 2005. Někteří pacienti reagovali v reakci MAL s více kmeny leptospir (zkřížené reakce) a proto počet pozitivních pacientů neodpovídá počtu reakcí s jednotlivými kmeny.

Tab. 11 **Pozitivní sérologické nálezy v testu mikroaglutinace-lýza (MAL)**

Kmeny	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	Celkem vyšetřeno	% pozitivních	Počet nemocných
1999	3	3	0	0	0	0	0	0	785	0,38	3
2000	2	4	2	2	0	0	1	0	713	0,84	6
2001	31	28	12	12	8	9	1	2	922	4,66	43
2002	12	10	11	11	5	8	4	0	1 012	2,47	25
2003	12	9	4	5	3	6	3	2	773	2,19	17
2004	4	3	6	6	1	0	0	0	681	1,62	11
1.pol.2005	3	3	2	2	0	0	0	0	288	2,08	6

Vysvětlivky:

kmen č. 1 = *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava

kmen č. 2 = *L. copenhageni* Lebe

kmen č. 3 = *L. grippityphosa* P 125

kmen č. 4 = *L. grippityphosa* Ž 6

kmen č. 5 = *L. sejroe*

kmen č. 6 = *L. istrica* J 20,

kmen č. 7 = *L. bratislava* Jež

kmen č. 8 = *L. pomona* Šimon

Od prosince roku 2002 jsme do rutinní laboratorní diagnostiky zavedli metodu polymerázové řetězové reakce pro detekci DNA patogenních leptospir genomospecies *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* a *L. kirschneri*.

V tabulce 12 je uveden přehled biologických materiálů vyšetřených od prosince roku 2002 do konce června roku 2005. Celkem bylo vyšetřeno metodou PCR k detekci DNA patogenních leptospir 166 vzorků biologického materiálu od 110 osob (muži n = 62, ženy n = 48). Věk vyšetřených osob: 0 – 82, (medián 32, průměr: 35,5 roků).

V souboru vyšetřených osob je zařazen i jeden novorozenec matky s podezřením na leptospirózu v období porodu, které bylo později potvrzeno sérologicky.

Tab. 12 **Přehled vzorků biologického materiálu osob vyšetřených metodou PCR**

Plazma	75
Moč	70
Likvor	17
BAL	3
Biopsie uzliny	1
Vzorků celkem:	166
Vyšetřené osoby celkem:	110

V následující tabulce č. 13 je přehled výsledků detekce DNA patogenních leptospir metodou PCR v biologických materiálech od pacientů.

Tab. 13 **Výsledky detekce DNA patogenních leptospir metodou PCR**

Biologický materiál	PCR vyšetření celkem	PCR pozitivní	PCR negativní
plazma	75	2	73
Moč	70	4	66
Likvor	17	0	17
BAL	3	1	2
biopsie uzlin	1	0	1
Celkem	166	7	159

Vysvětlivky: BAL= bronchoalveolární laváž

Kazuistika č. 1

Pacient, muž, věk 29 let, byl hospitalizován pro horečnatý stav, kašel a progredující dušnost, pro kterou byla zahájena řízená plicní ventilace. V týdnu před hospitalizací udává subfebrilie, bolesti hlavy, popisuje „chřipkové“ onemocnění. V den hospitalizace 27.5.2005 byly odebrány vzorky krve, moči a bronchoalveolární laváže na vyšetření pro suspektní leptospirózu a zahájena léčba antibiotiky (Augmentin, Klacid).

Tab. 14 **Výsledky vyšetření biol. materiálů** odebraných dne 27.5.2005

Biologický materiál	PCR G1/G2	PCR B64 I/II	Kultivace 27.5.-3.6.	Sérologické vyšetření MAL
BAL	POZ	NEG	kontaminace	
Plazma	POZ	NEG	POZ	NEG kmény 1-8
Moč	POZ	NEG	kontaminace	

Pro sledování vývoje onemocnění z hlediska laboratorní diagnostiky byly odebírány stejné biologické vzorky s odstupem 3 až 7 dní. Výsledky laboratorních testů z jednotlivých odběrů jsou popsány v tabulkách 14 – 16.

Tab. 15 **Biologické materiály odebrané 1.6.2005**

Biologický materiál	PCR G1/G2	PCR B64 I/II	Kultivace 1.6. – 8.6.	Sérologické vyšetření MAL
BAL	NEG	NEG	NEG	
Plazma	NEG	NEG	NEG	Kmen č.1 = 1 : 400 Kmen č.2 = 1 : 200 Kmeny č. 3 – 11 NEG
Moč	NEG	NEG	NEG	

Tab. 16 **Biologické materiály odebrané 3.6.2005**

Biologický materiál	PCR G1/G2	PCR B64 I/II	Kultivace 3.6 – 10.6.	Sérologické vyšetření MAL
BAL	NEG	NEG	NEG	
Plazma	NEG	NEG	NEG	Kmen č.1 = 1 : 1 600 Kmen č.2 = 1 : 800 Kmeny č. 3 – 11 NEG
Moč	NEG	NEG	NEG	

Výsledky PCR reakcí pro detekci DNA patogenních leptospir byly ze dne 1.6. a 3.6. 2005 opakovaně negativní a dochází k vzestupu titru protilátek proti sérovarům *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava a *L. copenhageni* Lebe, proto bylo dne 9.6. a 16.6. odebráno již pouze krevní sérum ke sledování vzestupu titru protilátek.

V krevním séru pacienta odebraném dne 9.6. 2005 byl zaznamenán další vzestup protilátek proti sérovaru *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava (1 : 3 200) a sérovaru *L. copenhageni* Lebe (1:1 600). Ostatní sledované sérovary 3-11 byly negativní.

Dne 16.6.2005 bylo odebráno opět krevní sérum pro reakci MAL s následujícím výsledkem: sérovar *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava 1 : 6 400 a sérovar *L. copenhageni* Lebe 1 : 1 600.

Poslední kontrolní vyšetření bylo provedeno dne 23.6.2005. kdy byla odebrána moč na PCR a kultivaci a krevní sérum pro reakci MAL. Výsledky PCR i kultivace (23.6. – 1.7.) byly negativní a v reakci MAL bylo dosaženo titrů: *Leptospira icterohaemorrhagiae* Fryšava 1 : 6 400 a *Leptospira copenhageni* Lebe 1 : 3 200.

Kazuistika č. 2

Muž 25 roků, přijat dne 21.9.2002 na interní oddělení okresní nemocnice s anamnézou týden trvajících chřipkových příznaků, horečky s třesavkou, postupně nastává silný kašel s expektorací žlutých hlenů, později s hojnou příměsí krve, hemoptýza a dušnost. Byla stanovena diagnóza: těžká pneumonitida – „respiratory distress syndrom“ (řízená plicní ventilace 28 dnů), aseptická meningitida, „hepatitis – like syndrom“, akutní parainfekční intersticiální nefritida, vaskulopatie s hemoragickou diatézou, disseminovaná intravaskulární koagulopatie s výraznou intravaskulární hemolýzou.

Při přijetí dominovaly příznaky „atypické pneumonie“, a proto službu konající lékař zahájil ihned intravenózní terapii antibiotiky: nejdříve Augmentin a Klacid, později (rozvoj nozokomiální infekce) Ciprofloxacín, Cefotaxim, Kolimicin a Vankomycin.

21.9. (v den přijetí) byly odebrány četné vzorky pro laboratorní vyšetření a rovněž pro sérologické vyšetření na přítomnost protilátek proti patogenním leptospirám. Výsledky reakce MAL:

1. sérovar *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava 1 : 1 600
2. sérovar *L. copenhageni* Lebe 1 : 100

Na základě výsledků byla stanovena diagnóza: Weilova nemoc.

24.9.2002 byly po domluvě s ošetřujícím lékařem odebrány vzorky biologických materiálů (krevní plazma, BAL, likvor a moč) k testování přítomnosti DNA patogenních leptospir (v rámci zavádění metody). Výsledky PCR vyšetření uvedených materiálů byly negativní.

27.9.2002 jsme opět vyšetřili krevní sérum reakcí MAL na přítomnost protilátek proti patogenním leptospirám s následujícím výsledkem:

1. sérovar *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava 1 : 3 200
2. sérovar *L. copenhageni* Lebe 1 : 200

8.10.2002 výsledky reakce MAL:

1. sérovar *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava 1 : 6 400
2. sérovar *L. copenhageni* Lebe 1 : 400

Po 32 dnů trvajících hospitalizaci propuštěn z nemocnice.

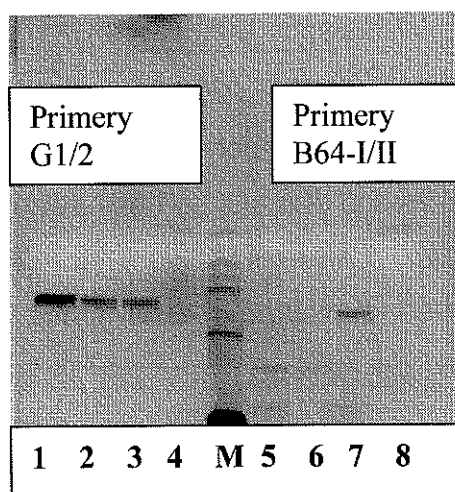
Kazuistika č. 3

Pacient, muž, věk 52 let byl přijat dne 30.8.2004 na pracoviště resuscitace a intenzivní péče fakultní nemocnice s multiorgánovým selháváním, po několik dnů trvajícím febrilním stavu se zhoršující se funkcí respiračního systému, renálních funkcí, s příznaky postižení CNS (pacient předchozí dny odmítal hospitalizaci). Při přijetí odebrány vzorky biologických materiálů včetně krevní plazmy a moči k vyšetření na přítomnost DNA patogenních leptospir metodou PCR.

Při přijetí dne 30.8.2004 bylo rovněž odebráno krevní sérum pro provedení reakce MAL. Výsledek byl se všemi 11 kmeny, včetně sérovarů *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava a *L. copenhageni* Lebe, negativní.

Dne 31.8.2004 – výsledky PCR reakce včetně popisu jsou demonstrovány na následující fotografii. Byla prokázána DNA patogenních leptospir v krevní plazmě a v moči pacienta. Reakce je při srovnání intenzity vybarvení pozitivní kontroly (cca 200 leptospir/1ml) a DNA izolované od pacienta, nejvýraznější v krevní plazmě pacienta.

Dne 1.9.2004 – i přes intenzivní adekvátní antibiotickou a podpůrnou terapii pacient zemřel (Morbus Weili, multiorgánové selhání).



Vysvětlivky:

- 1 plazma – pozitivní
- 2 moč – pozitivní
- 3 pozitivní kontrola = DNA cca 200 leptospir sérovar *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava
- 4 negativní kontrola = destilovaná voda

- M marker à 50 bp
- 5 plazma – negativní
- 6 moč – negativní
- 7 pozitivní kontrola = DNA cca 120 leptospir *L. grippityphosa* P 125
- 8 negativní kontrola

Vzhledem k obtížím při diagnostice leptospirózy jsme v roce 2002 zavedli do laboratorní praxe na společném pracovišti ÚKBD a ÚKM detekci DNA patogenních leptospir metodou PCR. Zkušenosti, které jsme do současné doby získali potvrzují, v souladu s některými literárními zdroji (17, 24), že výsledek laboratorního vyšetření PCR metodou je limitován nejen klinickou indikací, ale také dodržením správného postupu při odběru biologického materiálu. Pro přímý průkaz leptospir metodou PCR je důležité odebírat (pokud lze podmínku dodržet) všechny typy vzorků před zahájením antibiotické terapie.

V našich výsledcích kazuistiky č. 1, které jsou uvedeny v tabulkách č. 14, 15 a 16 můžeme sledovat postupný vzestup titru protilátek proti sérovarům *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava a *L. copenhageni* Lebe.

Tabulka č. 14 uvádí pozitivní výsledky PCR reakce ve všech třech typech biologických materiálů (BAL, plazma, moč) od pacienta v době, kdy reakce mikroaglutinace lýzy pro průkaz protilátek byla negativní. Výsledky v tabulce č. 15 dokumentují, že po čtyřech dnech účinné antibiotické terapie již nelze DNA patogenních leptospir detekovat, přičemž výsledek sérologického vyšetření je na hranici positivity (titry 1:200; 1:400). Časový interval po několika dnech antibiotické terapie můžeme z hlediska stanovení laboratorní diagnózy považovat za značně problémový, neboť DNA již nelze prokázat a specifické imunoglobuliny se teprve začínají tvořit. V těchto případech („hraniční titry protilátek“) při negativním výsledku detekce DNA patogenních leptospir je třeba, s odstupem několika dnů sérologické vyšetření opakovat.

Bakteriemie při leptospiróze nastává za 3-8 dní po proniknutí leptospir do organismu hostitele, kdy se leptospiry vyskytují především v plazmě a postupně přecházejí do ledvin, popřípadě i do likvoru.

Podezření na leptospirózu u člověka vzniká při prudce se rozvíjejícím horečnatém stavu provázeném třesavkou, zimnicí, bolestmi svalstva a hlavy, zánětem plic, hepatorenálním postižením, krvácivými projevy, gastrointestinálními potížemi, konjunktivitidou a dalšími příznaky.

Na počátku horečnatého období, ve stádiu bakteriemie, je doporučován především odběr krevní plazmy na přímou detekci DNA patogenních leptospir metodou PCR a popřípadě kultivaci. Při příznacích meningitidy je možné pokusit se o průkaz DNA *Leptospira sp.* přímo z likvoru k objasnění etiologie infekce. Podezření na renální postižení leptospirového původu potvrdí nebo vyloučí PCR vyšetření moči odebrané koncem prvního týdne onemocnění, kdy lze očekávat průnik leptospir do ledvin. Suspektní leptospirovou pneumonii může potvrdit vyšetření bronchoalveolární laváže metodou PCR (90,123).

Úspěšnost přímého laboratorního průkazu leptospir v klinickém materiálu závisí do značné míry i na tom, zda se podaří odebrat materiál ještě před zahájením léčby antibiotiky nebo alespoň v jejím začátku. Jestliže materiál není možné odebrat před nasazením terapie antibiotiky a ihned odeslat ke zpracování do laboratoře (víkend a podobně), odebereme vzorky ve větším množství a uložíme na nezbytně nutnou dobu v chladničce tak, aby doba od odběru do izolace DNA nepřekročila 48 hodin. Vzhledem ke skutečnosti, že nelze přesně odhadnout, zda je pacient ještě v období bakteriemie nebo již leptospiry vymizely z krevního oběhu a vylučují se pouze močí, doporučujeme současně odběr nesrážlivé krve i moči na průkaz DNA metodou PCR. Protože metoda PCR prokazuje přítomnost DNA patogenních leptospir bez stanovení sérovaru, je k určení konkrétního původce třeba provést ještě sérologické vyšetření, které je nutné z důvodů epidemiologických. V průběhu antibiotické terapie je vhodný průkaz infekce pomocí vyšetření specifických protilátek, kdy by měl být respektován odběr dvou vzorků séra získaných s odstupem přibližně 2-3 týdny. Vzestup nebo pokles titru protilátek informuje jednak o vývoji onemocnění, a jednak současně potvrdí výsledky přímého průkazu původce.

V tabulce č. 11 jsou uvedeny sérologické průkazy leptospirových infekcí ve spádové oblasti naší laboratoře, jejichž počet je vyšší než celorepublikový průměr. Důležitým faktorem vyššího počtu u nás laboratorně diagnostikovaných leptospiróz (více než pětinasobný vzestup v roce 2001 oproti předchozím rokům) je skutečnost, že v roce 2000 byla oblast severovýchodních Čech postižena rozsáhlými povodněmi. Vyšší záchytnost zůstává i v dalších letech, což souvisí patrně i se skutečností, že od roku

2001 každý suspektní nález (i podhraniční titry protilátek) ověřujeme ve spolupráci s klinickým pracovištěm a eventuálně doplňujeme vyšetřením PCR. Naše pozorování potvrzuje skutečnost, že v počátcích onemocnění jsou protilátky zjišťované metodou MAL často na hranici průkaznosti. Opakované sérologické vyšetření v mnoha případech potvrdí diagnózu leptospirózy (90,134,136).

Řada zahraničních autorů popisuje první klinické příznaky Weilovy nemoci jako horečku s hemoragickými projevy a dominujícími příznaky hepatorenálního postižení (67,87,116,129). Častý je ovšem i začátek onemocnění se závažnými příznaky postižení respiračního systému až rozvojem těžké pneumonitidy („respiratory distress syndrom“). Při prvních klinických vyšetřeních bývá postižení plic diagnostikováno jako atypická pneumonie. Rychle však dochází k rozvoji respirační insuficience, takže často je nutné zavést umělou plicní ventilaci (23,90,115,123). Popisy případů vybraných z našeho souboru pacientů demonstrují nutnost pomýšlet na onemocnění leptospirózou při rychle se rozvíjející respirační insuficienci provázené horečkou neboť včas neléčená infekce končí asi v 5-10% případů fatálně.

Po proběhlém onemocnění leptospirózou popisují někteří autoři výskyt postižení oka formou pro leptospirózu typické uveitidy (107,108). K vyloučení pozdních následků po leptospiróze bylo proto u našich pacientů, po propuštění do domácího ošetření, doporučeno následné sledování očním lékařem.

Onemocnění leptospirózou je rozšířeno po celém světě, častěji v tropických a subtropických oblastech. Práce ve vlhkém a hlodavci kontaminovaném prostředí, rozvoj turistiky, provozování sportů v extrémních podmínkách, živelné pohromy a další faktory zvyšují možnost vzniku infekce i v naší populaci.

Na základě vlastních zkušeností laboratorního pracovníka uzavírám dizertační práci konstatováním, že zavedení dostatečně citlivých a spolehlivých laboratorních metod je pro stanovení diagnózy nejen leptospirových, ale i dalších infekcí nezbytné.

ZÁVĚRY PRO PRAXI

1. **Molekulární biologické metody** na bázi polymerázové řetězové reakce mají nezastupitelné místo v mikrobiologických laboratořích při diagnostice infekčních onemocnění. Laboratorní i klinické výsledky experimentální části dizertační práce potvrdily předpoklad, že detekce DNA patogenního mikroorganismu je ve většině případů důkazem právě probíhající nebo nedávno proběhlé infekce. Nespornou výhodou molekulárních biologických metod je rychlost provedení a vysoká senzitivita a specificita reakce. Po stránce ekonomické vyžadují molekulární genetické metody především vysoké náklady na stavební a přístrojové vybavení laboratoří. Laboratoře a přístroje však mohou být využívány pro identifikace nukleových kyselin celého spektra obtížně kultivovatelných mikroorganismů (virů, bakterií, protozoí).

2. Přímý průkaz DNA prvoka *Toxoplasma gondii* je významný především pro rizikové kategorie pacientů: plod gravidní ženy, pacienti s imunosupresí, pacienti s atypickým, případně se závažným průběhem toxoplazmózy a novorozenci s podezřením na kongenitální toxoplazmózu. Pro rizikové pacienty je stanovení rychlé diagnózy předpokladem účinné a včasné léčby toxoplazmózy a prevencí možných komplikací. Výrazně imunosuprimovanou a tedy ohroženou skupinou osob jsou pacienti po transplantaci orgánů i buněk (průkaz DNA *T. gondii* v autologních progenitorových buňkách). Zkušenosti publikované zahraničními i našimi autory potvrzují, že poškození plodu kongenitální toxoplazmózou je častější než jinými infekčními agens (rubeola, lues, herpes simplex a další). Rozšíření toxoplazmózy u nás je zřejmě podobné jako ve Francii, kde probíhá povinné preventivní sérologické vyšetřování těhotných žen, které je v případě positivity markerů akutní infekce (IgM, IgA, IgE) doporučováno konfirmovat

detekcí DNA *T. gondii*. Domníváme se proto, že podobný systém vyšetření gravidních žen by mohl být přínosný i v České republice.

3. Rychlá a relativně jednoduchá metoda detekce DNA a rozlišení patogenní ***Entamoeba histolytica*** a nepatogenní ***Entamoeba dispar*** představuje možnost včasné diagnostiky nebezpečného původce amébové dyzentérie. Přesné stanovení diagnózy je významné zvláště u osob, které pobývaly v oblastech tropů a subtropů, kde jsou tyto původci velmi rozšířeni. Včasná detekce přítomnosti patogenního prvoka *Entamoeba histolytica* ve střevě předejde možné invazi améby do dalších orgánů a vzniku extraintestinální formy onemocnění.
4. Průkaz DNA patogenních leptospir - sérovarů ***Leptospira*** species vyskytujících se na našem území metodou PCR je významný z hlediska klinického i epidemiologického. Včasná diagnostika leptospiroz u člověka je komplikovaná, neboť na počátku onemocnění se vyskytuje tzv. „diagnostické okno“, kdy sérologickými metodami nelze přibližně 7-10 dnů detekovat protilátky. Právě v tomto období je stanovení diagnózy pro pacienta a jeho léčbu nezbytné. Naše výsledky prokazují, že správně aplikované vyšetření biologického materiálu metodou PCR může diagnostiku leptospiroz urychlit a v případě pozitivního výsledku diagnózu jednoznačně potvrdit. Z důvodů epidemiologických je nutné vyšetření PCR doplnit určením jednotlivých sérovarů leptospir.
5. Výsledky dizertační práce jsem zpracovala do 8 sdělení v recenzovaných mikrobiologických a lékařských časopisech a přednesla na Mezinárodním mikrobiologickém sjezdu v Brně (2004) i na I. International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology, Badajoz, Spain (2005). Průběžně je o výsledcích a jejich významu pro diagnostiku toxoplazmózy informováno každoročně formou přednášek na Konzultačním dnu NRL pro toxoplazmózu v Praze.

◆

PUBLIKACE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Čermáková, Z., Stach J., Ryšková, O. Weilova nemoc: těžký průběh s respirační insuficiencí. Čas Lek Česk., 2004; 143 (10):705-707.

Čermáková Z., Plíšková L., Ryšková O., Prausová P., Prášil P., Hanovcová, I. Originální metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) v diagnostice leptospirózy. Lékařské zprávy Lékařské fakulty UK v Hradci Králové. 49, No. 5-6, 2004, 207-213.

Čermáková Z., Prášil P., Ryšková O. Parazitologická laboratorní diagnostika: přínos pro klinickou praxi. Lékařské zprávy Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. 49, no.3-4, 2004, 119-127.

Čermáková Z., Plíšková, L., Ryšková O. Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) v diagnostice toxoplazmózy. Acta Medica (Hradec Králové) Supplementum, č. 47, no. 2, 2004, 71-73.

Čermáková Z., Prášil, P., Ryšková, O. Kongenitální toxoplazmóza: možnosti laboratorní diagnostiky. Epidemiol.Mikrobiol.Imunol., 54, 2005, č.2., 75-77.

Cermakova, Z., Ryšková O. et al.: Diagnosis of Lyme borreliosis using enzyme immunoanalysis. Medical Science Monitor in Basic Research (Internat. Med. J. for Experimental and Clinical Research), 2005, vol.11, no 4, 121-125

Čermáková, Z., Ryšková, O., Plíšková, L.: Polymerase Chain Reaction for Detection of *Toxoplasma gondii* in Human Biological Samples. Folia Microbiologica, 50(4),2005.

Čermáková, Z., Ryšková, O., Plíšková, L.: Laboratory diagnosis of Leptospirosis. Folia Microbiologica.50(4),2005.

Abstrakta:

Cermákova Z.: Laboratory Diagnosis of *T. gondii* Human Infection (Antibodies and DNA). BioMicro World. Badajoz (Spain), Book of Abstracts, 2005, 881.

PŘEDNÁŠKY A POSTERY K DIZERTAČNÍ PRÁCI

Mezinárodní

1. Int. Conf. Envir. Indust. Appl. Microbiol. Badajoz (Spain), March, 2005, poster; Cermakova Z.: Laboratory Diagnosis of *T. gondii* human infection (antibodies and DNA).
2. 23. kongres Československé společnosti mikrobiologické, Brno, 6.-9. září 2004. Čermáková, Z.: Laboratorní diagnostika leptospiroz. Poster. Bulletin Čs. společnosti mikrobiologické, XXXV, 2004:25.
3. 23. kongres Československé společnosti mikrobiologické, Brno, 6.-9. září 2004. Čermáková, Z.: PCR v diagnostice toxoplazmózy. Bulletin Čs. společnosti mikrobiologické, XXXV, 2004:24.

Celostátní

1. Konzultační den NRL pro toxoplazmózu. Praha 11.12.2002. Čermáková, Z., Plíšková, L: Zařazení metody PCR v diagnostice *Toxoplasma gondii*.
2. Konzultační den NRL pro toxoplazmózu. Praha 15.12.2004 Čermáková, Z.: *Toxoplasma gondii* – laboratorní vyšetření prováděná ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové.
3. Pracovní den Společnosti lékařské genetiky ČLS J.E. Purkyně: „Kaprásův den – Klinická genetiká“. 24.3.2004, Lékařský dům, Praha. Čermáková, Z., Plíšková, L., Kodym, P.: Laboratorní diagnostika toxoplazmózy.

Regionální

1. Regionální seminář mikrobiologů, Fakultní nemocnice Hradec Králové, 21.5.2002, registrovaný ČLK. Čermáková, Z., Plíšková, L., Kodym, P.: Zařazení metody PCR v diagnostice *Toxoplasma gondii*.
2. Regionální seminář mikrobiologů, Fakultní nemocnice Hradec Králové, 19.4.2004. Čermáková, Z.: Leptospiry a jejich diagnostika.

♠

LITERATURA

1. Abdel Hameed DM, Helmy H.: Avidity IgG: diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection by indirect immunofluorescent test. *J Egypt Soc Parasitol*,2004,34(3):893-902.
2. Alanen A.: Polymerase Chain Reaction in the Detection of Microbes in Amniotic Fluid. *Ann Med* 1998,30:288-95.
3. Aouizerate F, Cazenave J, Poirier L, Verin Ph, Cheyrou A et al.: Detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humour by the polymerase chain reaction. *Br J Ophtalmol* 1993,77:107-109.
4. Ashburn D, Joss LWA., Pennington HT, Ho-Yen O.D.: Do IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of toxoplasma infection in pregnancy? *J Clin Pathol* 1998, 51:312-315.
5. Awady MK, Hosseiny LA, Ismail SM, Abdel-Aziz MT, Demellaway MA.: Comparison between *Toxoplasma gondii* DNA and specific immunoglobulins during pregnancy. *East Mediterr Health J* 2000,6:888-97.
6. Bal AE, Gravekamp, C, Hartskeerl RA, De Meza-Brewster J, Korver H, Terpstra W J.: Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol*, 1994,32,8:1894 – 1938.
7. Bálint O.: Leptospirosy, Princípy internej medicíny, Bratislava, SAP,2001:2458-2465.
8. Barocchi MA, Ko AI, Ferrer SR, Faria MT, Mitermayer RG, Riley LW.:Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni and its application to PCR-based differentiation of *Leptospira* serogroups. *J Clin Microbiol* 2001,39,1,191-195.
9. Bastien P.: Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Transactions of the Royal society of Tropical medicine and hygiene* 2002;96 (Suppl 1): 205-215.
10. Bednář M, Fraňková V, Schindler J, Souček A, Vávra J.: *Lékařská mikrobiologie*. Marvil 1996.

11. Belanger F, Derouin F, Grangeot-Keros L, Mayer L.: Incidence and Risk Factors of Toxoplasmosis in a Cohort of Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients:1988-1995. *Clin Inf Dis* 28,1999, 575-581.
12. Bharti AR, Nalli JE, Ricaldi JN et al.: Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Infect Dis*, 2003,3, (12), 757-771.
13. Blessmann J, Buss H, Ton Nu Phuong Aet al.: Real-Time PCR for Detection And Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Fecal Samples, *J Clin Microbiol*, Dec. 2002,4413-4417.
14. Bowsher B, Callahan W, Person A, Ruess L.: Unilateral Leptospiral Pneumonia and Cold Agglutination Disease. *CHEST*,1999,116,830-832.
15. Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, et al.: Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. And four new *Leptospira* genomospecies. *Inter J System Bacteriol*, 1999, 49,839-858.
16. Bretagne S, Costa JM, Fleury-Feith J, et al.: Quantitative Competitive PCR with Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosis of Toxoplasmosis in AIDS Patients 1995,33(6):1662-1664.
17. Bretagne S, Costa JM, Kuentz M, et al.: Late toxoplasmosis evidenced by PCR in a marrow transplant recipient. *Bone Marrow Transplant* 1995,15:809-811.
18. Bretagne S, Costa JM, Vidaud M, Nhieu JT, Fleury-Feith J.:Detection of *Toxoplasma gondii* by Competitive DNA Amplification of Bronchoalveolar Lavage Samples. *J Inf Dis* 1993,168,1585-1588.
19. Brézine AP, Egwuagu ChE, Burnier M, Silveira C, Mahdi RM et al.:Identification of *Toxoplasma gondii* in Paraffin-Embedded Sections by the Polymerase Chain Reaction. *Am J Ophtalmol* 1990,110:599-604.
20. Burg LJ, Grover MCH, Pouletty P, Boothroyd JC.. Direct and Sensitive Detection of a Pathogenic Protozoan, *Toxoplasma gondii*, by Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* 1989,27:1787-1792.
21. Cazenave J, Forestier F, Bessieres MH, Broussin B, Begueret J.: Contribution of a New PCR Assay to the Prenatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *Prenat Diagn* 1992,12:119-127.

22. Čermáková Z., Prášil, P., Ryšková, O.: Kongenitální toxoplazmóza: možnosti laboratorní diagnostiky. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 2005,54,2, 75-77.
23. Čermáková, Z., Stach J., Ryšková, O.: Weilova nemoc: těžký průběh s respirační insuficiencí. *Čas Lek Česk*, 2004,143 (10):705-707.
24. Čermáková Z., Plíšková L., Ryšková O., Prausová P., Prášil P., Hanovcová, I.: Originální metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) v diagnostice leptospirózy. *Lékařské zprávy Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové*, 2004,49,5-6:207-213.
25. Čermáková Z., Plíšková, L., Ryšková O.: Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) v diagnostice toxoplazmózy. *Acta Medica (Hradec Králové) Supplementum*, 2004, 47,2:71-73.
26. Cerri D, Ebani VV, Fratini F et al.: Epidemiology of leptospirosis: Observations on serological data obtained by a „diagnostic laboratory for leptospirosis“ from 1995 to 2001. *New Microbiol* 2003,26(4):383-389.
27. Clark CG and Diamond LS: Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance, *Clinical Microbiology Reviews*, July 2002,15,3:329-341.
28. Collier L, Albert Balows, Max Sussman: Topley & Wilson's *Mikrobiology and Microbial Infections*, volume 5 PARASITOLOGY, Great Britain 1998.
29. Cristina N, Liaud MF, Santoro F, Oury B, Ambroise-Thomas P.: A Family of Repeated DNA Sequences in *Toxoplasma gondii*: Cloning, Sequence Analysis, and Use in Strain Characterization. *Experimental Parasitology* 1991,73:73-81.
30. Cristina N, Pelloux H, Goulhot C, Brion JP, Leclercq P et al.: Detection of *Toxoplasma gondii* in AIDS Patients by the Polymerase Chain Reaction. *Infection* 1993,21(3):150-153.
31. Čatár G, Červeň D, Jalili N. *Toxoplasma gondii*. *Bratisl Lek Listy* 1998,99:579-583.
32. Daher FE, Zanetta DM, Abdulkader RC.: Pattern of renal function recovery after leptospirosis acute renal failure. *Nephron Clin Pract*, 2004,98(1):8-14.
33. Dostál V a kol.: *Infektologie*, Karolinum, 2004, ISBN 80-246-0749-2.
34. Dupont H, Dupont-Perdrizet D, Perié JL et al.: Leptospirosis: prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis* 1997,25:720-724.

35. Dupon M, Cazenave J, Pellegrin JL, Ragnaud JM, Cheyrou A et al. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and Tissue Culture in Cerebrospinal Fluid and Blood of Human Immunodeficiency Virus-Seropositive Patients. *J Clin Microbiol* 1995,33(9):2421-2426.
36. Dupouy-Camet J, Bougnoux ME, Lavareda de Souza S et al.: Comparative value of polymerase chain reaction and conventional biological tests for the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Ann Biol Clin* 1992,50:315-319.
37. Dupouy-Camet J, Lavareda de Souza S, Maslo C, Paugam A, Saimot AG. Detection of *Toxoplasma gondii* in Venous Blood from AIDS Patients by Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* 1993,31(7):1866-1869.
38. Espinosa-Cantellano M., Martínez-Palomo A.: Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease, *Clin Microbiol Rev*, 2000,13,(2):318 – 331.
39. Evangelopoulos A, Legakis N, Vakalis N: Microscopy, PCR and ELISA applied to the epidemiology of amoebiasis in Greece. *Parasitology International* 2001,50: 185-189.
40. Evangelopoulos A, Spanakos G, Patsoula E, Vakalis N, Legakis N: A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 2000,94(3):233-240 .
41. Fakahany el AF, Abdel-Maboud AI, Garhy el MF, Fraky MA: Comparative study between ELISA IgG, IgM and PCR in diagnosing and studying toxoplasmosis in Qalyobia Governorate, Egypt *J Egypt Soc Parasitol* 2002, 32(2):475-486.
42. Foudrinier F, Villena I, Jaussaud R, Aubert D, Chemla C et al.: Clinical Value of Specific Immunoglobulin E Detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Cases of Acquired and Congenital Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2003,41(4):1681-1686.
43. Foulon W, Naessens A, Derde MP.:Evaluation of the possibilities for preventing congenital toxoplasmosis. *Am J Perinatol* 1994,11:57-62.
44. Foulon W, Villena T, Stray-Pedersen B et al.: Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: A multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *Am J Obstet Gynecol* 1999,180:410-415.
45. Franzen C, Altfeld M, Hegener P et al.: Limited Value of PCR for Detection of *Toxoplasma gondii* in Blood from Human

Immunodeficiency Virus-Infected Patients. J Clin Microbiol 1997,35(10):2639-2641.

46. Friedecký B, Plíšková L, Hrochová K, Palička V.: Současné programy mezilaboratorního porovnávání zkoušek v molekulární biologii, Klin Biochem Metab,2003,12 (33):1-3.
47. Fuentes I, Rubio JM, Ramírez C, Alvar J.: Genotypic Characterization of *Toxoplasma gondii* Strains Associated with Human Toxoplasmosis in Spain: Direct Analysis from Clinical Samples. J Clin Microbiol 2001,39(4):1566-1570.
48. Garcia L. S. : Diagnostic Medical Parasitology, ASM Press, American Society of Microbiology, Washington, DC 2001.
49. Gomes MA, Pesquero JB, Furst C, Valle PR, Pesquero J.L. : An improved method to distinguish *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*, Parasitology 1999,119: 359-362.
50. Gomes MA, Silva EF, Macedo AM, Vago AR, Melo MN: LSSP-PCR for characterization of strains of *Entamoeba histolytica* isolated in Brazil, Parasitology, 1997,114:517-520.
51. Gratzl R, Hayde M, Kohlhauser C, Hermon M, Burda G.: Follow-Up of Infants with Congenital Toxoplasmosis Detected by Polymerase Chain Reaction Analysis of Amniotic Fluid. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998,17:853-858.
52. Gravekcamp C, Van De Kemp H, Franzen M et al.: Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. J Gen Microbiol, 1993, 139:1691-1700.
53. Greco P, Vimercati A, Angelici MC, Carbonara S, Doria G.: Toxoplasmosis in pregnancy is still an open subject. J Perinat Med 2003,31:36-40.
54. Gross U, Roggenkamp A, Janitschke K, Heesemann J.: Improved Sensitivity of the Polymerase Chain Reaction for Detection of *Toxoplasma gondii* in Biological and Human Clinical Specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992,11(1):33-39.
55. Guay JM, Dubois D, Morency MJ et al.: Detection of the Pathogenic *Toxoplasma gondii* by Specific Amplification of Ribosomal Sequences Using Comultiplex polymerase Chain Reaction. J Clin Microbiol 1993,31(2):203-207.
56. Guo ZG, Gross U, Johnson AM.: *Toxoplasma gondii* virulence markers identified by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. Parasitol Res 1997,83:458-463.

57. Guy EC, Joynson DHM.: Potential of the Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Active *Toxoplasma* Infection by Detection of Parasite in Blood. *J Infect Dis* 1995,172:319-322.
58. Guy EC, Pelloux H, Lappalainen M, Aspöck H, Hassl A.: Interlaboratory Comparison of Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Toxoplasma gondii* DNA Added to Samples of Amniotic Fluid. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996,15:836-839.
59. Harkin KR, Roshto YM, Sullivan JT et al.: Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospire in dogs. *J Amer Veter Med Assoc*,2003,222(9):1230-1233.
60. Hausmann K, Hülsmann N. *Protozoologie*, Academia, Praha 2003:100-104, 307.
61. Havlík J. a spolupracovníci: *Příručka infekčních a parazitárních nemocí*, Avicenum, 1985.
62. Havlík, J a kol: *Infekční nemoci*, Galén, 2. vyd.,2002, ISBN 80-7262-173-4.
63. Hitt JA, Filice GA.: Detection of *Toxoplasma gondii* Parasitemia by Gene Amplification, Cell Culture, and Mouse Inoculation. *J Clin Microbiol* 1992,30(12):3181-3184.
64. Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM et al. Prenatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis with a Polymerase-chain-reaction Test on Amniotic Fluid. *N Eng J Med* 1994,331(11):695-699.
65. Horváth R.: Dizertační práce. Infekce lymfotropními viry u pacientů po orgánové transplantaci. 1999:37-43.
66. Ho-Yen DO, Joss AWL, Balfour AH, Smyth ETM, Baird D. Use of the polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in human blood samples. *J Clin Pathol* 1992;45:910-3.
67. Chmela J., Mazánek L., Příza M. Doma chovaný potkan nakazil Weilovou nemocí své dva chovatele. *Zprávy CEM(SZÚ,Praha)*,2001;11(4):168.
68. James G, Sintchenko V, Dickeson DJ, Gilbert GL. Comparison of Cell Culture, Mouse Inoculation, and PCR for Detection of *Toxoplasma gondii*:Effects of Storage Conditions on Sensitivity. *J Clin Microbiol* 1996;34(6):1572-5.
69. Jenum PA, Holberg-Petersen M, Melby KK, Stray-Pedersen B. Diagnosis of congenital *Toxoplasma gondii* infection by polymerase

- chain reaction (PCR) on amniotic fluid samples. *APMIS* 1998;106:680-6.
70. Jenum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK et al. Incidence of *Toxoplasma gondii* Infection in 35 940 Pregnant Women in Norway and Pregnancy Outcome for Infected Women. *J Clin Microbiol* 1998;36(10):2900-6.
71. Joss AWL, Chatterton JMW, Evans R, Ho-Yen DO. *Toxoplasma* polymerase chain rection on experimental blood samples. *J Med Microbiol* 1993;38:38-43.
72. Joseph P, Calderón MM, Gilman RH, Quispe ML, Cok J et al. Optimization and Evaluation of a PCR Assay for Detecting Toxoplasmic Encephalitis in Patients with AIDS. *J Clin Microbiol* 2002;40(12):4499-503.
73. Jungersen G, Bille-Hansen V, Jensen L, Lind P. Transplacental transmission of *Toxoplasma gondii* in minipigs infected with strains of different virulence. *J Parasitol* 2001;87:108-13.
74. Khalifa KS, Roth A, Roth B, Arasteh KN, Janitschke K. Value of PCR for Evaluating Occurence of Parasitemia in Immunocompromised Patients with Cerebral and Extracerebral Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1994;32(11):2813-9.
75. Kishimoto M, Brown JD, Chung HH, Howman S.: Leptospirosis misdiagnosed as pulmonary-renal syndrome. *Am J Med Sci*, 2004,328(2),116-120.
76. Ko IA, Reis GM, Dourado RMC, Johnson DW.Jr: Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet*,1999,354:820-825.
77. Kodym P, Tolarová V. Laboratorní diagnostika toxoplazmózy. *Remedia-Klinická mikrobiologie* 1998;2(7):224-6.
78. Kostolná B., Gerinec A., Ondriska F. Diagnosis of *Toxoplasma* and *Toxocara* from the Aqueous Humor. *Čes. A slov. Oftal.*, 59, 2003, No5, 312-8.
79. Kouba K., Lasovská J., Marešová V. Toxoplazmóza a těhotenství. *Čs. Gynekol.*, 39, 1974, (6):417-9.
80. Kouba K., Obr O., Klanica J. Příspěvek k interpretaci výsledků vyšetření protilátek typu IgM u akutní toxoplazmózy v klinické praxi. *Sborník lékařský*, 84, 1982, (10): 294-301.
81. Křemen J., Pohlreich P., Stříbrná J. : *Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně*, Karolinum, Praha 1998, 33-36, 80-83.

82. Lamoril J, Molina JM, Gouvello A, Garin YJ, Deybach JC. Detection by PCR of *Toxoplasma gondii* in blood in the diagnosis of cerebral toxoplasmosis in patients with AIDS. *J Clin Pathol* 1996;49:89-92.
83. Laras K, Van C B, Bounlu K et al.: The importance of Leptospirosis in Southeast Asia. *Am J Trop Med Hyg*; 2002, 67(3):278-286.
84. Lebech M. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA by Polymerase Chain Reaction in Cerebrospinal Fluid from AIDS Patients with Cerebral Toxoplasmosis. *J Infect Dis* 1992;65:982-3.
85. Lécolier B.: Prevence kongenitální toxoplazmózy: zkušenost z francouzské praxe. *Remedia – Klinická mikrobiologie*, 1999, 3(8):248-254.
86. Lobořská A., Kouba K., Hařkovcová J., Āerná O., Obr O. Vrozená letální toxoplazmová sepe. *Ās. Gynekol.* 52, 1987;(6):454-8.
87. Luca MC, Dorobat C, Corcaci C et al.: Leptospirosis-clinical-biological and therapeutical aspects-study of 256 cases. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2002, 107(2),352-355.
88. Lucchesi P M A, Parma A E, Arroyo G H.: Serovar distribution of a DNA sequence involved in the antigenic relationship between *Leptospira* and equine cornea.: *BMC Microbiology*, 2002,2 (3),1-5.
89. Luo WT, Seki T, Yamashita K, Aosai F, Ueda M et al. Quantitative Detection of *Toxoplasma gondii* by Competitive Polymerase Chain Reaction of the Surface Specific Antigen Gene-1. *Jpn J Parasitol* 1995;44(3)183-90.
90. Marotto F C P, Nascimento R M C, Eluf-Neto J, et al. Acute lung injury in leptospirosis: Clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality. *Clin Infect Dis.*, 1999, 29, 1561-1563.
91. Mehmet Tanyuksel and William A. Petri Jr.: Laboratory Diagnosis of Amebiasis, *Clin. Microbiol. Rev.*, October, 2003; 16 (4):713 – 729.
92. Mérien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G., Saint Girons, I.: Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira spp.* in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992, roĀ. 30, Ā. 9, 2219 – 2224.
93. Montoya JG. Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis. *J Inf Dis* 2002;185(S1):73-82.
94. Montoya JG., Liesenfeld O.: Toxoplasmosis. *The Lancet*; 363(12),2004, 1965-1976.

95. Myjak P., Kur J., Pietkiewicz H., Kotlowski A., Nahorski W., Szostakowska B.: Molecular Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from Stool and Culture Samples Obtained from Polish Citizens Infected in Tropics and in Poland, *Acta Protozool.*, 2000, 39, 217 – 224.
96. Neumaier M., Braun A., Wagner Ch.: Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics, *Clin Chem* 1998, 44:1, 12-26.
97. Novati R, Castagna A, Morsica G, Vago L, Tambussi G et al. Polymerase Chain Reaction for *Toxoplasma gondii* DNA in the Cerebrospinal Fluid of AIDS Patients with focal brain lesions. *AIDS* 1994;8:1691-4.
98. Núñez Y.O., Fernández M.A., Torres-Núñez D.A., Silva J.A., Montano I., Maestre J.L., Fonte L.: Multiplex polymerase chain reaction amplification and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* DNA from stool samples, *Am. J. Trop Med. Hyg.*, 2001, 64 (5,6), 293-297.
99. Olsen C W, Vaccination of cats against emerging and reemerging zoonotic pathogens. *Adv. Vet. Med* 41:333 -346.
100. Østergaard L, Nielsen AK, Black FT. DNA Amplification on Cerebrospinal Fluid for Diagnosis of Cerebral Toxoplasmosis among HIV-positive Patients with Signs or Symptoms of Neurological Disease. *Scand J Infect Dis* 1993;25:227-37.
101. Palička P, Slabá H, Zitek K. Aktivní ovlivňování výskytu kongenitální toxoplasmózy v populaci. *Prakt Gynekol* 1998;5(1):23-7.
102. Parma, A. E., Seijo, A., Lucchesi, P. M., Deodato, B., Sanz, M. E.: Differentiation of pathogenic and non-pathogenic leptospirae by means of the polymerase chain reaction. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 1997;39,4:203 – 207.
103. Paugam A, Dupouy-Camet J, Sumuyen MH, Romand S, Lamoril J et al. Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by polymerase chain reaction in perorally infected mice. *Parasite* 1995;2:181-4.
104. Pelloux H, Guy E, Angelici MC et al. A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* involving 15 teams. *FEMS Microbiol Lett* 1998;165:231-7.
105. Pelloux H, Weiss J, Simon J, Muet F, Fricker-Hidalgo H et al. A new set of primers for the detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid using polymerase chain reaction. *FEMS Microbiology Letters* 1996;138:11-5.

106. Pujol-Riqué M, Derouin F, García-Quintanilla A, Valls ME, Miró JM, Jimenéz de Anta MT. Design of a one-tube hemi-nested PCR for detection of *Toxoplasma gondii* and comparison of three DNA purification methods. *J Med Microbiol* 1999;48:857-62.
107. Rathinam S R, Rathnam S, Selvaraj S, et al.: Uveitis associated with an epidemic outbreak of leptospirosis. *Current opinion in Ophthalmology*, 1997, 124, 71-79.
108. Rathinam S R.: Ocular leptospirosis. *Current opinion in Ophthalmology*, 2002, 13, 381-386.
109. Rivera W.L., Tachibana H., Kanbara H.: Application of the Polymerase Chain Reaction (PCR) in the Epidemiology of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* Infections, *Clin Med.*, 1999, 23 (6), 413-415.
110. Roberts F, McLeod R. Pathogenesis of Toxoplasmic Retinochoroiditis. *Parasitol Today* 1999;15(2):51-7.
111. Rodríguez JC, Martínez MM, Martínez AR, Royo G. Evaluation of Different Techniques in the Diagnosis of *Toxoplasma encephalitis*. *J Med Microbiol* 1997;46:597-601.
112. Roháčová H. In Havlík a kol. *Uzlinový syndrom*, 2002, 143-147.
113. Rosypal S. a Doškař J. : *Úvod do molekulární biologie, třetí díl*, Brno 1997,744–746.
114. Savva D, Morris JC, Johnson JD, Holliman RE. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Toxoplasma gondii*. *J Med Microbiol* 1990;32:25-31.
115. Sejvar J, Bancroft E, Winthrop K et al.: Leptospirosis in „Eco-challenge“ athletes, Malaysian Borneo, 2000, *Emerging Infectious Diseases*, 2003, 9,702-707.
116. Serratrice J, Ene N, De Roux-Serratrice C, Granel B et al.: Icteric Fort Bragg fever: A case report with nosological discussion. *Rev Med Interne*, 2004, 25(9),663-666.
117. Silva da J J, Netto B A, Lilembaum W, et al.: The hemorrhagic syndrome of leptospirosis: an experimental study in Guinea pigs. *Revista Da sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 1995, 28, 169-177.
118. Slivkova D, Gerinec A. Očné prejavy pri toxoplazmóze u dětí. *Bratislav Lek Listy* 1999;100(5):259-62.

119. Stejskal F., Nohýnková E. : Amébóza, Sanquis, č 29, 2003, 20.
120. Suzuki LA, Rocha RJ, Rossi CL. Evaluation of serological markers for the immunodiagnosis of acute acquired toxoplasmosis. J Med Microbiol 2001;50:62-70.
121. Šerý V., a kol. : Lexikon cestovní medicíny, Encyklopedický dům, 1996.
122. Treml F, Pejčoch M, Holešovská Z.: Small mammals-natural reservoirs of pathogenic leptospires. Vet Med-Czech, 2002, 47(10-11),309-314.
123. Trevejo T R, Rigau-Pérez G J, Ashford D A, et al.: Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage – Nicaragua. J Infect Dis, 1998, 178, 1457-1463.
124. Truccolo J, Serais O, Merien F, Perolat P.: Following the course of human leptospirosis: evidence of a critical threshold for the vital prognosis using a quantitative PCR assay. FEMS Microbiology letters, 2001, 204, 317-321.
125. Vaništa J.: Toxoplazmóza. In Havlík J. a kol. Infekční nemoci. Praha, Galén, 2002, 143 – 147.
126. Vaništa J.: Leptospiróza. In Havlík J. a kol. Infekční nemoci. Praha, Galén, 2002:98-99.
127. Ven VE, Melchers W, Galama J, Camps W, Meuwissen J. Identification of *Toxoplasma gondii* Infections by B1 gene Amplification. J Clin Microbiol 1991;29:2120-4.
128. Verweij J.J., Blotkamp J., Brienen E.A.T., Aguirre A., Polderman A.M.: Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* Cysts Using Polymerase Chain Reaction on DNA Isolated from Faeces with Spin Columns, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2000, 19: 358-361.
129. Viechova J, Beneš J, Duální infekce: Weilova nemoc (*Leptospira icterohaemorrhagiae*) a salmonelová sepe (*Salmonella enteritidis*) po koupání v řece. SZÚ Praha, Zprávy CEM 1999, 9, 339-340.
130. Villena I, Chemla C, Quereux Ch, Dupuoy D, Leroux B et al. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis transmitted by an immunocompetent woman infected before conception. Prenat Diagn 1998;18:1079-81.
131. Votava M. a kol.: Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun, 2003, ISBN 80-902896-6-5.

132. Weiss LM, Chen YY, Berry GJ, Strickler JG, Dorfman RF et al. Infrequent Detection of *Toxoplasma gondii* Genome in Toxoplasmic Lymphadenitis: A Polymerase Chain Reaction Study. *Human Pathology* 1992;23(2):154-8.
133. Zaki M., Verweij J. J., Clark C.G. : *E.histolytica*: direct PCR-based typing of strains using faecal DNA, *Experimental parasitology* 2003, 104,77-80.
134. Zitek K, Beneš Č, Volná L: Epidemiologie povodňové leptospirózy. *Remedia-Klin.Mikrobiol.*, 1999,4:109-115.
135. Zitek K, Sedláček I.: Taxonomie leptospir. *Remedia-Klin. Mikrobiol.*, 1999, 3, 232-235.
136. Zitek K.: Leptospiróza – zdravotní riziko po povodních. *Temporus medicorum* 2002,11:36-37.
137. Zitek K., Beneš Č: The Post Flood Leptospirosis in Czech Republic. In: Abstract Book of 1. FEMS Congress of European Microbiologists, Ljubljana, Slovenia 2003, P.6-66:270.

PODĚKOVÁNÍ

Závěrem bych chtěla upřímně poděkovat všem, kteří mi pomohli cennými radami a praktickou pomocí při realizaci cílů dizertační práce „Molekulárně biologické vyšetřovací metody – praktická aplikace v diagnostice parazitárních infekcí“.

Především chci vyjádřit svůj dík školitelce, paní doc. MUDr. Olze Ryškové, CSc., za cenné odborné rady a pomoc při publikační činnosti.

Rovněž bych ráda poděkovala současnému přednostovi Ústavu klinické mikrobiologie, prof. MUDr. M. Šplíňovi, DrSc. a také bývalému přednostovi prof. MUDr. J. Horáčkovi, CSc. za to, že mi umožnili na pracovišti rozšířit a zdokonalit parazitologickou laboratorní diagnostiku o nové metody.

Moje poděkování patří také pracovníkům Ústavu klinické biochemie a diagnostiky pod vedením prof. MUDr. V. Paličky, CSc. a především PharmDr. Lence Plíškové, vedoucí úseku molekulárních biologických metod, kde byla vyšetření molekulárně biologickými metodami prakticky prováděna.

Předkládaná dizertační práce by nemohla vzniknout bez nezištné pomoci laborantek na obou pracovištích (ÚKM a ÚKBD) a proto i jim patří mé poděkování, stejně jako panu M. Holečkovi, správci počítačové sítě ÚKM za pomoc při zpracování dat z PC.

Nemalý dík patří i všem třem vedoucím Národních referenčních laboratoří - RNDr. Petrovi Kodymovi, PhD. (NRL pro toxoplazmózu), RNDr. Kamilovi Zitkovi, CSc. (NRL pro leptospiry) a RNDr. Evě Nohýnkové, PhD. (NRL pro tropické parazity) Státního zdravotního ústavu v Praze za poskytnutí sbírkových kmenů příslušných infekčních agens.

Další upřímné poděkování patří i doc. MUDr. V. Dostálovi, CSc. a MUDr. K. Honegrovi, PhD., bez jejichž pochopení a zájmu o zkoumanou problematiku by tato práce nemohla vzniknout.

Za statistické zpracování děkuji paní magistře Martině Chrzové, PhD. a rovněž panu Ing. Josefu Bukačovi.

Zuzana Čermáková