

Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové

**MVDr. Zuzana Čermáková**

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

**Autoreferát dizertační práce**

Doktorský studijní program

Obor: Lékařská mikrobiologie

Hradec Králové

2005

Experimentální i klinické výsledky obsažené v dizertační práci byly získány při zavádění nových laboratorních metod v průběhu kombinované formy doktorského studijního programu oboru Lékařská mikrobiologie v Ústavu klinické mikrobiologie Lékařské fakulty v Hradci Králové.

**Uchazeč:** MUDr. Zuzana Čermáková  
Fakultní nemocnice Hradec Králové  
Ústav klinické mikrobiologie, oddělení lékařské parazitologie

**Školitel:** Doc. MUDr. Olga Ryšková, CSC.  
Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta Hradec Králové  
Ústav klinické mikrobiologie

- Oponenti:**
- 1. Doc. MUDr. Vilma Marešová, CSc.,  
přednostka I. infekční kliniky 2. LF UK a FNsP  
Na Bulovce, Praha**
  - 2. Doc. MUDr. Jaroslava Mazurová, CSc.,  
katedra biologických a biochemických věd,  
Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice**

Autoreferát byl rozeslán dne 11. 5. 2006

Obhajoba se koná před komisí pro obhajoby disertačních prací v doktorském studijním programu všeobecné lékařství v oboru lékařská mikrobiologie

**ve středu dne 14. června 2006 od 11.30 hodin,**

Ústav klinické mikrobiologie LF UK a FN,  
Sokolská 581, Hradec Králové (1. poschodí, místnost č. 119).

Stanovisko k dizertaci bylo vypracováno vedením Ústavu klinické mikrobiologie.

S dizertační prací je možné se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty UK Šimkova 870, Hradec Králové.

Prof. MUDr. Jiří Horáček, CSc.,  
předseda komise pro obhajoby disertačních prací  
doktorský studijní program – lékařská mikrobiologie

## Obsah

1. Úvod	4
2. Současný stav sledované problematiky	4 – 8
3. Cíle předkládané dizertační práce	9
4. Materiál a metody	9 - 11
5. Výsledky a diskuse	11 - 19
6. Závěry pro praxi a další výzkum	19 - 20
7. Vybraná literatura	21 – 25
8. Publikace autora vztahující se k tématu dizertace	26
9. Přehled veškeré publikační činnosti a přednášek autora	27 - 29
10. Souhrn	30
11. Summary	31

## 1. Úvod

Úsek parazitologie ve velkých nemocničních zařízeních v naší republice zajišťuje tradičně diagnostiku parazitárních onemocnění i infekcí způsobených původci, kteří podle systematického zařazení v lékařské mikrobiologii do parazitologie nepatří. Při rozhodování, kterým infekčním agens budu při zavádění molekulárních biologických metod věnovat pozornost především, jsem se přiklonila k názoru, že rozhodující budou požadavky klinických pracovišť. V průběhu 5 let jsme společně s úsekem molekulárních biologických metod (laboratoří pro extrahumánní genom) Ústavu klinické a biochemické diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové připravili, experimentálně ověřili a zavedli do rutinního laboratorního provozu metodu polymerázové řetězové reakce pro detekci DNA *Toxoplasma gondii*, pro detekci DNA patogenních sérovarů *Leptospira species* a pro rozlišení patogenní a nepatogenní formy *Entamoeba histolytica*.

Obsahem dizertační práce je popis experimentů, které vedly k vytvoření nových metodických postupů na našem pracovišti, prezentace výsledků testovaných souborů vzorků, včetně diskuse a závěrů, které jsme získali po zhodnocení laboratorních výsledků i klinických nálezů v diagnostice toxoplazmózy, infekcí vyvolaných patogenními leptospirami a patogenními amébami *Entamoeba histolytica*.

## 2. Současný stav sledované problematiky

Přímý průkaz infekčního agens pomocí molekulárních biologických metod je založen na výběru specifického úseku nukleové kyseliny mikroorganismu s takovým pořadím bází, které je pro hledaného původce typické. Přítomnost specifického úseku nukleové kyseliny v biologickém materiálu od pacienta lze považovat za průkaz příslušného mikroorganismu. V mikrobiologické laboratorní diagnostice je jednou z nejčastěji používaných metod tzv. polymerázová řetězová reakce (PCR), která byla popsána v roce 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.

Bylo popsáno velké množství metodik, které jsou potenciálně užitečné v různých diagnostických situacích. Každá z modifikací PCR se odlišuje od ostatních v požadavcích na vzorek, v jeho přípravě, v náročnosti provedení i v citlivosti a specifitě metody. 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* a v neposlední řadě rovněž patogenní leptospiry, jsme zavedli a standardizovali vyšetření metodou PCR u těchto patogenů do rutinního laboratorního provozu.

Infekce parazitickým prvokem *Toxoplasma gondii* je ve světě a zřejmě i u nás jednou z nejčastěji se vyskytujících parazitárních nákaz. Poprvé byla infekce člověka popsána v roce 1923 pražským očním lékařem doktorem Josefem Janků u zemřelého dítěte s kongenitálním hydrocefalem. *Toxoplasma gondii* je typický oportunní parazit, takže většina infekcí člověka probíhá asymptomaticky nebo pod obrazem nespecifických klinických příznaků. Závažné jsou především intrauterinní infekce plodu získané v graviditě (kongenitální toxoplazmóza), oční formy toxoplazmózy a infekce imunokompromitovaných jedinců (HIV pozitivní osoby ve stadiu rozvinuté AIDS, pacienti s maligními tumory, pacienti transplantovaní a podobně).

Lidský plod je intrauterinní infekcí nejvíce ohrožen onemocněním matky v prvním trimestru gravidity nebo krátce před otěhotněním; velmi vzácně jsou popisovány případy chronické toxoplazmózy nebo reinfekce matky a následné onemocnění plodu. Ve výsledcích studie publikované v roce 1998 v Norsku uvádí Jenum, že v souboru 35 940 vyšetřených gravidních žen byla kongenitální infekce *T. gondii* zjištěna u 0,03% novorozenců. Lécolier v roce 1999 popisuje ve Francii potvrzený výskyt akutní toxoplazmózy v graviditě okolo 0,5%. Vzhledem k počtu asi 750 000 těhotenství ročně a předpokládanému prostupu prvoka placentou, očekává přibližně 500 – 1 500 pravděpodobných přenosů toxoplazmové infekce z matky na plod. V České republice není vyšetření na toxoplazmózu v graviditě povinné a chybí tedy epidemiologické údaje z celého území. Autoři studie publikované Paličkou v roce 1998 konstatují, že u žen s primoinfekcí byl v uvedené studii prokázán

přenos *T. gondii* na plod ve 49 % a uzavírají, že ve skupině sledované populace (50 000 žen v okrese Karviná) bylo v důsledku nákazy toxoplazmózou poškozeno 2,25 ‰ těhotenství, z toho skončilo spontánním abortem 1,02 ‰ a kongenitální toxoplazmózou 1,23 ‰ případů.

V laboratorní parazitologické diagnostice se k potvrzení nebo vyloučení infekce *T. gondii* využívají nejčastěji metody sérologické (reakce vazby komplementu, EIA testy pro jednotlivé třídy protilátek – IgM, IgA, IgE, IgG a test avidity IgG). Metody přímého průkazu původce založené na infekci tkáňové kultury nebo vnímavého laboratorního zvířete (bílá myš) jsou časově i metodicky velmi náročné a výsledek získáme až za několik dní či dokonce týdnů.

Vzhledem ke skutečnosti, že protilátky proti *T. gondii* přetrvávají v organismu člověka řadu měsíců a dokonce let, je většinou obtížné proces časově ohraničit a stanovit, zda se ještě jedná o akutní toxoplazmózu nebo již o přetrvávající protilátkovou odpověď. Z důvodů poměrně obtížné interpretace výsledků sérologických vyšetření u různých forem toxoplazmózy jsme přistoupili k zavedení metody PCR pro průkaz DNA prvoka *T. gondii* z klinického materiálu.

*Entamoeba histolytica* je patogenní invazivní parazit, který se vyskytuje především v tropech a subtropích a jehož morfologie je shodná s morfologií nepatogenní *Entamoeba dispar*. V běžné laboratorní praxi nelze navzájem obě améby rozlišit. Faktory sloužící k rozlišení *Entamoeba histolytica* a *Entamoeba dispar* od jiných druhů definoval v roce 1988 Neal a patří k nim především morfologie, typ rozložení chromatinu v jádře, typ pohybu, fyziologie, antigenní vlastnosti, DNA, variabilita izoenzymů a vnímavost vůči léčivům. Laboratorní metody, kterými lze obě améby identifikovat jsou: kultivace, ELISA testy, izoenzymová analýza, polymerázová řetězová reakce.

V životním cyklu prvoka se střídají dvě stádia: cysta (odolné stádium schopné přežít v zevním prostředí týdny i měsíce) a stádium trofozoita (vegetativní). Člověk je nakažen pozřením zralých čtyřjaderných cyst a ve střevě dochází k excystaci a dalšímu vývoji trofozoita. Předpokládá se, že k transformaci trofozoita v invazivní formu dochází u *E. histolytica* stresovou reakcí na vlivy prostředí: výkyvy teploty, změny bakteriální flóry, redox potenciálu, vlivem chemických látek, léčiv apod. Invazivní forma trofozoita

(magna) napadá sliznici tlustého střeva, zabíjí jaderné buňky, pohlcuje erythrocyty a může vyvolat těžké intestinální a extraintestinální formy amebózy. Invaze mimo střevní trakt je vždy sekundární a předchází jí symptomatická či asymptomatická střevní infekce.

Diagnostika střevní infekce *E. histolytica* je prováděna vyšetřením stolice následujícími metodami: nativní preparát, koncentrační metody (flotace dle Fausta), barvený preparát, histologie, identifikace izoenzymovou analýzou a detekce DNA prvoka polymerázovou řetězovou reakcí. Diagnostika extraintestinální formy infekce se provádí nejčastěji průkazem protilátek a v současné době také průkazem DNA metodou polymerázové řetězové reakce.

Leptospirové infekce zahrnují velkou skupinu horečnatých onemocnění zvířat i člověka, vyvolaných spirálními bakteriemi z rodu *Leptospira* (řád *Spirochaetales*), které mají jedinečnou buněčnou stavbu a jsou značně odolné ve vnějším prostředí. Leptospiry jsou obligátně aerobní bakterie s poměrně dlouhou generační dobou a jejich kultivace z klinického materiálu je metodicky i časově náročná. Obtížně se barví běžnými barvicími technikami; častěji se proto v laboratorní diagnostice využívá mikroskopie v zástínu nebo imunofluorescence a pro diagnostiku suspektní leptospirózy u pacientů detekce protilátek z krevního séra.

Infekce vyvolané leptospirami jsou přenosné ze zvířat na člověka (zoonózy) a onemocnění je v určitých přírodních ohniscích rozšířeno prakticky po celém světě. Hlavními rezervoáry infekce jsou hlodavci, ale i některá domácí zvířata. Člověk se infikuje kontaminovanou vodou, potravou, jinými vlhkými substráty, popř. při ošetřování nemocných zvířat. Významným epidemiologickým faktorem je skutečnost, že leptospiry jsou schopné pronikat i neporušenou pokožkou a sliznicemi. Onemocnění může probíhat pod obrazem „lehkého virového onemocnění“ až po těžký průběh s „respiratory distress syndromem“, hepatorenálním selháním a celkovým metabolickým rozvratem (Weilova nemoc).

Taxonomie rodu *Leptospira* prodělala v posledních letech značný vývoj a v současné době se rod *Leptospira* dělí na základě genové analýzy na 17 genomospecies. Další dělení je komplikované, neboť genetická taxonomie není shodná s taxonomií sérologickou. V roce 2005 uvádí Dario, R.

(Leptospira Reference Laboratory) 21 séro skupin leptospir, které se dále člení na jednotlivé sérovary, jichž bylo popsáno už přes 300.

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

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

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

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 naší parazitologické laboratoři Ústavu klinické mikrobiologie v Hradci Králové jsme zaznamenali šestinásobně vyšší výskyt laboratorně potvrzených diagnóz leptospirózy (v roce 2001) 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 do rutinní diagnostiky, pozorujeme zvýšený laboratorní průkaz leptospiróz i v současné době.

Z důvodů mnoha obtíží (problémy při hodnocení sérologických reakcí, obtížná kultivace a další), které vznikají při diagnostice leptospirózy jsme zavedli do laboratorní praxe vysoce citlivou, specifickou a rychlou metodu detekce DNA patogenních leptospir pomocí polymerázové řetězové reakce v různých vzorcích biologického materiálu (plazma, moč, likvor, bronchoalveolární laváž apod.). Metoda prokazuje DNA patogenních leptospir již v časných stádiích onemocnění. Sérologickým vyšetřením je s odstupem (1-2 týdnů a více) provedena sérotypizace, která je významná pro epidemiologické došetření.



### 3. Cíle předkládané dizertační práce

- 1) Vypracovat, optimalizovat a standardizovat metodu polymerázové řetězové reakce pro vybraná infekční agens (*Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica / dispar* a patogenní sérovary *Leptospira species*).
- 2) Vypracovat standardní operační postupy (PCR *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica / dispar* a patogenní sérovary *Leptospira species*), pro zavedení metod do rutinní laboratorní diagnostiky v úseku parazitologie Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové a ve společné laboratoři pro extrahumánní genom Ústavu klinické a biochemické diagnostiky a Ústavu klinické mikrobiologie.
- 3) Vyhodnotit výsledky metod PCR a porovnat je s klasickou sérologickou a morfologickou diagnostikou pro jednotlivá infekční agens.
- 4) Navrhnout optimální laboratorní algoritmus (Standardní operační postup) pro diagnostiku infekcí vyvolaných *T. gondii*, *E.histolytica / dispar* a *Leptospira sp.* u jednotlivých skupin pacientů.

### 4. Materiál a metody

#### Laboratorní diagnostika prvoka *Toxoplasma gondii*

##### a) Průkaz DNA *Toxoplasma gondii*

Primery pro detekci DNA prvoka *T. gondii* jsme vybrali ze tří oblastí genomu:

- gen, který kóduje významný povrchový protein P-30, v genomu *T. gondii* se nalézá 1x
- gen B1, jehož funkce není dosud objasněna, v genomu *T. gondii* je repetitivní 25x-50x
- gen TGR 1E je repetitivní 30x-35x, funkce není objasněna.

Pro přípravu PCR metody na detekci DNA *Toxoplasma gondii* jsme obdrželi virulentní kmen z Národní referenční laboratoře pro toxoplazmózu (SZÚ Praha),

který jsme pasážovali na vnímavých laboratorních zvířatech (bílá myš) a postupně jsme vypracovali, optimalizovali a standardizovali PCR metody pro všechny tři vybrané oblasti genomu *T. gondii*. Do rutinního laboratorního provozu byly na základě standardního operačního postupu zavedeny PCR metody pro detekci DNA *T. gondii* z oblastí B1 a TGR1E genů.

b) V parazitologické laboratoři ÚKM jsou pro nepřímý průkaz infekce prvokem *T. gondii* využívány následující metody: reakce vazby komplementu, EIA testy pro stanovení imunoglobulinů ve třídách IgM, IgA, IgE, IgG a avidita třídy IgG.

#### Laboratorní diagnostika prvoka *Entamoeba histolytica* a *Entamoeba dispar*

DNA *Entamoeba histolytica* byla izolována z jaterního abscesu pacienta, u něhož byla stanovena diagnóza extraintestinální amébozy; DNA nepatogenní *E. dispar* byla získána ze stolice osoby dlouhodobě vylučující cysty.

Na základě izolované DNA byla optimalizována metoda nested PCR pro rozlišení *Entamoeba histolytica* s primery publikovanými Evangelopoulosem. Vnější primery jsou pro společnou oblast *E. histolytica* a *E. dispar* (E1 a E2) a vnitřní primery pro 2. stupeň nested PCR jsou specifické (Eh-L a Eh-R pro *E. histolytica* a Ed-L a Ed-R pro *E. dispar*). Metoda byla optimalizována a vypracován standardní operační postup pro detekci DNA améb. Vzhledem ke skutečnosti, že v parazitologické laboratoři jsou na přítomnost améb a dalších střevních prvoků vyšetřovány především vzorky stolic, které obsahují často inhibitory PCR reakcí, pokusili jsme se vypracovat způsob koncentrace a získávání cyst vhodných pro detekci DNA metodou PCR. Pro zvýšení citlivosti reakce a odstranění inhibitorů jsme zavedli vlastní postup získávání cyst améb ze vzorků stolice a jejich promývání. Dosáhli jsme meze detekce 30-50 cyst na reakci.

#### Laboratorní metody průkazu patogenních leptospir

a) **Primery** pro polymerázovou řetězovou reakci jsme volili tak, aby bylo možno stanovit v biologickém materiálu přítomnost DNA všech sérovarů patogenních leptospir, které byly dosud u člověka izolovány na území ČR. Pro sérovary, které patří do genomospecies *L. interrogans* a *L. borgpetersenii* jsme použili dle

dostupných literárních pramenů primery G1 a G2 a pro patogenní leptospiry patřící do genomospecies *L. kirschneri* sekvence B 64-I a B 64-II.

Provedli jsme postupnou optimalizaci PCR metody a rovněž optimalizaci zpracování biologických materiálů v preanalytické fázi a dosáhli meze detekce 10-20 organismů pro reakci.

Ověření specifity metody bylo provedeno postupně se všemi kmeny používanými při sérologické diagnostice v České republice a rovněž s nepatogenními kmeny *L. biflexa* a *L. saopaulo* Sao Paulo (Genomospecies 5). Nepatogenní kmeny nereagovaly s primery pro kmeny patogenní a reakce patogenních kmenů byly přísně specifické, to znamená, že kmen vykazoval pozitivní výsledek pouze s primery specifickými pro genomospecies, do kterého je zařazen.

b) **Sérologické vyšetření** a confirmace výsledků PCR byla prováděna metodou mikroaglutinace-lýza (MAL). Antigeny jsou živé kmeny leptospir kultivované běžným způsobem. Screeningové vyšetření séra je prováděno v ředění 1:100 a následná titrace pozitivních vzorků je prováděna do konečného ředění, kdy ještě pozorujeme v zástínu aglutinaci-lýzu hodnocenou ++.

## 5. Výsledky a diskuse

### *Toxoplasma gondii*

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). Kromě přímého průkazu DNA *Toxoplasma gondii* v biologických materiálech jsme dle požadavků jednotlivých pracovišť vyšetřovali vzorky séra a plodové vody také na přítomnost protilátek proti *T. gondii* – imunoglobulinů ze třídy IgM, IgA, IgE, IgG a avidity IgG metodami 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 *T. gondii* ve 23 případech (tj. 5,2 %). Ze souboru jsme vyčlenili 120 gravidních žen, jejichž výsledky byly zpracovány samostatně. Metodou PCR byla DNA prvoka zjištěna v biologických materiálech od deseti těhotných žen se susp. toxoplazmózou (tj. 8,3%). Ve vzorcích biologických materiálů od dvou

novorozenců s kongenitální toxoplazmózou byla rovněž nalezena DNA prvoka i pozitivní průkaz protilátek sérologickými metodami. Pozitivní výsledek detekce DNA *T. gondii* jsme obdrželi také ve dvou vzorcích progenitorových kmenových buněk před transplantací.

Ověření specificity nově zaváděné metody polymerázové řetězové reakce do diagnostiky toxoplazmózy bylo provedeno porovnáním výsledků PCR s nálezem protilátek v krevním séru. Ve 100% PCR pozitivních vzorků byly prokázány rovněž imunoglobuliny ze třídy IgG a ve více než 50% imunoglobuliny ostatních tříd (IgM, IgA a IgE), což potvrzuje vysokou specificitu průkazu DNA *T. gondii* metodou PCR.

### **Entamoeba histolytica**

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 dispar* byla prokázána ve třech vzorcích stolice od dvou pacientů. DNA patogenní *E. histolytica* nebyla nalezena. Nebyla zaznamenána nespecifická reakce s *Iodamoeba bütschlii*, *Endolimax nana*, *Entamoeba Hartmanii* a *Giardia lamblia* (prvoci nejčastěji určovaní ve stolici pacientů, resp. u osob po návratu z tropů a subtropů).

V dizertační práci jsou popsány kazuistiky všech vyšetřených osob, včetně pacienta s extraintestinální formou amébozy, z jehož jaterního abscesu jsme izolovali DNA patogenní *E. histolytica*, která byla následně použita k přípravě a optimalizaci metody PCR. Pacient pobýval několik měsíců v Indii, kde u něj proběhlo průjemové onemocnění. Po třech měsících udává bolesti v pravém podžebří s propagací do zad, s horečkou (38-39 °C) je přijat do spádové nemocnice a i přes intenzivní antibiotickou terapii dochází ke zhoršování klinického stavu. Po 7 dnech je v septickém stavu pacient převezen na infekční kliniku v Hradci Králové, vyšetření CT jater prokázalo nález dvou abscesů velikosti 7 a 9 cm, na chirurgické klinice je provedena drenáž jaterních abscesů (pod clonou Entizolu a ATB). V NRL pro tropické parazitární nemoci v Praze byla sérologicky potvrzena infekce *Entamoeba histolytica*. Biologický materiál (buněčný detritus) z drénů byl použit pro izolaci DNA na přípravu a optimalizaci PCR metody.

Pobyt v oblastech tropů a subtropů výrazně zvyšuje riziko infekce patogenními střevními amébami. Kubánští autoři 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 specifickou 1,00 a senzitivitu 0,94. Soubor vzorků vyšetřených v naší laboratoři je v současné době příliš malý na posouzení obou výše uvedených veličin, ale dosavadní výsledky ukazují dostatečnou specifickou i senzitivitu.

Výsledky zahraničních autorů a námi výše popsany případ těžké extraintestinální formy amebózy u pacienta po návratu z Indie, vedl k urychlenému zavedení přímého průkazu DNA *Entamoeba histolytica* a *Entamoeba dispar* na našem pracovišti. Metoda EIA není k rozlišení patogenní a nepatogenní améby podle některých autorů dostatečně citlivá a proto doporučují detekci DNA metodou PCR.

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 prvků (především cyst) ve vzorku připraveném k izolaci DNA. Nejprve jsme provedli koncentraci metodou dle Fausta a poté na 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 amebózy, 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.

#### **Leptospira species** (patogenní sérovary)

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 je uveden přehled biologických materiálů vyšetřených od prosince roku 2002 do konce června roku 2005. Metodou PCR k detekci DNA patogenních leptospir bylo vyšetřeno celkem 166 vzorků biologického materiálu od 110 osob. V souboru vyšetřených osob je zařazen i jeden novorozenec matky s podezřením na leptospirózu v období porodu (později potvrzeno sérologicky).

**Tab. Výsledek 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

Využití metody PCR v laboratorní diagnostice infekcí patogenními leptospirami je ve výsledcích dokumentováno na třech podrobně popsanych kazuistikách pacientů s leptospirózou.

Pacient č. 1

Pacient, muž, věk 29 let, byl hospitalizován pro horečnatý stav, kašel a progredující dušnost (řízená plicní ventilace). 7 dní před hospitalizací udává subfebrilie, bolesti hlavy apod. V den hospitalizace 27.5.2005 - odebrána krev, moč a BAL (susp. leptospiróza) a zahájena léčba antibiotiky (Augmentin, Klacid).

Tabulka uvádí výsledky vyšetření biologických 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 se všemi kmeny
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 chronologicky v následujících tabulkách.

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 Ostatní kmeny NEG
Moč	NEG	NEG	NEG	

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 Ostatní kmeny NEG
Moč	NEG	NEG	NEG	

Vysvětlivky: kmen č. 1 = *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava

kmen č. 2 = *L. copenhageni* Lebe.

Výsledky PCR reakcí pro detekci DNA patogenních leptospir byly ze dne 1.6. a 3.6. 2005 a v dalších odběrech již negativní a dochází k zvestupu titru protilátek proti sérovarům *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava a *L. copenhageni* Lebe.

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 byly negativní a v reakci MAL bylo dosaženo titrů: *Leptospira icterohaemorrhagiae* Fryšava 1 : 6 400 a *L. copenhageni* Lebe 1 : 3 200.

**Klinická diagnóza:** Morbus Weili.

#### Pacient č. 2

Muž 25 roků, přijat dne 21.9.2002 na interní oddělení okresní nemocnice s anamnézou týden trvajících chřipkových příznaků (5 dní cotrimoxazol), 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: Augmentin a Klacid, později (nozokomiální infekce) Ciprofloxacin, Cefotaxim, Kolimicin, 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

**Klinická 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.

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.

#### Pacient 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



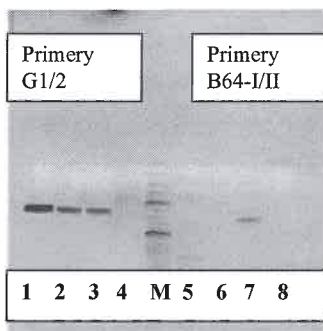
dnů trvajícím febrilním stavu se zhoršující se funkcí respiračního systému, renálních funkcí, s příznaky postižení CNS (pacient předchozí dny odmítal hospitalizaci). Při přijetí odebrány vzorky biologických materiálů včetně krevní plazmy a moči k vyšetření na přítomnost DNA patogenních leptospir metodou PCR.

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

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.

Dne 1.9.2004 – i přes intenzivní adekvátní antibiotickou a podpůrnou terapii pacient zemřel.

**Klinická diagnóza:** 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 včasné laboratorní 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, že výsledek laboratorního vyšetření PCR metodou je limitován nejen klinickou indikací, ale **také dodržáním správného postupu při odběru biologického materiálu**. Pro přímý průkaz leptospir metodou PCR je důležité odebírat všechny typy vzorků **před zahájením antibiotické terapie nebo co nejdříve po jejím zahájení**.

Ve výsledcích kazuistiky č. 1 sledujeme postupný vzestup titru protilátek proti sérovarům *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava a *L. copenhageni* Lebe.

Zaznamenali jsme 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 dokumentují významnou skutečnost, 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 kritický, 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.

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 pneumonií může potvrdit vyšetření bronchoalveolární laváže metodou PCR.

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 i z důvodů epidemiologických.

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

## 6. Závěry pro praxi a další výzkum

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.
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 a účinná terapie 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 leptospiróz 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 leptospirózy urychlit a v případě pozitivního výsledku diagnózu jednoznačně potvrdit. Z důvodů epidemiologických je nutné vyšetření PCR doplnit určením jednotlivých sérovarů leptospir.

## 7. Vybraná 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. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Bharti AR, Nalli JE, Ricaldi JN et al.: Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Infect Dis*, 2003, 3, (12), 757-771.
7. 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, 44:13-44:17.
8. 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.
9. 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.
10. Collier L, Albert Balows, Max Sussman: Topley & Wilson's Mikrobiology and Microbial Infections, volume 5 PARASITOLOGY, Great Britain 1998.
11. 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.
12. 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.
13. Čatár G, Červeň D, Jalili N. *Toxoplasma gondii*. *Bratisl Lek Listy* 1998, 99:579-583.
14. Daher FE, Zanetta DM, Abdulkader RC.: Pattern of renal function recovery after leptospirosis acute renal failure. *Nephron Clin Pract*, 2004, 98(1):8-14.
15. Dostál V a kol.: Infektologie, Karolinum, 2004, ISBN 80-246-0749-2.

16. 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.
17. 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.
18. Evangelopoulos A, Legakis N, Vakalis N: Microscopy, PCR and ELISA applied to the epidemiology of amoebiasis in Greece. *Parasitology International* 2001,50: 185-189.
19. 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 .
20. 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 Qualyobia Governorate, Egypt *J Egypt Soc Parasitol* 2002, 32(2):475-486.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Gravekcamp C, Van De Kemp H, Franzen M et al.: Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol*, 1993, 139:1691-1700.
27. 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.
28. 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.

29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Havlík, J a kol: *Infekční nemoci*, Galén, 2. vyd.,2002, ISBN 80-7262-173-4.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. Kishimoto M, Brown JD, Chung HH, Howman S.: Leptospirosis misdiagnosed as pulmonary-renal syndrome. *Am J Med Sci*, 2004,328(2),116-120.
38. Ko IA, Reis GM, Dourado RMC, Johnson DW.Jr: Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet*,1999,354:820-825.
39. Kodym P, Tolarová V. Laboratorní diagnostika toxoplazmózy. *Remedia-Klinická mikrobiologie* 1998;2(7):224-6.
40. Křemen J., Pohlreich P., Stříbrná J. : *Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně*, Karolinum, Praha 1998, 33-36, 80-83.
41. 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.
42. Lécolier B.: Prevence kongenitální toxoplazmózy: zkušenost z francouzské praxe. *Remedia – Klinická mikrobiologie*, 1999, 3(8):248-254.
43. 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.

44. Mehmet Tanyuksel and William A. Petri Jr.: Laboratory Diagnosis of Amebiasis, Clin. Microbiol. Rev., October, 2003; 16 (4):713 – 729.
45. 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, roč. 30, č. 9, 2219 – 2224.
46. Montoya JG. Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis. J Inf Dis 2002;185(S1):73-82.
47. Montoya JG., Liesenfeld O.: Toxoplasmosis. The Lancet; 363(12),2004, 1965-1976.
48. Myjak P., Kur J., Pietkiewicz H., Kotłowski 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.
49. Neumaier M., Braun A., Wagner Ch.: Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics, Clin Chem 1998, 44:1, 12-26.
50. 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 diferencation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* DNA from stool samples, Am. J. Trop Med. Hyg., 2001, 64 (5,6), 293-297.
51. Palička P, Slabá H, Zitek K. Aktivní ovlivňování výskytu kongenitální toxoplasmózy v populaci. Prakt Gynekol 1998;5(1):23-7.
52. Parma, A. E., Seijo, A., Lucchesi, P. M., Deodato, B., Sanz, M. E.: Diferentiation of pathogenic and non-pathogenic leptospire by means of the polymerase chain reaction. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 1997;39,4:203 – 207.
53. 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.
54. Pujol-Riqué M, Derouin F, García-Quintanilla A, Valls ME, Miró JM, Jimenez 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.
55. 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.
56. Rosypal S. a Doškař J. : Úvod do molekulární biologie, třetí díl, Brno 1997,744–746.
57. Savva D, Morris JC, Johnson JD, Holliman RE. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Toxoplasma gondii*. J Med Microbiol 1990;32:25-31.



58. Sejvar J, Bancroft E, Winthrop K et al.: Leptospirosis in „Eco-challenge“ athletes, Malaysian Borneo, 2000, *Emerging Infectious Diseases*, 2003, 9,702-707.
59. Suzuki LA, Rocha RJ, Rossi CL. Evaluation of serological markers for the immunodiagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J Med Microbiol* 2001;50:62-70.
60. Šerý V., a kol. : Lexikon cestovní medicíny, Encyklopedický dům, 1996.
61. Tremil F, Pejčoch M, Holešovská Z.: Small mammals-natural reservoirs of pathogenic leptospires. *Vet Med-Czech*, 2002, 47(10-11),309-314.
62. 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.
63. Vaništa J.: Toxoplazmóza. In Havlík J. a kol. *Infekční nemoci*. Praha, Galén, 2002, 143 – 147.
64. Vaništa J.: Leptospiroza. In Havlík J. a kol. *Infekční nemoci*. Praha, Galén, 2002:98-99.
65. Verweij J.J., Blotkamp J., Brien 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.
66. 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.
67. 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.
68. Zitek K, Beneš Č, Volná L: Epidemiologie povodňové leptospirozy. *Remedia-Klin.Mikrobiol.*, 1999,4:109-115.
69. Zitek K, Sedláček I.: Taxonomie leptospir. *Remedia-Klin. Mikrobiol.*, 1999, 3, 232-235.
70. Zitek K.: Leptospiroza – zdravotní riziko po povodních. *Temporus medicorum* 2002,11:36-37.

## 8. Publikace autora vztahující se k tématu dizertace

1. Čermáková, Z., Stach J., Ryšková, O. Weilova nemoc: těžký průběh s respirační insuficiencí. Čas Lek Česk., 2004; 143 (10):705-707.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Čermáková Z., Prášil, P., Ryšková, O. Kongenitální toxoplazmóza: možnosti laboratorní diagnostiky. Epidemiol.Mikrobiol.Imunol., 54, 2005, č.2., 75-77.
6. Čermáková, Z., Ryšková, O., Plíšková, L.: Polymerase Chain Reaction for Detection of *Toxoplasma gondii* in Human Biological Samples. Folia Microbiologica, 50(4), 2005, 341-345.
7. Čermáková, Z., Ryšková, O., Plíšková, L.: Laboratory diagnosis of Leptospirosis. Folia Microbiologica, 50(4), 2005, 345-349.
8. Cermakova, Z., Ryskova O. et al.: Diagnosis of Lyme borreliosis using enzyme immunoanalysis. Medical Science Monitor in Basic Research (Internet. Med. J. for Experimental and Clinical Research), 2005, vol.11, no 4, 121-125.

## 9. Přehled veškeré publikační činnosti a přednášek autora

1. Vysloužil, L., Čermáková, Z.: Pracovní setkání sekce Lékařské parazitologické společnosti pro epidemiologii a mikrobiologii ČLS JEP a České parazitologické společnosti. Zprávy české parazitologické společnosti, roč. 7, č. 4, prosinec 1999, ISSN 0233-84233.
2. Förstl, M., Čermáková, Z., Čermák, P.: Trichinelóza – nový výskyt svalovce stočeného (*Trichinella spiralis*) na našem území. Zprávy CEM (SZÚ Praha), 2001, 10 (8): 305-307, ISSN 1211-7358.
3. Čermáková, Z., Förstl, M., Čermák, P., Plíšek, S., Honegr, K., Hassmanová, V.: Onemocnění malárií (*Plasmodium falciparum*) importované do ČR, kazuistika. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 7-8, 2001, s. 214-216, MK ČR 7352, ISSN 1211-264X.
4. Čermáková, Z., Förstl, M., Veselský, Z.: Epidemie slintavky a kulhavky. Myslivost, 5, 2001,13, MK ČR 519, ISSN 0323-214X 46887.
5. Förstl.M., Čermáková, Z., Veselský, Z.: Nový výskyt svalovce stočeného na našem území. Myslivost, č.9, 2001, s. 30-31. MK ČR 519 ISSN 0323-214X 46887.
6. Čermáková, Z., Förstl, M.: V čem spočívá akutní problém slintavky a kulhavky? Sisyfos, zpravodaj ekologické výchovy, č.5, 2001.
7. Förstl, M., Čermák, P., Čermáková, Z., Gebouský, P., Tolarová, V.: Dva případy onemocnění tasemnicí. Interní medicína pro praxi,9,(4),457-459,2002.
8. Förstl,M.,Čermák,P.,Čermáková,Z.,Pellantová, V., Kamarád, V., Tolarová, V., Dlhý, J.: Roup dětský *Pediatric pro praxi: 3,111-113,2002.*
9. Förstl, M., Čermák, P., Čermáková, Z., Pellantová,V., Tolarová,V.: Tenkohlavec lidský. Interní medicína pro praxi : 4, 199-201, 2002.

10. Förstl,M., Čermáková,Z., Dlhý,J., Veselský,Z.: Bojíte se klíšťat? Myslivost-stráž myslivosti:50(5),2002, 25-25.
11. Förstl,M., Čermák,P., Horáček,J., Čermáková,Z., Voxová,B. et al: Praktický atlas lékařské parazitologie. 1. vyd., Hradec Králové, Nucleus, 2003, 140 s., ISBN: 80-86225-38-0.
12. Förstl,M., Voxová,B., Čermáková,Z. : Lékařská parazitologie - Prvoci, Protozoa: Praktický atlas lékařské parazitologie, 1. vyd., 80-86225-38-0. Nucleus, Hradec Králové, 2003, 45-72.

**Abstrakta:**

1. Cermakova Z.: Laboratory Diagnosis of *T. gondii* Human Infection (Antibodies and DNA). BioMicro World. Badajoz (Spain), Book of Abstracts, 2005, 881.
2. Měříčka, P., Štěpánová, V., Bláha, M., Vávra, L., Čermáková, Z., Drahošová,M., Toušová, K.: Prevention of infection transmission in low-temperature preservation and storage of biological material below -80°C. The Seventh CRYOGENICS 2002 IIR International Conference Proceedings, ed. V. Chrz, 0151-1637. Nakladatel: ICARIS Ltd., Conference Management, Praha, Praha, 2002 s.165-168.
3. Čermáková, Z.: Laboratorní diagnostika leptospiróz. Poster. Bulletin Čs. společnosti mikrobiologické, XXXXV, 2004:25.
4. Čermáková, Z.: PCR v diagnostice toxoplazmózy. Bulletin Čs. společnosti mikrobiologické, XXXXV, 2004:24.

## Přednášky

### Mezinárodní

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

### 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.

## 10. Souhrn

Přímý průkaz infekčních agens (*Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica/dispar*, patogenní leptospiry) byl proveden nově zavedenými metodami detekce DNA polymerázovou řetězovou reakcí (PCR).

Pro průkaz DNA *Toxoplasma gondii* metodou PCR byly vybrány dva geny: *B1* a *TGR 1E*. Protilátky byly detekovány KFR a EIA testy. PCR bylo vyšetřeno 441 vzorků (pozitivní v 5,2%) od 347 osob (pozitivní 6,0%). V souboru 120 gravidních žen byla zjištěna pozitivní detekce *T. gondii* v 8,3%, současně byly ve 100% prokázány imunoglobuliny IgG a ve více než 50% i protilátky ostatních tříd. Shoda výsledků potvrdila specifitu PCR pro průkaz *T. gondii*. PCR metoda je významná především pro rizikové kategorie osob: plod gravidní ženy, pacienti s imunosupresí, suspektní kongenitální toxoplazmóza, atypický průběh toxoplazmózy.

Rozlišení invazivní *E. histolytica* a neinvazivní *E. dispar* metodou PCR: DNA pro PCR reakci byla izolována z jaterního abscesu pacienta s extraintestinální amebózou, DNA nepatogenní *E. dispar* ze stolice osoby dlouhodobě vylučující cysty. PCR průkaz DNA a rozlišení améb byl optimalizován jako nested PCR. Primery: vnější společné (E1 , E2), vnitřní specifické (Eh-L, Eh-R pro *E. histolytica* a Ed-L, Ed-R pro *E. dispar*). Vyšetřili jsme 11 vzorků cyst od 7 osob. DNA *E. dispar* byla detekována ve vzorcích stolice ve dvou případech, *E. histolytica* nebyla prokázána. Rozlišení obou améb je významné, neboť umožňuje včasnou léčbu zabraňující invazi améby ze střeva do dalších orgánů (extraintestinální forma).

V ČR se vyskytují tři genospecies patogenních leptospir: *L. interrogans*, *L. kirschneri* a *L. borgpetersenii*. Primery: G1/G2 (společné pro *L. interrogans* a *L. borgpetersenii*) a B64I /B 64II pro *L. kirschneri*. V souboru jsou výsledky PCR vyšetření 166 vzorků od 110 osob. V 7 vzorcích byla prokázána DNA patogenních leptospir. Výsledky PCR byly porovnány se sérologickým vyšetřením (mikroaglutinace-lýza) a doplněny třemi kazuistikami, v nichž je dokumentována nutnost odběru materiálu pro PCR v počátku infekce (rychlá eliminace zbytků leptospir při léčbě ATB) a vývoj protilátkové odpovědi.

## 11. Summary

Recently introduced methods of DNA detection by polymerase chain reaction (PCR) were applied for direct evidence of infectious agents (*Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica/dispar* and pathogenic leptospires). For the evidence of *Toxoplasma gondii* DNA by means of PCR two genes were selected: B1 and TGR 1E. The antibodies were detected by KFR and EIA tests. PCR was examined in 441 samples (positive in 5.2 %) from 347 persons (positive 6.0%). In the set of 120 pregnant women the positive *T. gondii* was detected in 8.3%, associated with 100% proven IgG immunoglobulins, and in more than 50% also with antibodies of other classes. The congruence of results proved the specificity of PCR for the evidence of *T. gondii*. The PCR method is important mainly for certain risk categories of population: the foetus of pregnant woman, patients with immunosuppression, suspected congenital toxoplasmosis and atypical course of toxoplasmosis.

The differentiation of the invasive *E. histolytica* and noninvasive *E. dispar* by PCR method: DNA for PCR reaction was isolated from hepatic abscess of a patient with extraintestinal amoebiasis, DNA of nonpathogenic *E. dispar* from the faeces of patient with long-term excretion of cysts. PCR evidence of DNA and differentiation of the amoebas was optimized as nested PCR. The primers: external common (E1, E2), internal specific (Eh-L, Eh-R for *E. histolytica* and Ed-L, Ed-R for *E. dispar*). We examined 11 cyst specimens from 7 persons. The DNA of *E. dispar* was detected in specimens of faeces in two cases, *E. histolytica* was not proved. The differentiation of both of them is important as it allows early treatment to prevent invasion of amoeba from the intestine to other organs (extraintestinal form).

In the Czech Republic three genospecies of pathogenic leptospires occur: *L. interrogans*, *L. kirschneri* and *L. borgpetersenii*. The primers: G1/G2 (common for *L. interrogans* and *L. borgpetersenii*) and B 64I/ B 64II for *L. kirschneri*. In our set results of PCR analysis of 166 specimens from 110 persons are described. In 7 specimens the DNA of pathogenic leptospires was proven. PCR results were compared with serological analysis (microagglutination-lysis) and completed by 3 case reports which provide evidence of the necessity of sampling specimens for PCR at the onset of infection (to ensure rapid elimination of remnants of leptospires in the course of ATB treatment) and of initiating the antibodies response.