

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Toxoplasma gondii a možnosti laboratorní
diagnostiky**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Barbora Voxová

HRADEC KRÁLOVÉ, 2016

Romana Bachurová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí práce paní PharmDr. Barboře Voxové za její odbornou pomoc, cenné rady, ochotu a přístup při konzultování mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala své rodině, panu Ing. Petru Vaníkovi a panu RNDr. Karlu Fajfrlíkovi Ph. D. a paní Ing. Marcele Petržílkové za poskytnuté materiály.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 12. 5. 2016

Romana Bachurová

1 Abstrakt

Toxoplazmóza je velmi častá parazitární infekce, způsobená prvokem *Toxoplasma gondii*. Prevalence v České republice se pohybuje kolem 25 – 35 %. Onemocnění má většinou benigní průběh, ale závažné komplikace mohou nastat v případě přenosu infekce z matky na dítě během gravidity nebo v důsledku reaktivace latentní infekce u imunodeficitních osob. Jako nejčastější způsob nákazy se jeví konzumace nedostatečně tepelně upraveného masa. Stanovení diagnózy probíhá na základě serologických metod, např.: KFR, ELISA nebo NFR. Mezi metody přímého průkazu *Toxoplasma gondii* se řadí PCR nebo histologie. Toxoplazmóza je infekční onemocnění a proto ze zákona podléhá hlášením, která se shromažďují v databázi SZÚ – tzv. Epi – Datu. Stanovení diagnózy podle sérologie nemusí být vždy jednoznačné a interpretace výsledků spadá vždy do kompetence lékaře. V práci jsou porovnávány metody, kterými se toxoplazmóza vyšetřuje na třech českých a jednom zahraničním pracovišti. Taktéž jsou porovnány výsledky, kterých tato pracoviště dosahují.

Klíčová slova: toxoplazmóza, imunokompromitovaní pacienti, diagnostika, prevence.

2 Abstrakt

Toxoplasmosis is a very frequent parasitic infection caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*. Prevalence in the Czech Republic is around 25-35%. The disease is usually benign, but severe complications can occur in case of transmission of infection from mother to child during pregnancy or due to reactivation of latent infections in immunosuppressed persons. The most frequent way of infection appears to be consuming undercooked meat. Diagnosis is based on serological methods, eg.: KFR, ELISA or NFR. Among the methods for direct detection of *Toxoplasma gondii* ranks PCR or histology. Toxoplasmosis is an infectious disease and therefore the law is subject to the reporting that is collected in a database SZÚ - called. Epi - Dat. Diagnosis by serology may not always be clear and interpretation of results always falls within the competence of doctors. The paper compares the methods by which the Toxoplasmosis is investigated by three Czech and the one foreign workplace. Results of this workplaces are compared.

Key words: toxoplasmosis, immunocompromised patients, diagnostics, prevention.

Obsah

1	Abstrakt	4
2	Abstrakt	5
3	Zadání bakalářské práce – cíl práce	8
4	Úvod	9
5	Teoretická část	10
5.1	Historie	10
5.2	Epidemiologie	11
5.3	Morfologie	12
5.3.1	Vývojová stadia toxoplazmózy	13
5.3.2	Životní cyklus	14
5.4	Příznaky a formy získané toxoplazmózy u dospělých	15
5.4.1	Lymfatická forma onemocnění	15
5.4.2	Oční forma onemocnění	16
5.4.3	Postižení CNS	16
5.4.4	Ostatní formy onemocnění	17
5.5	Klinické formy toxoplazmózy v dětském věku	17
5.6	<i>Toxoplasma gondii</i> u schizofrenie	18
5.7	Prevence	20
5.8	Terapie toxoplazmózy	20
6	Metodika	22
6.1	Nepřímé metody	22
6.1.1	Princip KFR	22
6.1.2	Komparativní western blot	23
6.1.3	ELISA test (Enzyme – linked imunisorbent assay)	24
6.1.4	ECLIA	25
6.1.5	Stanovení avidity IgG	25
6.2	Přímé metody	25
6.2.1	Pokus na zvířeti	25
6.2.2	Histologie	26
6.2.3	PCR (polymerázová řetězová reakce)	26
6.3	LCEM	28

6.4	Interpretace serologických nálezů.....	29
6.4.1	Serologické vyšetření u gravidních žen	30
7	Experimentální část.....	32
7.1	Elektrochemiluminiscenční imunostanovení – ECLIA (IgG).....	33
7.1.1	Použití	33
7.1.2	Princip testu.....	33
7.1.3	Složení soupravy	33
7.1.4	Pracovní postup.....	34
7.1.5	Interpretace výsledků	34
7.2	Elektrochemiluminiscenční imunostanovení – ECLIA (IgM)	35
7.2.1	Použití	35
7.2.2	Princip testu.....	35
7.2.3	Složení soupravy	35
7.2.4	Pracovní postup.....	36
7.2.5	Interpretace výsledku	36
7.3	EIA Toxoplazma IgA (Capture imunoenzymatická souprava).....	36
7.3.1	Princip testu.....	36
7.3.2	Složení soupravy	37
7.3.3	Pracovní postup.....	38
7.3.4	Interpretace výsledků	39
7.4	EIA Toxoplazma IgE	40
7.5	Výsledky	41
8	Diskuse.....	48
9	Závěr	50
10	Seznam použité literatury.....	51
11	Seznam obrázků	54
12	Seznam tabulek	54
13	Seznam zkratk	55

3 Zadání bakalářské práce – cíl práce

Cílem této bakalářské práce je popsat v teoretické části prvoka *Toxoplasma gondii*. Autor práce se zabývá mapováním historie jeho objevu a prvních hypotéz při zkoumání jeho vlivu na člověka.

Další část práce stručně popisuje morfologii, životní formy a cyklus tohoto parazita. Nedílnou součástí této práce je také rozbor jednotlivých forem onemocnění, které *Toxoplasma gondii* způsobuje. Na konci teoretické části autor poukazuje na nutnost prevence před onemocněním a zmiňuje zde možnosti terapie.

Druhá část práce se věnuje popisu diagnostických možností a postupů v laboratoři. V experimentální části práce se popisují diagnostické metody, kterými provádíme vyšetření pacientů v naší laboratoři OLM v Rychnově nad Kněžnou a porovnávají se naše laboratorní data s daty dvou českých a jedním zahraničním laboratorním pracovištěm.

4 Úvod

Toxoplasma gondii je parazitický prvok, který byl objeven před více než sto lety a to konkrétně v roce 1908. Zpozorován byl u drobného hlodavce *Ctenodactylus gundi*. Postupem času se zjistilo, že tento parazit je schopen napadnout téměř jakéhokoli teplokrevného živočicha, nevyjímaje člověka. [26, 27]

Veřejností je toxoplazmóza vnímána především jako onemocnění, kterým se můžeme nakazit pouze kontaktem s kočkou domácí. Je to z toho důvodu, že právě pohlavní vývoj toxoplazmózy se odehrává v trávicím traktu kočkovitých šelem. „*Tzv. oocysty obsahující sporozoity jsou vylučovány stolicí do zevního prostředí, kde se po dokončení sporulace stávají infekčními a jsou následně požitý mezipřevodcem (jakýkoli teplokrevný obratlovec).*“ [6, s.1]

Možností nakažení u člověka je však hned několik. K přenosu může dojít např. přímým kontaktem s infikovanými kočičími výkaly (např. při nedostatečně opatrném odstraňování kočičích výkalů z kočičího záchodku), dále požitím neumytých potravin, které byly v kontaktu s kontaminovanou půdou anebo konzumací nedostatečně tepelně upraveného masa, nejčastěji králíčího z domácích chovů. A právě nákaza nedostatečně tepelně upraveným masem je u člověka nejčastější. Toxoplazmóza je onemocnění, které je příčinou dětské úmrtnosti a působí nevratné změny jak u infikovaných přeživších dětí, tak i při nákaze v dospělém věku. Zvláště nebezpečná a může být i smrtelná je toxoplazmóza u pacientů s imunodeficiencí (AIDS), proto diagnostika a zjišťování aktivity onemocnění je u těchto rizikových skupin velice důležitá. [19]

5 Teoretická část

5.1 Historie

Parazit byl poprvé popsán v roce 1908 u severoafrického hlodavce *Ctenodactylus gundi*. Pojmenován byl podle svého obloučkovitého tvaru (*toxon* = oblouk) a hlodavce *Ctenodactylus gundi*. Současně téhož roku popsal stejný organismus z tkání králíka s paralýzou zadních končetin a příznaky meningoencefalitidy italský lékař Alfonzo Spendore v Brazílii. [1, 2, 20]

Toxoplazmózu jako chorobu člověka poprvé popsal český oční lékař Josef Janků. Proto se onemocnění označuje ve světové a české literatuře pod názvem Morbus (nemoc) Janků. Prof. MUDr. Janků popsal onemocnění v roce 1923 ve své práci Patogeneze a patologická anatomie tak zvaného vrozeného kolobomu žluté skvrny v oku normálně velkém a mikrophtalmickém s nálezy parazitů v sítnici. V práci popisuje tkáňové cysty parazita v oku jedenáctiměsíčního chlapce, postiženého hydrocefalem, levostranným mikrophtalmem a degenerativními ložisky v oblasti žluté skvrny. Objevuje tím původce kongenitální toxoplazmózy s infekční nákazou v době intrauterinní. Navíc upozorňuje na epidemiologický vztah onemocnění ke králíkům a předpokládá vliv parazita na končící formativní pochod fetální tkáně očního pohárku. Před touto prací v roce 1923 publikuje v časopise českých lékařů kazuistiku devítiletého chlapce se strabismem a hydrocefalem. Již zde se objevuje domněnka o zánětlivé oční infekci (zánětu sítnice) s pravděpodobností vzniku v době intrauterinní. Přesné zařazení parazita se nepodařilo, až teprve na zapůjčených preparátech Levadity v roce 1928 ve své práci upozorňuje na možnou souvislost s toxoplazmózou, která byla známá zatím jen u zvířat. [1,2]

Na poznání uzlinové formy (*lymfadenitis toxoplasmotica*) mají zásluhu J. Ch. Siim z Kodaně (1951) a vídeňští badatelé A. Pirigerová – Kuchinková a O. Thalhammer v letech 1952 – 1957. [1]

V roce 1970 na základě objevu fekálních forem skotským badatelem W. M. Hutchisonem bylo poukázáno na kočku jako na epidemiologicky významného konečného hostitele. První rutinně použitelný serologický test na toxoplazmózu zavedli A. B. Sabin a H. A. Feldman v roce 1948. (1) V roce 1957 Martin, Talammer, Piringerová – Kuchinková používají Sabin – Feldmanovu metodu a prokazují toxoplazmové protilátky u nemocných toxoplazmózou. [1, 2]

Toxoplazmóza je vzhledem k rozšíření u teplokrevných živočichů, včetně člověka, možnostem rozmnožování a přenosu předmětem zájmu klinických, laboratorních pracovníků na celém světě. Za sto let od objevu toxoplazmózy bylo vydáno více než dvacet tisíc publikací věnujících se této problematice. Proto stojí za zmínku práce dalších českých autorů jako např. práce Rašína o toxoplazmóze zajíce. Laboratorní diagnostikou toxoplazmózy u nás se od roku 1948 zabýval Havlík a na zavedení imunoepidemiologických a patogenetických studií toxoplazmózy má zásluhu akademik Jírovec. V roce 1974 vychází souhrnná publikace ohledně onemocnění toxoplazmózou autorů Kouba, Jíra, Hübner. [2, 25]

Celosvětový význam onemocnění toxoplazmózou dokazuje i proběhlý kongres konaný v roce 2008 v Rio de Janeiru, věnovaný stému výročí objevení parazita *Toxoplasma gondii*. [20]

5.2 Epidemiologie

Prvok se na celém světě vyskytuje u všech druhů teplokrevných domácích i divoce žijících zvířat. Dospělá populace u člověka je promořena deseti až osmdesáti procenty v celosvětovém měřítku. [5] „Člověk je tedy pouze jedním z mnoha možných a asi dvě stě známých mezipřehoditelů tohoto parazita.“ [7, s.197]

Toxoplazmóza je v současné době jednou z nejrozšířenějších zoonóz nejen v České republice, ale i na celém světě. V České republice má ve věku dvaceti let protilátky jedna čtvrtina až třetina populace, s vyšším věkem prevalence dále stoupá. Česká republika se tak řadí mezi země se střední hodnotou výskytu

toxopozitivity. Pozitivních je přibližně čtyřicet procent lidí starších čtyřiceti let. [7, 9]

V evropských zemích je udávána různá promořenost onemocněním. Ve Velké Británii se udává promořenost dvacet až čtyřicet procent, ve Francii až 80 – 90 %. Vyšší výskyt v evropských zemích je dáván do souvislosti s konzumací převážně nedostatečně tepelně upraveného masa. [10,11]

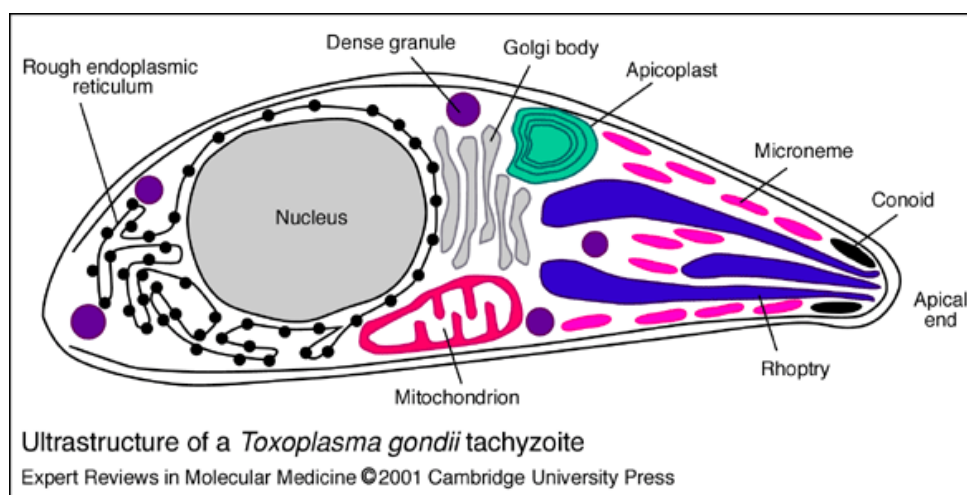
Byly také zaznamenány epidemie s lokálním charakterem a rodinným výskytem. V roce 1994 proběhla na Moravě epidemie toxoplazmózy, která měla výrazně lokální charakter. Zjištěno bylo 722 případů klinické toxoplazmózy s lymfadenitidou. Rodinný výskyt byl evidován v 60 % případů a zdroj infekce nebyl prokázán. [18]

Existují tři hlavní genotypy toxoplazmózy (typ I, typ II a typ III), které se vyskytují hlavně v Evropě a Severní Americe. Tyto genotypy se liší v jejich patogenitě a prevalenci u lidí. V Evropě a v USA je genotyp II zodpovědný za většinu případů vrozené toxoplazmózy. V Brazílii nebyl genotyp II naopak vůbec zjištěn. Jihoamerické genotypy se řadí do skupin IV a V. V poslední době se diskutuje o vlivu genotypu člověka na průběh onemocnění. [13, 20]

5.3 Morfologie

„Toxoplasma gondii je kokcidie příbuzná malarickým plasmodiím. Její trofická stádia (sporozoiti, tachyzoiti) se pohybují klouzáním, nemají ani bičíky, ani netvoří panožky. Jsou invazivní, k průniku do buněk infikovaného organismu slouží tzv. apikální komplex na předním konci buňky toxoplasmy.“ [4, s. 390]

Toxoplasma gondii je vyobrazena na snímku č. 1.



Obrázek 1: *Toxoplasma gondii*

Zdroj: [28]

5.3.1 Vývojová stadia toxoplazmózy

Nejdéle známou formou a vývojovým stadiem toxoplazmózy je trofozoit (nazývaný také jako tachyzoit). U hostitele, tedy i u člověka, se vyskytují intracelulárně nebo i volně v tělních tekutinách. Trofozoiti v akutním stadiu infekce intenzivně napadají buňky hostitele. [2, 4]

Trofozoit má obloukovitý tvar, měří 4-7 x 1.5-4 μm . Rozmnožování tachyzoitů probíhá specialisovanou nepohlavní formou tzv. endogenní asexuální reprodukci. Uvnitř mateřské buňky vzniknou dvě buňky dceřiné. Po rozpadnutí mateřské buňky se uvolní dva dceřiní jedinci. [1]

Další dvě stadia toxoplazmózy jsou stadia infekční. První je oocysta a druhé stadium je tkáňová cysta.

Vysporulovaná oocysta obsahuje 2 vejčité sporocysty. Každá sporocysta obsahuje čtyři sporozoity. Sporulace oocysty probíhá od 1. do 5. dne exogenně již mimo střevo kočky. Oocysty si zachovávají infekčnost až několik let. [1, 2, 4, 15]

Tkáňová cysta je klidová forma kulovitého nebo vejčitého tvaru dosahující velikosti až 300 mikrometrů. Je pokryta elastickou membránou, která je značně odolná proti mechanickému tlaku i proti působení tkáňových trávicích tekutin. [1]

Tkáňová cysta obsahuje bradyzoity (*bradus* - zdlouhavý). Počet bradyzoitů ve větší tkáňové cystě se odhaduje na několik set tisíc. Tkáňová cysta v orgánech hostitele přežívá bezpříznakově až do konce života. Mimo tělo hostitele přežívá při teplotě +8 až +10 stupňů °C 14 dnů, při teplotě +4 až +6 stupňů °C 24 dnů. Tkáňová cysta se nejčastěji nachází v CNS a v kosterní svalovině hostitele. [1, 4]

5.3.2 Životní cyklus

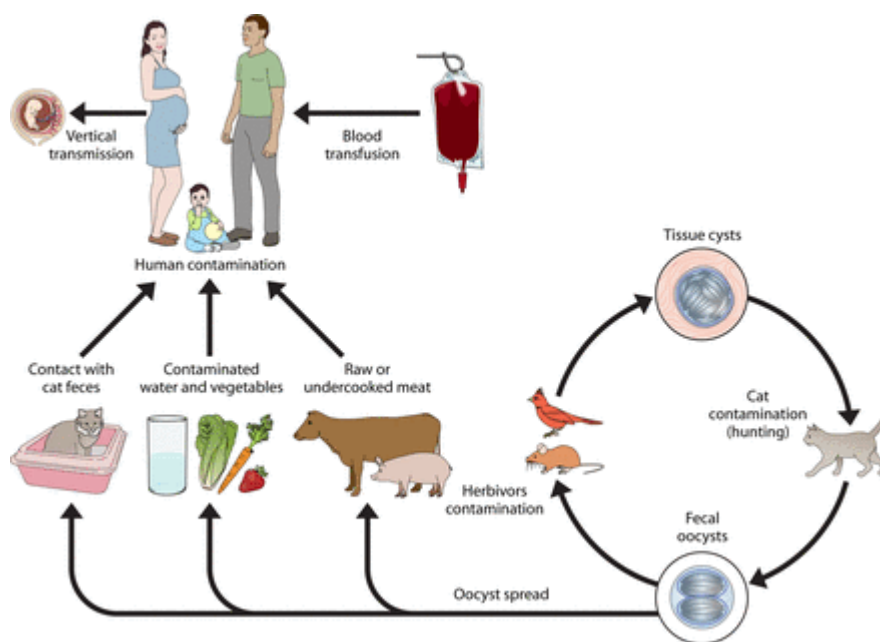
Toxoplasma gondii je parazit, který je velice výjimečný svými schopnostmi a možnostmi jak sexuálního množení, tak i množení nepohlavního. Toxoplazmóza patří mezi nejčastější zoonózy u nás i v celém světě. Tento parazit je schopen nakazit člověka, ale i jiného teplokrevného živočicha (savci, ptáci), kteří se tak zapojují do životního cyklu parazita jako mezihostitelé. [1,4,7]

Konečným hostitelem se stává kočkovitá šelma (kočka). Existují dvě infekční stadia *Toxoplasma gondii*. Prvním stadiem jsou zoocysty, které se vylučují trusem nakažených koček. Jsou výsledkem sexuálního množení parazita ve střevě kočky. Nakažená kočka vylučuje trusem denně asi 1 milion neinfekčních oocyst po dobu 1-3 týdnů. Oocysty dozrávají na vzduchu a stávají se infekčními za 2 až 5 dnů. Infekčními oocystami se může nakazit jak mezihostitel (člověk nebo jiný živočich) tak i jako hostitel další kočka. Toxoplazmózu prodělávají výhradně kořata, vylučování oocyst u nich trvá pouze 1 – 3 týdny. [4,6,7,15]

Nákaza oocystami probíhá konzumací nakažené nemyté zeleniny, ovocem, pitím nakažené vody. Oocysty jsou infekční několik měsíců i let. Oocystami jsou nakaženi nejvíce býložravci. U člověka je při nákaze oocystou

nejčastější přenos kontaminovaným ovocem nebo zeleninou. Nákaza oděrkami kůže bývá méně častá. [14]

Druhým infekčním stádiem je tkáňová cysta, která vzniká u ostatních živočichů (mezihostitelů). Vzhledem k imunitní odpovědi organismu pak ustává jejich nepohlavní rozmnožování a napadání buněk mozku, svalů atd. Tkáňová cysta se dostává do stadia klidu a čeká na oslabení imunity svého mezihostitele a při oslabení imunity pak dochází k reaktivaci onemocnění. Další možností aktivace tkáňové cysty je přenos na jiného živočicha konzumací nakaženého masa. A právě nákaza nakaženým masem obsahujícím tkáňové cysty je nejčastější u člověka. Cesty nákazy *T. G.* jsou zachyceny na obrázku číslo 2. [1, 2, 4, 7]



Obrázek 2: Cesty nákazy *T. G.*

Zdroj: [12]

5.4 Příznaky a formy získané toxoplazmózy u dospělých

5.4.1 Lymfatická forma onemocnění

Asi v 90 % probíhá infekce asymptomaticky, jedná se o většinu infikovaných pacientů. Menší skupina infikovaných pacientů má pouze

nespecifické příznaky podobající se běžnému virovému chřipkovému onemocnění jako jsou pocity únavy, bolesti hlavy, svalů, malátnost, subfebrilie. Příznaky se vyskytují dlouhodobě i několik měsíců. Nejčastějším příznakem akutní získané infekce je zduření mízních uzlin, tzv. lymfatická forma. Nejvíce bývají postiženy uzliny podčelistní, dále bývají zvětšeny uzliny v podpaží a tříslech. Zduření uzlin bývá dlouhodobé, někdy i několik měsíců. Zduření uzlin je však také nespecifickým příznakem a musí se v diferenciální diagnóze vyloučit ostatní onemocnění – a to s častějším i méně častým výskytem – TBC, infekční mononukleóza, hematologické maligní onemocnění a ostatní zoonózy – např. tularémie, mor, nemoc kočičího drápnutí, reaktivní lymfadenitida bakteriálního původu, záněty středouší, atd. [22]

5.4.2 Oční forma onemocnění

„Oční forma onemocnění probíhá pod obrazem chorioretinitidy, typické častými recidivami a její prognóza závisí zejména na lokalizaci a velikosti lézí.“ [16, s. 33] Proto se doporučuje trvalá dispenzární péče očním lékařem. U získané oční formy je část těchto očních poruch kongenitální a jsou diagnostikovány až při eventuální recidivě postnatálně. [5,15]

5.4.3 Postižení CNS

Při napadení centrálního nervového systému dochází k onemocnění s obrazem encefalitidy, především u nemocných s imunitní dysfunkcí a představuje nejčastější postižení CNS jako komplikace nákazy HIV.

„Mozková toxoplazmóza je u pacientů s pokročilou HIV infekcí nejčastější příčinou ložiskového postižení CNS a vyskytuje se u 10 – 20 % všech pacientů s AIDS.“ [9, s. 22]

Toxoplazmová encefalitida je často diagnostikována u pacientů s imunodeficitem při léčbě maligních hematologických onemocnění - myeloidní leukémie atd. [1,9,21,22]

5.4.4 Ostatní formy onemocnění

Kardiovaskulární forma bývá spíše komplikací některé akutní formy onemocnění. Jedná se nejčastěji o myokarditidu, vzácně perikarditidu. Forma septikemická a exantemická je vzácná, má nepříznivou prognózu, může být postiženo i více vnitřních orgánů. Mezi méně časté formy patří forma viscerální s častou mezenterální lymfadenitidou a postižením jater. Mohou se objevovat i orgánové formy s projevy pneumonie, postižení močového měchýře (uropatie), dělohy (endometrioza). Mezi další méně časté formy patří např. toxoplazmová myozitida. [1, 5, 23]

5.5 Klinické formy toxoplazmózy v dětském věku

Klinické formy toxoplazmózy v dětském věku jsou vrozená (kongenitální) a získaná (akvirovaná) toxoplazmóza.

Při vrozené (kongenitální) formě toxoplazmózy může dojít k přenosu onemocnění z matky na plod. Nejčastěji může jít o nákazu přímou, kdy matka nakazí dítě při průniku parazita placentou nebo nákazu nepřímou při nákaze matky chronickou endometritidou toxoplazmatického původu. [1, 11]

Míra rizika placentární nákazy a rozsahu poškození plodu závisí na fázi těhotenství. Čím dříve k onemocnění toxoplazmózou matky dochází, tím je poškození plodu větší, někdy dochází i ke spontánnímu potratu. Dítě se rodí mrtvé nebo různě těžce postižené. „*Postižení je označováno jako Sabinova triáda. Klasická Sabinova triáda (kalcifikace mozku, hydrocefalus, malformace oka) nemusí však být kompletní.*“ [5, s. 22]

„Riziko kongenitální toxoplazmózy hrozí při infekci neimunní matky v době těhotenství nebo těsně před otěhotněním.“ [15, s. 22]

Pravděpodobnost infekce plodu při primoinfekci matky v graviditě je v průměru nižší než 50 % a velmi výrazně se zvyšuje se stupněm těhotenství. Zatímco v čase otěhotnění je riziko pod 5 %, v prvním trimestru stoupá na 5 – 15 %, ve 36. týdnu je riziko až 71 %. Seronegativní ženy před a na začátku těhotenství tvoří rizikovou skupinu. V některých zemích se proto provádí i povinný opakovaný screening toxoplazmózy v době těhotenství, např. v Rakousku jsou doporučovány další tři testy, ve Francii jsou seronegativní ženy během těhotenství testovány každý měsíc, jistě v souvislosti s vyšším výskytem onemocnění. Serologický screening je prováděn i na Slovensku. V ČR se jedná o vyšetření, které patří k doporučeným. Onemocnění v průběhu těhotenství napadá hlavně centrální nervový systém a dále dochází k závažným postižením oka ve formě chorioretinitidy. Děti, které se nakazí během těhotenství, se mohou narodit bez postižení. Onemocnění se může objevit s odstupem mezi 2. – 5. rokem života, většinou se jedná o postižení zraku a mozku. [1, 5, 6, 14, 17]

5.6 *Toxoplasma gondii* u schizofrenie

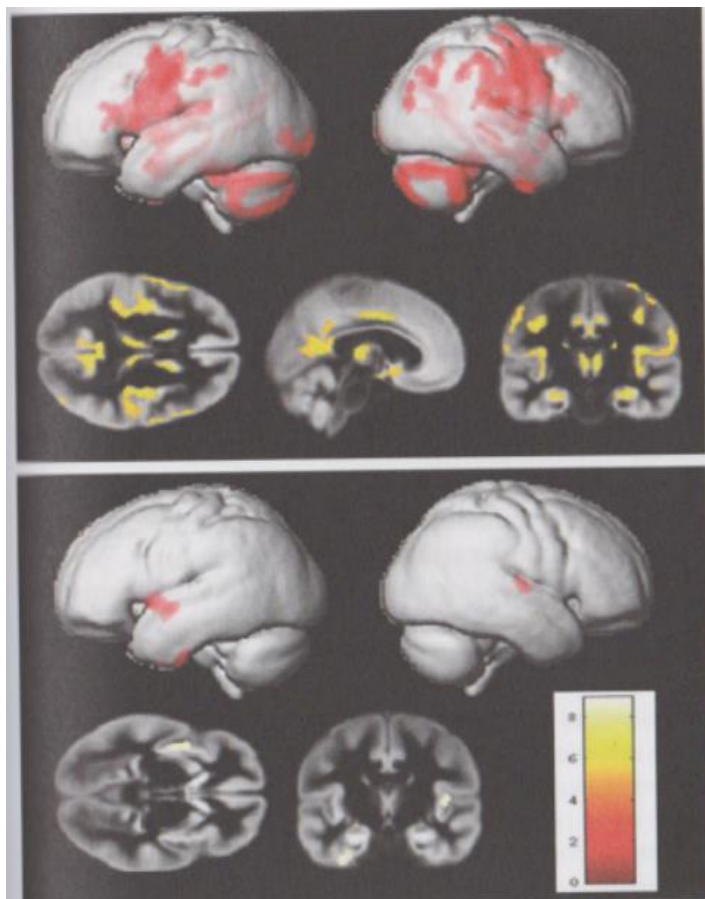
Vztah latentní toxoplazmózy a kognitivních psychopatologických změn u schizofrenie se v posledních letech stává předmětem intenzivního výzkumného zájmu. Předpokládá se, že parazitický prvek *Toxoplasma gondii* indukuje specifické změny v chování svého mezipostitele. Potvrzují to studie s laboratorními zvířaty. [21]

Dalším předmětem zkoumání metodou MRI (magnetické rezonance) byly rozdíly v anatómiích mozku zdravých osob a schizofreniků. Byly zjištěny rozdíly v morfologii mozku toxoplazma – negativních a toxoplazma – pozitivních schizofreniků a psychicky zdravých osob.

U infikovaných osob byla zjištěna nižší hustota v částicích v nervové tkáni. Zjistilo se, že mozky nenakažených a nakažených zdravých lidí se skoro

neliší, kdežto mozky nakažených a nenakažených schizofreniků vykazují velké degenerativní změny.

Nejpravděpodobnějším vysvětlením je, že pod obrazem schizofrenie se skrývají ve skutečnosti dvě různá onemocnění, z nichž jedno, provázené morfologickými změnami mozku a patrně těžší, je vyvoláváno toxoplazmózou. Druhá možnost je, že toxoplazmóza výrazně zhoršuje průběh schizofrenie. Na obrázku č. 3 jsou v jeho vrchní části znázorněny rozdíly v morfologii mozku *T. G.* – negativních a *T. G.* – pozitivních schizofreniků. Spodní část tohoto obrázku zachycuje morfologii mozku normálních psychicky zdravých osob. Červené oblasti znázorňují nižší hustotu nervové hmoty. [26]



Obrázek 3: Hustota nervové hmoty u schizofreniků a psychicky zdravých osob

Zdroj: [26]

5.7 Prevence

Nejefektivnější ochrana před onemocněním toxoplazmózou je prevence před nákazou. Člověk by měl konzumovat dostatečně tepelně upravené maso, ovoce a zeleninu před konzumací důkladně omýt vodou. Důležité je nekrmit domácí kočky syrovým masem, čistit a dezinfikovat kočičí WC s ochrannými rukavicemi a chránit dětská pískoviště před nákazou kočičími výkaly.

Vzhledem k závažnosti onemocnění lidského plodu je vhodné prosadit povinně opakovaná vyšetření sérologie u matek, jako je tomu např. ve Francii, Rakousku a Slovensku a tím zajistit včasnou diagnózu a léčbu onemocnění. V České republice lze doporučit provádění vyšetření u seronegativních pacientek jedenkrát za trimestr. [15]

Dobré výsledky se objevují v souvislosti s vakcinací atenuovanými (oslabenými) kmeny, které by bylo možno masově použít ve veterinární medicíně hlavně k vakcinaci koček. [20, 24]

Nejlepším řešením by však bylo očkování vakcínou u člověka. Očkovací látka vhodná k imunizaci lidí je ještě v nedohlednu. [9]

5.8 Terapie toxoplazmózy

U dospělých se asymptomatická a uzlinová forma získané toxoplazmózy neléčí. Léčba je prováděna u pacientů s chorioretinitidou či s jinou formou orgánového onemocnění. Zvýšená pozornost a eventuelní léčba musí být prováděna u pacientů s imunodeficiencí (AIDS). Při léčbě toxoplazmózy existují osvědčená schémata a kombinace léků. Základní terapie je prováděna těmito preparáty: Spiramycin, Pyrimethamin, Sulfadiazin (v ČR nahrazen antibiotikem Klindamycinem), Leukovorin a kortikoidy. [1, 8, 9, 11]

Terapie kongenitální nákazy a léčebná schémata se v současné době liší dle jednotlivých států. Pokud jde u těhotné ženy o podezření na infekci

toxoplazmózou, je doporučováno preventivní zajištění Spiramycinem. Lék se koncentruje v placentě, jeho úkolem je prevence nákazy. Lék má minimální nežádoucí účinky u matky a vzhledem k tomu, že neprochází placentou, není toxický pro plod. Při verifikaci onemocnění plodu toxoplazmózou je po šestnácti až osmnácti týdnech těhotenství doporučována kombinace Pyrimethaminu a Sulfadiazinu a kyseliny folinové. Není doporučováno podávat výše zmíněnou kombinaci léků dříve vzhledem k možné teratogenitě plodu Pyrimethaminem. Léčba by měla být indikována až při pozitivním nálezu z vyšetření plodové vody.

[15]

6 Metodika

V laboratorní diagnostice se nejvíce využívá průkazu specifických protilátek. Většinou je doporučováno vyšetření dvěma různými testy. Sabinův – Feldmanův test barvitelnosti (dye-test) se v současnosti provádí jen ve specializovaných laboratořích.

V ČR se pro stanovení celkových protilátek používá nejvíce metoda komplement fixační reakce (KFR), ELISA a imunofluorescenční reakce (NFR). Při využití westernové imunoblotové techniky je možné porovnání protilátkových profilů v různých tělesných tekutinách i v komorovém moku. Touto metodou lze stanovit produkci lokálních protilátek při chorioretinitidě.

Jako přímá metoda se používá polymerázová řetězová reakce. Slouží k průkazu DNA v biologických tekutinách např. fetální a venózní krvi, plodové vodě, likvoru, placentě atd. K dalšímu přímému průkazu tkáňových cyst *Toxoplasma gondii* se může využít pokus na zvířeti, kdy je laboratorní myši inokulována plodová voda pacientky. (1)

6.1 Nepřímé metody

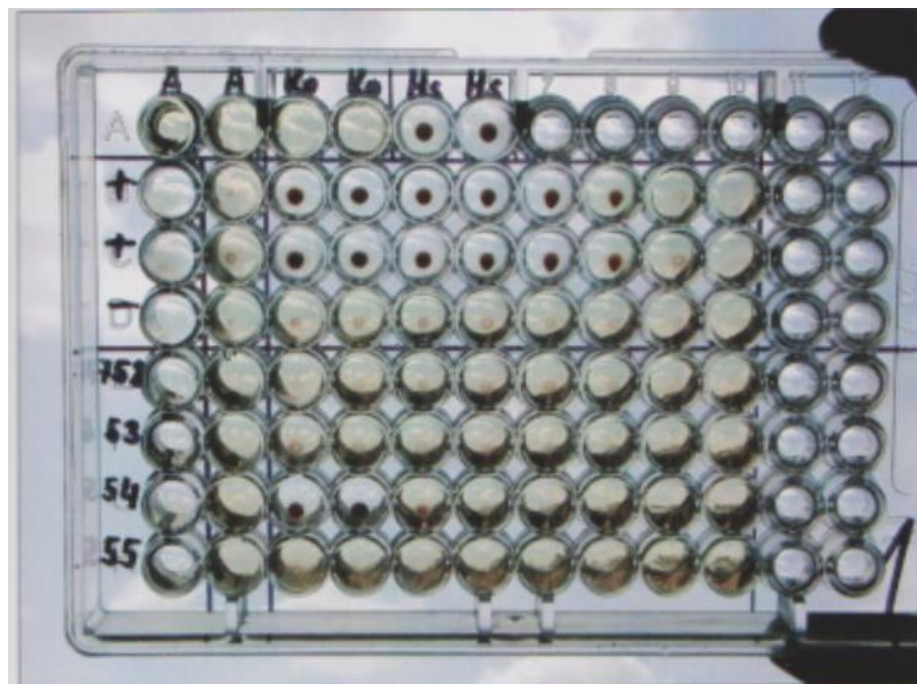
6.1.1 Princip KFR

Komplement fixační reakce (KFR) je imunologická metoda patřící mezi základní serologické metody, jež fungují na principu reakce protilátky s antigenem. KFR využívá schopnosti vázat se na komplex antigen s protilátkou (IgG a IgM izotopu) a následně tím aktivovat komplementový systém. Používá se ke stanovení celkových protilátek. [30]

Průkaz se provádí v séru, likvoru nebo stolici. Komplement je vícesložkový rozpustný systém krevní plazmy, jenž je aktivován protilátkou navázanou na antigen. Při KFR se smísí naředěné sérum s antigenem a specifickým množstvím

komplementu. Když je v séru přítomna hledaná protilátka, dojde k navázání antigenu a k aktivaci a následnému úbytku přítomného komplementu.

Přidají se beraní erythrocyty a protilátka vůči povrchu těchto erythrocytů (tzv. amboceptor). Jsou-li v séru hledané protilátky, účinný komplement již nezbývá a erythrocyty sedimentují na dně jamky. To je důkaz přítomnosti hledaných protilátek v séru pacienta. V opačném případě se komplement nespotřeboval, aktivuje se až nyní a způsobí lýzu erythrocytů. To signalizuje nepřítomnost protilátek v séru pacienta. [31]



Obrázek 4: KFR, odečet výsledků v mikrotitrační destičce

Zdroj: [3, s. 37]

6.1.2 Komparativní western blot

*„Tato metoda slouží k porovnání profilu protilátek ze séra matky s profilem z plodové vody, pupečnickové krve či krve novorozenecké. Na elektroforeticky rozloženém antigenu *Toxoplasma gondii* srovnáváme reaktivitu protilátek tříd IgG nebo IgM na jednotlivých antigenních determinantách.“* [15, s. 34]

Techniku western blotu můžeme rozdělit do několika kroků. V tom prvním je antigenní směs elektroforeticky rozdělena na polyakrylamidovém gelu. Z něj je pomocí elektrického proudu přenesena na nitrocelulózový proužek tzv. WB strip. Tento postup se nazývá blotování. Zkoumaný vzorek se inkubuje s WB stripem. Specifické protilátky se naváží na antigenní komponentu, potom následuje navázání konjugátu a jeho reakce se substrátem. Výsledkem je barevný proužek na WB stripu v místě pozice daného antigenu. K hodnocení je možno využít denzitometr, jinak se hodnotí jen okem. [29]

6.1.3 ELISA test (Enzyme – linked immunosorbent assay)

Test ELISA patří mezi nejvyužívanější detekční postupy. Lze jím rozlišit jednotlivé třídy protilátek. ELISA patří mezi heterogenní enzymatické imunoeseje (EIA – dělí se na homogenní, které probíhají pouze v tekuté fázi a heterogenní ve spojení s pevnou bází). Jedná se o tzv. sendvičovou metodu.

Princip metody spočívá v navázání antigenu na pevnou bázi (např. na dno mikrotitrační destičky). Po přidání vyšetřovaného séra dojde v přítomnosti hledaných protilátek ke vzniku vazby.

Dalším krokem je inkubace a následné odmytí séra. Následuje přidání konjugátu, což jsou protilátky proti lidským protilátkám značené enzymem. Opět následuje inkubace a promytí. Pak je přidán substrát, který je v přítomnosti navázaného enzymu štěpen za vzniku barevné reakce. Podmínky reakce jsou určeny výrobcem diagnostické soupravy.

Nakonec dojde k zastavení reakce roztokem kyseliny nebo louhu. Intenzita zabarvení odpovídá pozitivitě vyšetřovaného séra, které se měří pomocí spektrofotometru a vyhodnotí se metodou tzv. standardu cut – off. Diagnostická souprava ELISA umožňuje stanovení specifických IgA protilátek s tradičními IgM a IgG. Tím usnadňuje rozlišení probíhající aktivní infekce od infekce proběhlé v minulosti. [3]

6.1.4 ECLIA

Metoda ECLIA je elektrochemiluminiscenční imunostanovení, které je určeno pro použití na imunochemických analyzátoch. Používá se imunosouprava pro kvalitativní stanovení *in vitro* IgG a IgM protilátek proti *Toxoplasma gondii* v lidském séru a plazmě. Analýza probíhá na přístrojích Elecsys a cobas. Detekcí IgG protilátek proti *Toxoplasma gondii* se indikuje akutní nebo latentní nákaza. Stanovením IgM protilátek proti *Toxoplasma gondii* se indikuje nákaza akutní nebo reaktivovaná. [32]

6.1.5 Stanovení avidity IgG

Avidita protilátek IgG je veličina vyjadřující pevnost vazby mezi antigenem a protilátkou. Tato metoda slouží k určení stáří infekce a je založena na faktu, že avidita antitoxoplazmických IgG je z počátku nízká, stoupá během prvních čtyř měsíců onemocnění toxoplazmózou. V průběhu infekce imunitní odpověď vyzrává a avidita protilátek stoupá. Když je avidita protilátek vysoká, znamená to, že infekce není v akutní fázi.

Při posuzování výsledků není číselná hodnota avidity příliš důležitá. Rozhodující je, jestli je hodnota vysoká nebo nízká, to znamená, jestli je index avidity vyšší nebo nižší než stanovená mez. Ta bývá u různých testů nastavena zhruba mezi dvaceti až třiceti procenty. [15, 33]

6.2 Přímé metody

6.2.1 Pokus na zvířeti

Živé tachyzoity lze prokázat izolačním pokusem. Laboratorní myši je intraperitoneálně inokulována plodová voda, což zachycuje obrázek č. 5. Po třech až šesti týdnech je myši vyšetřena krev na přítomnost protilátek. Potom je usmrcena a v preparátu z mozkové tkáně se hledají typické tkáňové cysty. Tato

metoda se využívá už jen v opravdu odůvodněných případech. Jedná se z pravidla o experimentální výzkum probíhající za jasně definovaných podmínek a pod dozorem etické komise. [3]



Obrázek 5: Inokulace plodové vody laboratorní myši

Zdroj: [3]

6.2.2 Histologie

Histologické metody využívají pro diagnózu akutní infekce průkazu přítomnosti tachyzoitů v tkáních nebo v tělních tekutinách (BAL, plodová voda nebo cerebrospinální tekutina) klasické barvení hematoxylin – eozinem či například imunoperoxydázou. Izolace toxoplazem z krve nebo z tělních tekutin se využívá v případě akutní infekce. Bioptický materiál se vyšetřuje *in-vivo* nebo *post-mortem*. Mikroskopický průkaz parazita má význam především v diagnostice toxoplazmové myokarditidy. [1, 2]

6.2.3 PCR (polymerázová řetězová reakce)

PCR vynalezl Kary B. Mullis v roce 1983. O deset let později za svůj objev získal Nobelovu cenu. Jedná se o jednoduchou enzymatickou metodu, která umožňuje neomezeně amplifikovat (pomnožit) požadovaný specifický úsek DNA.

PCR je důležitá pro stanovení diagnózy u rizikových skupin pacientů. Jedná se především o gravidní ženy a imunodeficientní pacienty. Při stanovení diagnózy se využívá několik PCR technik – nested PCR, konvenční PCR nebo real-time PCR. Vyšetřován je různý klinický materiál – krev, cerebrospinální tekutina, plodová voda nebo biopsie tkání.

Výhody PCR: rychlost, citlivost, specifita, přímý průkaz, jasný výsledek (pozitivita x negativita).

Nevýhody PCR: rozdílná senzitivita (záleží na typu odebraného materiálu – u likvoru je citlivost metody nízká)

falešně negativní výsledky u nasazení ATB terapie

Metoda PCR se provádí v tzv. termocyklerech.

6.2.3.1 Princip PCR

Jedná se o opakovanou řízenou denaturaci dvouřetězcové DNA. Jednotlivé řetězce se poté renaturují se specifickými oligonukleotidy, jenž jsou v reakci v nadbytku. Ty se pak stávají primerem při syntéze nového řetězce DNA. Namnožení DNA probíhá v těchto cyklech:

Denaturace – dojde k zahřátí dvouvláknové DNA na 92 – 95 °C, nastane rozdělení na jednovláknové řetězce DNA.

Hybridizace (annealing) – Je to nasednutí primerů na komplementární sekvence. Reakce probíhá při teplotě 45 – 60 °C – při zchlazení. Tato fáze reakce je nejdůležitější, je nutné dodržení optimální teploty pro správné nasednutí primerů.

Elongace – Při teplotě 65 – 75 °C probíhá syntéza nových řetězců, které navazují na 3'-OH-konce primerů. Reakce je katalyzována DNA polymerázou (např. Taq polymeráza, která je získána z termofilní bakterie „*Thermus aquaticus*“). [34]

6.3 LCEM

LCEM (laboratoře centra epidemiologie a mikrobiologie) je komplex dvaceti čtyř Národních referenčních laboratoří a jedné laboratoře nereferenční. *„Poprvé byly LCEM Českým institutem pro akreditaci akreditovány v roce 2001 podle ČSN EN ISO/IEC 17025. Od roku 2005 jsou LCEM akreditovány také podle ČSN EN ISO 15189.“* [35]

LCEM se zabývají problematikou vzniku a šíření nákaz virového, bakteriálního a parazitárního původu. Řeší úkoly mikrobiologického a epidemiologického charakteru a vykonávají poradenskou činnost pro ostatní regionální laboratoře. Jejich úlohou je také hlášení epidemiologických dat do národních i mezinárodních databází.

V letech 1990 až 1992 byl vypracován v Hygienické službě program Epi-Dat. Je určen k zajištění kontroly výskytu infekcí a je celostátně používán na všech odděleních epidemiologie a OOVZ (orgány ochrany veřejného zdraví) od roku 1993.

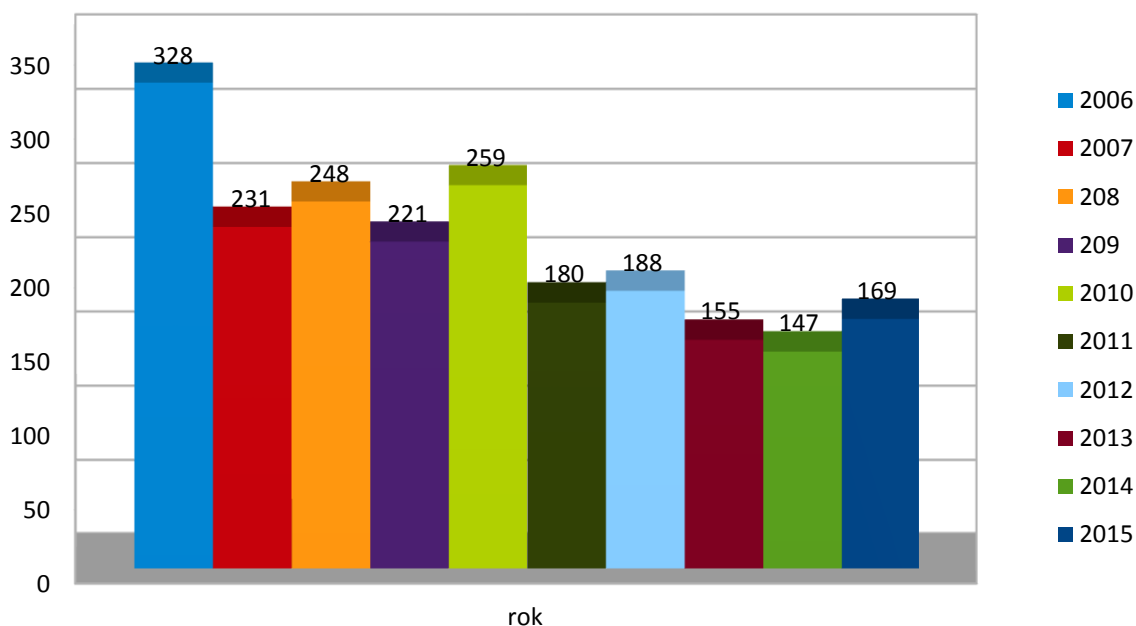
Hlášení infekčních onemocnění do Epi-Datu je základem pro místní, regionální, národní a mezinárodní surveillance infekčních nemocí.

V České republice toxoplazmóza podléhá povinnému hlášení, které se provádí na předepsaném formuláři. Hlášenka obsahuje: potvrzené onemocnění, nosičství a úmrtí. Tabulka č. 1 znázorňuje počet nově hlášených osob nakažených toxoplazmózou za roky 2006 – 2015. Tyto počty zachycuje obrázek č. 6. [35]

Tabulka 1: Hlášený výskyt toxoplazmózy v ČR

rok	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
počet	328	231	248	221	259	180	188	155	147	169

Zdroj: [35]



Obrázek 6: Výskyt toxoplazmózy v ČR v letech 2006 - 2015

Zdroj: [35]

6.4 Interpretace serologických nálezů

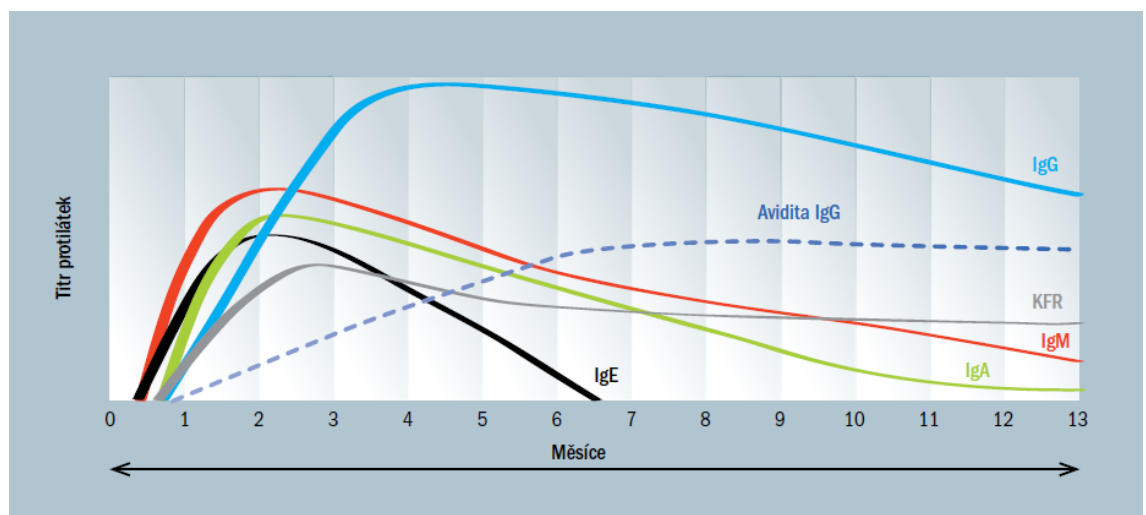
Fáze akutní - je typická při prudkém nástupu akutních markerů (IgA, IgM, IgE), také vzestupem nízkoavidních IgG a celkových protilátek a obvykle trvá asi čtyři až šest měsíců.

Fáze subakutní – vyznačuje se stabilizací celkových protilátek a IgG s hraniční až vysokou aviditou při poklesu akutních markerů.

Fáze latentní – odpovídá kompletní encystaci parazita do tkáňových cyst (nízký titr celkových látek a vysoko avidních IgG, negativita akutních markerů) – k tomu dochází většinou kolem jednoho roku od nákazy. (36)

6.4.1 Serologické vyšetření u gravidních žen

Pokud je na počátku gravidity nízký titr IgG protilátek a vysoká hodnota avidity, poukazuje to na latentní infekci. Akutní infekce se vyznačuje vysokými titry IgM, IgA a IgE protilátek s nízkou aviditou IgG protilátek. Protilátková odpověď v čase je graficky znázorněna na obrázku č. 7. Tabulka č. 2 zachycuje interpretaci výsledných hodnot protilátek. (37)



Obrázek 7: Protilátková odpověď v čase

Zdroj: [39]

Tabulka 2: Interpretace protilátek

Hodnota protilátek	Interpretace
IgG -; IgM -	Riziko akutní infekce
IgG -; IgM +	Akutní infekce, riziko pro kongenitální infekci
IgG+; IgM -	Není riziko pro kongenitální infekci
IgG+; IgM+	Riziko kongenitální infekce

Zdroj: [38]

IgG negativní a IgM negativní

Toxoplazma – naivní jedinci. Chybí získaná imunita, primární infekce může propuknout při každém kontaktu s patogenem. Doporučuje se testování na přítomnost protilátek v pravidelných intervalech.

IgG pozitivní a IgM negativní

Ženy, které se již s *T. G.* setkaly a jsou nejspíš nositelkami neproliferativních cyst. Imunita je už vyvinutá, a proto je nebezpečí vertikálního přenosu a poškození plodu minimální.

IgG negativní a IgM pozitivní

- Počátek infekce mohl nastat ještě před IgG sérokonverzí
- Nespecifické IgM protilátky

Možnost opakování testu o tři týdny později.

IgG pozitivní a IgM pozitivní

Doporučuje se provést test avidity IgG protilátek. Při vysoké aviditě došlo k infekci již před více než čtyřmi měsíci. IgM pozitivní výsledek může být nejspíše důsledkem přetrvávajících IgM protilátek. Při nízké nebo hraniční aviditě je riziko pro nenarozené dítě značné. [38]

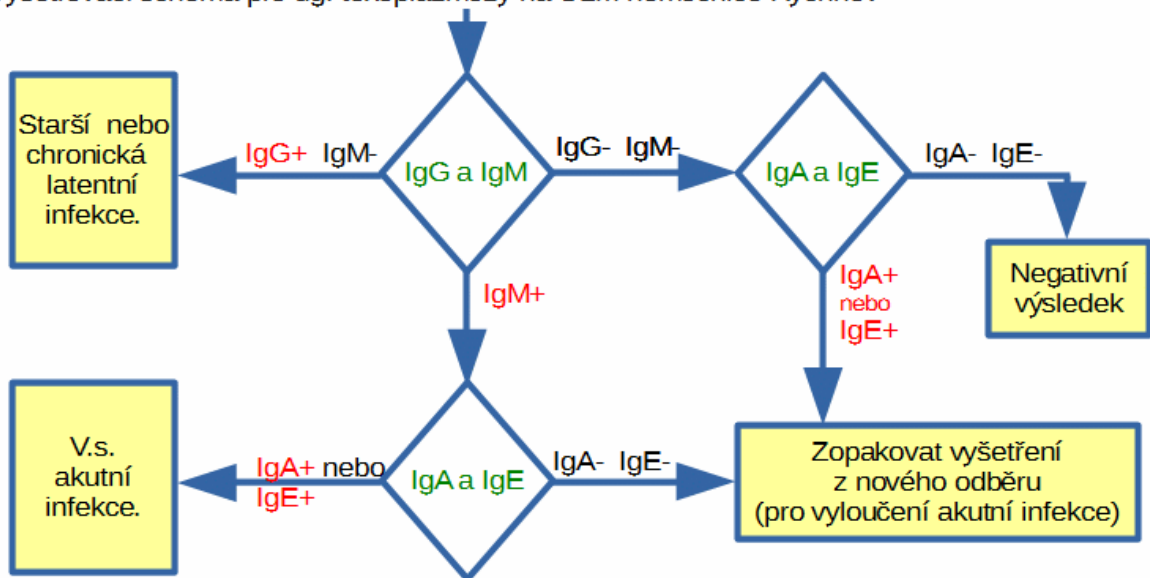
7 Experimentální část

Experimentální část práce se zabývá laboratorní diagnostikou toxoplazmózy nepřímými metodami – průkazem protilátek IgG, IgM, IgA a IgE. Standartní vyšetřovací postup na OLM v Rychnově nad Kněžnou je následující:

- U všech vzorků provádíme stanovení hladiny protilátek třídy IgG (kvantitativně v kIU/l) a kvalitativní stanovení hladiny protilátek IgM.
- V případě negativního výsledku IgG nebo pozitivního výsledku IgM provádíme dále kvalitativní stanovení protilátek třídy IgA a IgE.

Na obrázku č. 8 je vyobrazeno vyšetřovací schéma.

Vyšetřovací schéma pro dg. toxoplazmózy na OLM nemocnice Rychnov



Obrázek 8: Vyšetřovací schéma toxoplazmózy

Zdroj: Vlastní zpracování autora

V následujícím textu budou popsány metody, kterými provádíme výše uvedená vyšetření.

7.1 Elektrochemiluminiscenční imunostanovení – ECLIA (IgG)

7.1.1 Použití

Imunostanovení pro *in vitro* kvantitativní měření IgG protilátek proti *Toxoplasma gondii* v lidském séru a plazmě. Metoda ECLIA je určena pro použití na imunochemických analyzátoch Elecsys a cobas e.

7.1.2 Princip testu

Jedná se o sendvičový princip. Celková doba stanovení je 18 minut.

- 1. inkubace: 10 μ L vzorku, biotinylovaný rekombinantní *T. gondii* – specifický antigen a rekombinantní *T. gondii* – specifický antigen značený rutheniovým komplexem [Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)-komplex] reagují za tvorby sendvičového komplexu.
- 2. Inkubace: po přidání mikročástic, potažených streptavidinem, se komplex váže na pevnou fázi prostřednictvím interakce mezi biotinem a streptavidinem.
- Reakční směs je nasáta do měřicí komůrky, kde jsou mikročástice zachyceny magnetickým polem na povrchu elektrody. Nenavázané složky jsou odstraněny systémovým pufrem. Přivedené napětí na elektrodě vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů, která je změřena fotonásobičem.
- Výsledky jsou zjištěny z kalibrační křivky, která je specificky vytvořena pro přístroj dvoubodovou kalibrací, a master křivky, dodávané v čárovém kódu reagentie.

7.1.3 Složení soupravy

Reagentie – pracovní roztoky

M mikročástice potažené streptavidinem

R1 toxoplazma – Ag – biotin

R2 toxoplazma – Ag – rutheniový komplex

7.1.4 Pracovní postup

Promíchání mikročástic před použitím proběhne automaticky. Specifické parametry jsou pro test načteny z čárového kódu reagentie. Vytemperují se chlazené reagentie na teplotu přibližně 20°C a umístí se do reagenčního kotouče analyzátoru. Systém automaticky reguluje teplotu reagentií a otvírá a zavírá nádobky. Kalibrátory se umístí do prostoru pro vzorky. Všechny informace nezbytné pro kalibraci stanovení jsou automaticky načteny do analyzátoru.

7.1.5 Interpretace výsledků

Analyzátor automaticky počítá koncentraci analytu pro každý vzorek v IU/ml. Výsledky získané stanovením Elecsys Toxo IgG by měly být interpretovány s přihlédnutím k příslušnému algoritmu, který se používá pro screening toxoplazmy u těhotných žen dle národních a místních pokynů nebo doporučení.

První testování Toxo IgG se používá jako screeningové stanovení první linie.

Nereaktivní: < 1 IU/ml

Neurčité: $\geq 1 < 3$ IU/ml

Reaktivní: ≥ 3 IU/ml

Vzorky s koncentrací < 1 IU/ml jsou podle stanovení Elecsys Toxo IgG nereaktivní. Vzorky s koncentrací ≥ 3 IU/ml se považují za pozitivní na protilátky IgG proti *T. gondii* a indikují buď akutní nebo latentní nákazu. (39)

7.2 Elektrochemiluminiscenční imunostanovení – ECLIA (IgM)

7.2.1 Použití

Imunosouprava pro *in vitro* kvalitativní stanovení IgM protilátek proti *Toxoplasma gondii* v lidském séru a plazmě. Elektrochemiluminiscenční imunostanovení ECLIA je určeno pro použití na analyzátoch Elecsys a cobas e.

7.2.2 Princip testu

Princip testu μ - Capture. Celková doba stanovení je 18 minut.

- 1. Inkubace: 10 μ L vzorku je automaticky předředěno 1:20 použitím diluentu vzorků. Rekombinantní antigen specifický pro *T. gondii* označený rutheniovým komplexem je přidán. Protilátky anti – IgM přítomné ve vzorku reagují s rekombinantním antigenem specifickým pro *T. gondii* označeným rutheniem.
- 2. Inkubace: přidány jsou biotinylované monoklonální IgM – specifické protilátky a mikročástice potažené streptavidinem. Komplex se váže na pevnou fázi prostřednictvím interakce mezi biotinem a streptavidinem.

Další body principu testu jsou shodné s předešlým testem.

7.2.3 Složení soupravy

Reagencie – pracovní roztoky

M mikročástice potažené streptavidinem

R1 toxoplazma – Ag – rutheniový komplex

R2 anti-h-IgM-Ab-biotin

Biotinylovaná monoklonální protilátka anti-h-IgM(myší).

7.2.4 Pracovní postup

Promíchání mikročástic před použitím proběhne automaticky. Specifické parametry jsou pro test načteny z čárového kódu reagentie. Vytemperují se chlazené reagentie na teplotu přibližně 20°C a umístí se do reagentního kotouče analyzátoru. Systém automaticky reguluje teplotu reagentií a otvírá a zavírá nádobky. Kalibrátory se umístí do prostoru pro vzorky. Všechny informace nezbytné pro kalibraci stanovení jsou automaticky načteny do analyzátoru.

7.2.5 Interpretace výsledku

Analyzátor automaticky vypočítává cut-off na základě měření dvou kalibrátorů. Výsledky vzorků mohou být vydávány buď jako reaktivní nebo nereaktivní, jakož i v podobě indexu cut-off. Výsledky získané stanovení Elecsys Toxo IgM mohou být interpretovány takto:

Nereaktivní: $< 0,8$ COI (cut-off index)

Neurčité: $\geq 0,8 < 1,0$ COI

Reaktivní: $\geq 1,0$ COI

Vzorky s indexem cut-off $< 0,8$ jsou nereaktivní při stanovení Elecsys Toxo IgM. Vzorky s indexem cut-off mezi $\geq 0,8 < 1,0$ jsou považovány za neurčité. Vzorky by měly být znovu otestovány. V případě, že výsledek je opět neurčitý, by druhý vzorek měl být testován např. do dvou až třech týdnů. Vzorky s indexem cut-off $\geq 1,0$ jsou reaktivní při stanovení Elecsys Toxo IgM. [39]

7.3 EIA Toxoplazma IgA (Capture imunoenzymatická souprava)

7.3.1 Princip testu

Souprava umožňuje detekci specifických protilátek proti *Toxoplasma gondii* třídy IgA ve vzorku metodou EIA, typ capture (tj. pevná fáze s navázanou

zvířecí protilátkou proti lidským imunoglobulinům třídy IgA) tracer, tj. specifický antigen se značenou protilátkou. Značená protilátka je myší monoklonální protilátka proti povrchovému proteinu p30 *Toxoplasma gondii* konjugovaná křenovou peroxidázou. Peroxidázová aktivita se stanovuje pomocí substrátu s TMB, který zmodrá v případě positivity. Celá reakce je ukončena zastavovacím roztokem. Dojde ke změně modrého zabarvení na žluté. Intenzita žlutého zabarvení se měří na fotometru (při vlnové délce 450nm) a je úměrná koncentraci specifických protilátek přítomných ve vzorku.

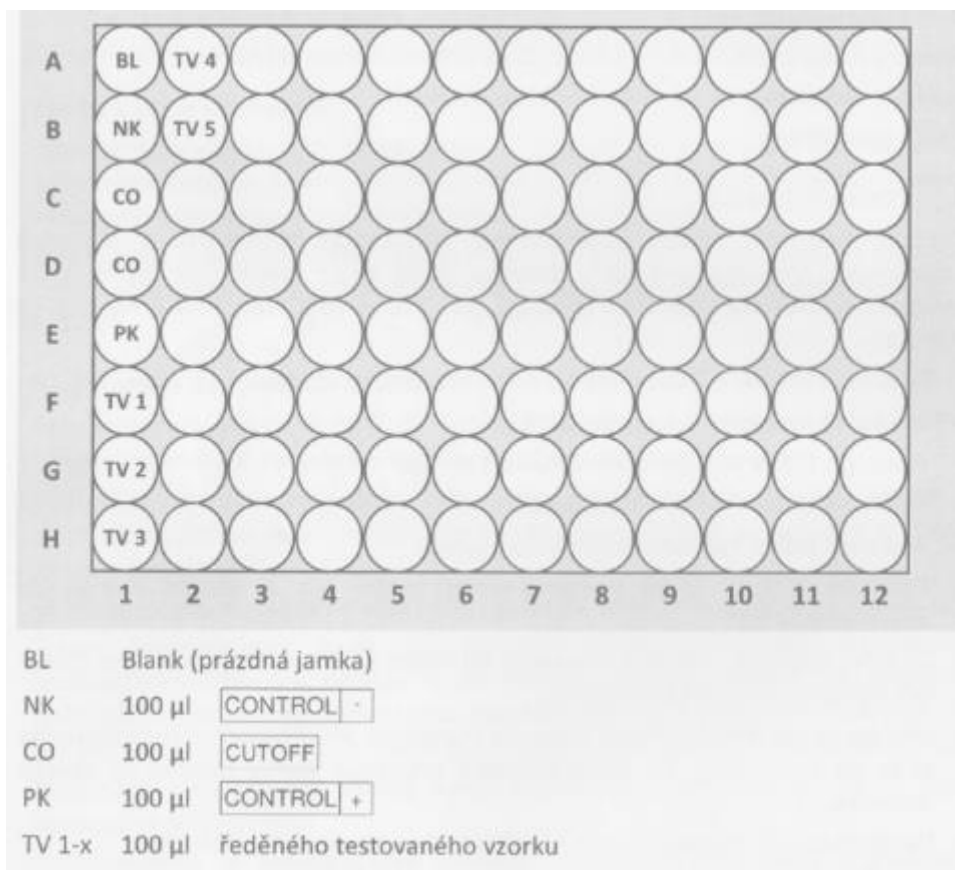
7.3.2 Složení soupravy

Microplate	Potažená destička 1 ks s navázanou protilátkou, 12 x 8 jamek v sáčku se sušidlem
Control -	Negativní kontrola. Roztok neobsahující specifické lidské protilátky, v pracovním ředění.
Cutoff	CUT-OFF. Roztok obsahující specifické lidské protilátky v hraniční koncentraci, v pracovním ředění.
Control +	Pozitivní kontrola. Roztok obsahující specifické lidské protilátky, v pracovním ředění.
Tracer	Tracer. Lyofilizát obsahující antigen <i>T. gondii</i> a konjugát
Diluent 3	Ředící roztok vzorků 3. Pufr se stabilizátory bílkovin, v pracovním ředění
Substrate 2	TMB-complete 2. Jednosložkový substrátový roztok obsahující TMB/H ₂ O ₂ , v pracovním ředění.
Tracer diluent	Ředící roztok v traceru
Wash 20x	Promývací roztok. Roztok kyseliny, v pracovním ředění.
Stop	Zastavovací roztok. Roztok kyseliny, v pracovním ředění.

7.3.3 Pracovní postup

Všechny reagentie se nechají vytemperovat na laboratorní teplotu a důkladně se promíchají.

1. Dávkuje se kontroly a ředěné vzorky podle pracovního schématu.
 - Jamka A1 se ponechá prázdná (blank).
 - Pipetuje se 100 μ l negativní kontroly do jedné jamky.
 - Pipetuje se 100 μ l cutoff do dvou jamek.
 - Pipetuje se 100 μ l pozitivní kontroly do jedné jamky.
 - Pipetuje se 100 μ l v odpovídajícím ředění do zbývajících jamek.
2. Destička se přikryje víčkem a inkubuje 60 minut při 37°C.
3. Odsaje se obsah jamek a pětkrát promyje pracovním promývacím roztokem. Jamky se plní po horní okraj.
4. Dávkuje se do všech jamek kromě A1 100 μ l rekonstituovaného Traceru.
5. Destička se přikryje víčkem a inkubuje 60 minut při 37 °C.
6. Odsaje se obsah jamek a pětkrát promyje pracovním promývacím roztokem.
7. Dávkuje se do všech jamek 100 μ l jednosložkového substrátu TMB-complete.
8. Destička se přikryje víčkem a inkubuje 20 minut při 37 °C v temnu.
9. Reakce se zastaví přidáním 100 μ l zastavovacího roztoku ve stejném pořadí a intervalech jako byl dávkován substrát.
10. Na fotometru se při vlnové délce 450 nm změří intenzita zbarvení roztoků v jamkách proti blanku (jamka A1) a to do třiceti minut po zastavení reakce.



Obrázek 9: Pracovní schéma EIA

Zdroj: [32]

7.3.4 Interpretace výsledků

Interpretace výsledků vyšetření se provádí dle následujících hodnot zaznamenaných v tabulce č. 3.

Tabulka 3: Interpretace výsledků

Index pozitivity (IP)	Hodnocení
menší než 0,9	negativní
0,9 až 1,1	hraniční
větší než 1,1	pozitivní

Zdroj: [32]

Vyšetření hraničních vzorků, tj. s indexem pozitivity 0,9 až 1,1 je zapotřebí opakovat z nového odběru za 2 až 6 týdnů s ohledem na specifika daného onemocnění. [32]

7.4 EIA Toxoplazma IgE

Metoda se shoduje ve všech parametrech s metodou EIA Toxoplazma IgA, liší se pouze v konjugátu. V následující tabulce č. 4 můžeme porovnat dobu stanovení i citlivost obou metod zmiňovaných v předešlém textu.

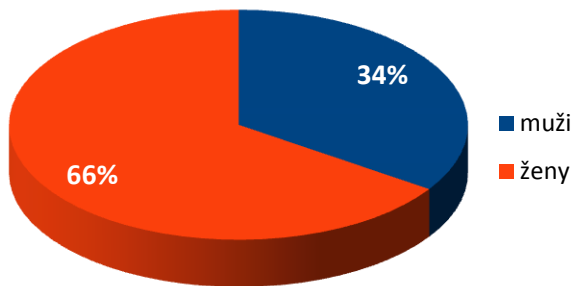
Tabulka 4: Charakteristika metod ECLIA a ELISA

Charakteristika metod				
Stanovení	IgG	IgM	IgA	IgE
<i>Princip měření</i>	ECLIA	ECLIA	ELISA	ELISA
	Sendvičová m.	Sendvičová m.	Capture ELISA	Capture ELISA
<i>Výrobce</i>	Roche diagnostics	Roche diagnostics	TestLine	TestLine
<i>Analyzátor</i>	Cobas e601	Cobas e601	Ne	Ne
<i>Doba stanovení</i>	18 min.	18 min.	2,5 h.	2,5 h.
<i>Materiál</i>	Sérum/plazma	Sérum/plazma	Sérum/plazma	Sérum/plazma
<i>Jednotky</i>	kIU/l	Index S/CO	Index S/CO	Index S/CO
<i>Mez. detekce</i>	0.13 kIU/l			
<i>Dg. citlivost</i>	99,5 %	95,3 %	96,9 %	96,9 %
<i>Dg. specifita</i>	98,8 %	98,9 %	99,0 %	99,0 %

Zdroj: vlastní zpracování autora

7.5 Výsledky

V letech 2014 a 2015 bylo vyšetřeno na OLM Nemocnice v Rychnově nad Kněžnou 276 pacientů na přítomnost protilátek proti *Toxoplasma gondii*. Z toho bylo 181 žen a 95 mužů. Procentuální zastoupení je uvedeno v obrázku č. 10.



Obrázek 10: Procentuální zastoupení mužů a žen

Zdroj: vlastní zpracování autora

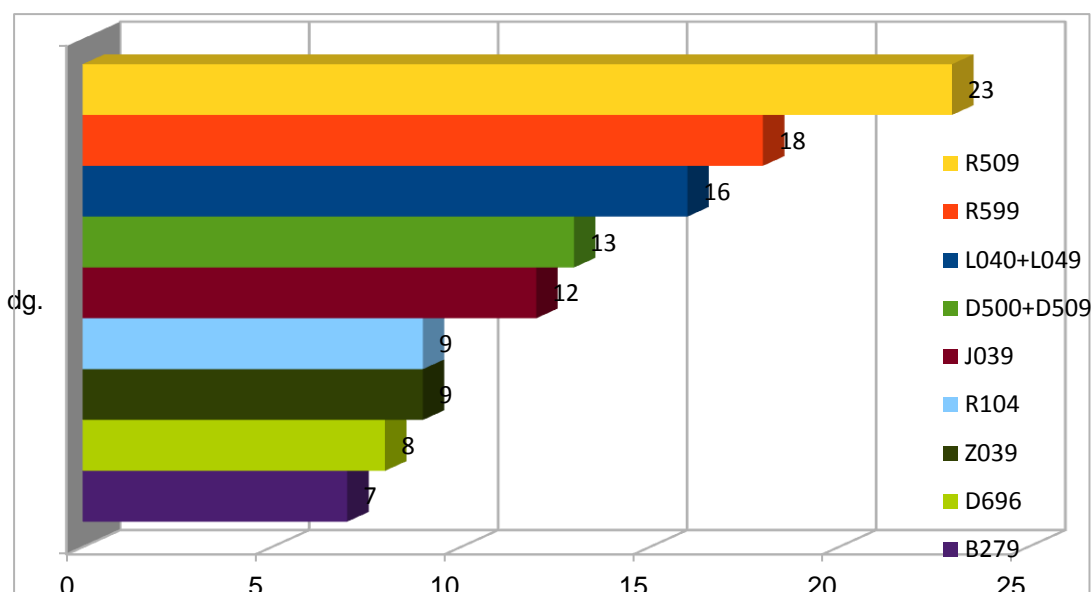
Z tohoto počtu (276 pacientů) jsem vybrala nejčastější diagnózy. Přehled těchto diagnóz je graficky zpracován na obrázku č. 11 a v tabulce č. 5.

Tabulka 5: Nejčastěji se vyskytující diagnózy při vyšetření T. G. na OLM RK

Číslo dg.	Název	počet
R509	Horečka	23
R599	Zvětšené mízní uzliny	18
L040+L049	Ak.lymfaden.obl.,hlavy a krku / Akutní lymfadenitis	16
D500+D509	Sekundár.chr.posthemor. Anémie / Anémie z nedostatku železa	13
J039	Akutní tonsilitida	12
R104	Jiná a neurčená břišní bolest	9
Z039	Podezření na onem. nebo patol. stav	9
D696	Trombocytopenie	8

B279	Infekční mononukleóza	7
O986	Protozoální nemoci komplikující těhotenství	1
O998	Jiné určené nemoci a stavy komplikující těhotenství, porod a šestinedělí	1
O021	Zamlklý potrat	1

Zdroj: vlastní zpracování autora

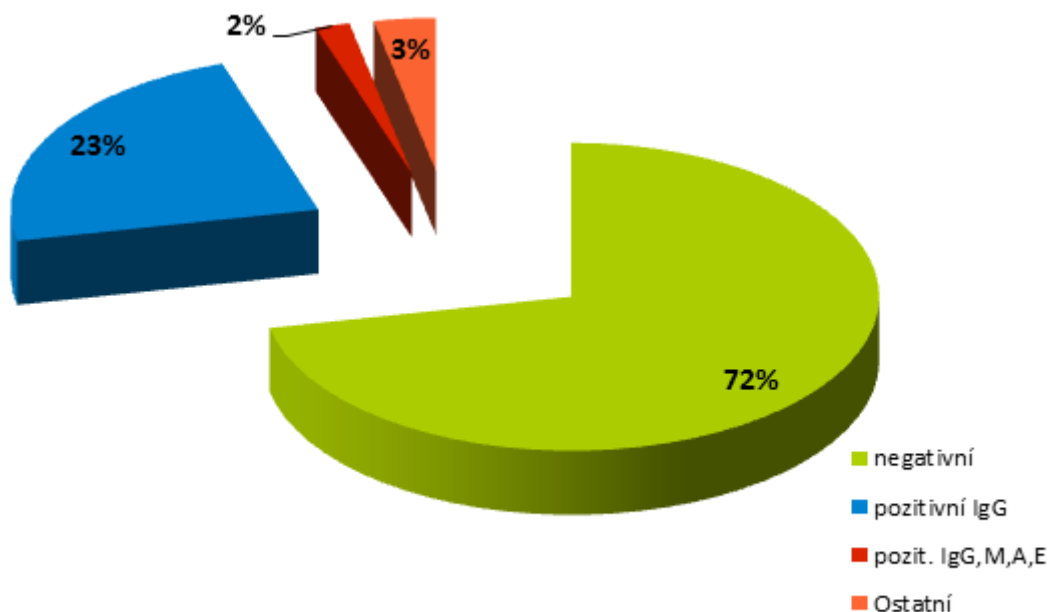


Obrázek 11: Počet jednotlivých diagnóz na OLM Rychnov nad Kněžnou

Zdroj: vlastní zpracování autora

Při vyhodnocení hladiny protilátek třídy IgG jako rozhodovací kritérium používáme hladinu 3 kIU/l, doporučenou výrobcem soupravy. Z 276 vyšetřených pacientů bylo:

- 198 pacientů negativních na přítomnost protilátek proti IgG, IgM, IgA i IgE;
- 64 pacientů mělo zvýšenou hladinu pouze u protilátek IgG;
- U pěti pacientů byly pozitivní protilátky IgG, IgM, IgA i IgE;
- 9 pacientů s pozitivitou IgG mělo u některé ze zbývajících protilátek hraniční hodnoty.



Obrázek 12: Procentuální vyjádření výsledků za rok 2015 OLM RK

Zdroj: vlastní zpracování autora

V roce 2015 bylo vyšetřeno na Hematologicko-transfúzním oddělení Orlickoústecké nemocnice 205 pacientů. Na tomto pracovišti provádí diagnostiku následujícími metodami: Toxo IgM a IgG, tyto metody jsou provedeny vždy společně, dále je používána metoda Toxo Avi. Z toho byly u 58 pacientů detekovány protilátky IgG reaktivní, protilátky IgM byly sedmkrát reaktivní, šestkrát byla vyšetřována avidita – 3x nízká a 3x vysoká. Vyšetření se provádí na analyzátoru Architect 2000i, firma Abbott chemiluminiscenční metodou. Z celkového počtu 205 pacientů bylo vyšetřeno 102 žen. Nejčastější diagnózy zachycuje tabulka č. 6.

Tabulka 6: Nejčastěji se vyskytující diagnózy při 7. G. v Ústí nad Orlicí

Číslo dg.	Název
L040	Akutní lymfadenitida obličeje
R599	Zvětšené mízní uzliny
L259	Neurčená kontaktní dermatitida

B589	Toxoplazmóza
R22	Lokalizované zdužené útvary
D509	Anemie z nedostatku železa
Z039	Podezření na onem. nebo patol. stav
K769	Nemoc jater
O986	Protozoální nemoci komplikující těhotenství
Z349	Dohled nad normálním těhotenstvím

Zdroj: Vlastní zpracování autora

Nejčastěji se opakovala diagnóza L040 (25 x) a R599 (12 x), O986 (2x) a Z349 (2x). Další údaje o počtu jednotlivých diagnóz nejsou známy.

Výsledky za rok 2015 v Ústí nad Orlicí jsou uvedeny v následující tabulce č. 7.

Tabulka 7: Výsledky za rok 2015 HTO Ústí nad Orlicí

Protilátky	Hodnoty	Procentuální vyjádření
IgG	negativní	72%
	pozitivní	28%
IgM	negativní	98%
	pozitivní	2%

Zdroj: Vlastní zpracování autora

V roce 2014 bylo na sérologicko-parazitologickém oddělení mikrobiologického ústavu Fakultní nemocnice Plzeň vyšetřeno 730 pacientů. Následující tabulka č. 8 uvádí počty pacientů označených jako negativní, hraniční a pozitivní.

Tabulka 8: Výsledky IgM, IgG a KFR za rok 2014

Protilátky	Hodnoty	Počet pacientů
IgG	negativní (do 5,4)	168
	hraniční (5,4 - 6,6)	4
	pozitivní (>6,6)	161
IgM	negativní (do 0,9)	316
	hraniční (0,9 - 1,1)	6
	pozitivní (nad 1,1)	28
KFR	negativní	394
	pozitivní	336

Zdroj: Vlastní zpracování autora

Za rok 2015 bylo na sérologicko-parazitologickém oddělení mikrobiologického ústavu Fakultní nemocnice Plzeň vyšetřeno 685 pacientů. Následující tabulka č. 9 uvádí počty pacientů označených jako negativní, hraniční a pozitivní.

Tabulka 9: Výsledky IgM, IgG a KFR za rok 2015

Protilátky	Hodnoty	Počet pacientů
IgG	negativní (do 5,4)	170
	hraniční (5,4 - 6,6)	2
	pozitivní (>6,6)	164
IgM	negativní (do 0,9)	261
	hraniční (0,9 - 1,1)	3
	pozitivní (nad 1,1)	65
KFR	negativní	311
	pozitivní	374

Zdroj: Vlastní zpracování autora

Vyšetření byla prováděna metodou KFR a ELISA.

V tabulce č. 10 jsou zpracovány údaje o nejčastějších diagnózách dohromady za roky 2014 a 2015. Z tohoto výčtu vyplývá, že nejvíce

diagnostikovanými skupinami byly pacienti s diagnózou lymfadenitidy a těhotné ženy. Další velkou skupinu tvoří pacienti s podezřením na HIV onemocnění.

Tabulka 10: Nejčastější diagnózy FN Plzeň za roky 2014 a 2015

Číslo dg.	Název	počet
B238	Onemocnění HIV s jinými určenými stavy	119
B589	Toxoplazmóza	51
C920	Akutní myeloidní leukémie	47
J039	Akutní tonsilitida	10
H300	Ložiskový chorioretinální zánět	16
L040	Akutní lymfadenitis obličeje, hlavy a krku	223
L049	Akutní lymfadenitis	30
O269	Stavy spojené s těhotenstvím	89
R509	Horečka, NS	47
R599	Zvětšené mízní uzliny	11
Z017	Laboratorní vyšetření	28
Z340	Dohled nad normálním prvním těhotenstvím	49
Z348	Dohled nad jiným normálním těhotenstvím	55
Z349	Dohled nad normálním těhotenstvím	11
Z359	Dohled nad vysoce rizikovým (ohroženým) těhotenstvím	81

Z523	Dárce kostní dřeně	22
------	--------------------	----

Zdroj: vlastní zpracování autora

Během let 2006 až 2008 bylo vyšetřeno na oddělení mikrobiologie Univerzity v Parmě 34603 pacientů. Pacienti byli vyšetřeni metodou Real-Time PCR, na automatických analyzátořech a histologicky. Následující tabulka č. 11 znázorňuje počty pacientů označených jako negativní, hraniční a pozitivní na základě přítomnosti daných protilátek.

Tabulka 11: Výsledky protilátek IgG a IgM z univerzitní nemocnice v Parmě

Protilátka	Hodnoty	Počet pacientů	Počet pacientů v %
IgG	negativní (do 5,4)	26951	77,9 %
	hraniční (5,4 - 6,6)	324	0,9 %
	pozitivní (>6,6)	7328	21,2 %
IgM	negativní (do 0,9)	33135	95,8 %
	hraniční (0,9 - 1,1)	181	0,5 %
	pozitivní (nad 1,1)	1287	3,7 %

Zdroj: [16]

Z těchto 34 603 pacientů bylo 88 z oftalmologické kliniky. Čtyřicet čtyři pacientů bylo IgG negativních, 43 pozitivních a 1 hraniční. Osmdesát tři pacientů bylo IgM negativních, 4 pozitivní a 1 hraniční. [16]

8 Diskuse

Toxoplazmóza je infekční onemocnění, které u zdravých lidí nevyvolává závažnější zdravotní potíže. Nejvíce ohrožené jsou dvě skupiny nemocných. Jsou to gravidní ženy, kde hrozí přenos infekce z matky na plod a reaktivace onemocnění u imunokompromitovaných pacientů. Infekce toxoplazmózou probíhá u 90 % infikovaných pacientů bez specifických příznaků onemocnění, pouze u 10 % infikovaných probíhají nespecifické příznaky podobné chřipkovému onemocnění. Nejčastějším příznakem je zduření mízních uzlin. Laboratorní sérologické metody stanovení protilátek při onemocnění toxoplazmózou ukazují na schopnost člověka vytvářet protilátky. Tím nejenom pomáhají při diagnostice onemocnění u člověka, ale navíc vypovídají o aktivitě samotného onemocnění. Sérologické metody jsou vhodné především pro stanovení diagnózy a aktivity onemocnění u gravidních žen krátce před otěhotněním a v průběhu těhotenství. Jsou velkým přínosem při vyhodnocování možnosti onemocnění plodu a hlavně pomáhají lékaři při stanovení léčby během těhotenství, ale i po narození dítěte.

Laboratorní pracoviště na OLM v Rychnově nad Kněžnou, HTO Ústí nad Orlicí i sérologie a parazitologie FN v Plzni používají k laboratorní diagnostice toxoplazmózy převážně sérologická vyšetření. Jedná se o metody na určení celkových protilátek (KFR), dále na detekci protilátek třídy IgG a IgM na automatických analyzátorech chemiluminiscenční metodou a protilátek třídy IgA a IgE metodou ELISA. V HTO Ústí nad Orlicí navíc stanovují aviditu IgG.

Jednotlivá pracoviště se mírně liší ve složení pacientů podle diagnóz, se kterými jsou na vyšetření od svých lékařů odesíláni. Zatímco v regionálních pracovištích (OLM Rychnov nad Kněžnou a HTO Ústí nad Orlicí) se ve výčtu diagnóz objevuje nejčastěji akutní lymfadenitida, horečka a zvětšení mízních uzlin, na specializovaném pracovišti sérologie a parazitologie FN v Plzni je

největší výskyt diagnóz s podezřením na HIV nebo dohled nad těhotenstvím s podezřením na toxoplazmózu.

Bohužel, v našem souboru (OLM RK) vyšetřovaných pacientů byly diagnózy O986, O998 a O021 (protozoální nemoci komplikující těhotenství a další) detekovány pouze třikrát. Koresponduje to i s výsledky detekovanými na pracovišti HTO v Ústí nad Orlicí, kde byla tato diagnóza za rok 2015 zjištěna pouze čtyřikrát.

Svědčí to o nedostatečném screeningu prováděném u těhotných pacientek. V současné době je screening těhotných žen v ČR pouze doporučován. V jiných státech Evropy, např. Francie, Rakousko i Slovensko, je screening povinný. Otázkou je, zda-li je povinný screening dostatečně prosazován odbornými lékařskými společnostmi nebo je-li bržděn zdravotními pojišťovny. Správná a včasná diagnóza onemocnění toxoplazmózou u člověka závisí na spolupráci lékařů (hlavně v oboru gynekologie a infekčního lékařství) a diagnostických laboratoří.

9 Závěr

Toxoplazmóza je jedna z nejčastějších zoonóz v České republice. Napadá všechny teplokrevné živočichy a jejím konečným hostitelem je kočka. Většina onemocnění má benigní průběh, avšak primoinfekce v graviditě může ohrozit vývoj plodu nebo způsobit poškození, která jsou často manifestovaná až po narození dítěte. Další ohroženou skupinou jsou imunokompromitovaní pacienti.

Laboratorní sérologické metody jsou schopné diagnostikovat onemocnění toxoplazmózou u člověka včetně určení aktivity onemocnění. Celkové protilátky se detekují metodou KFR, v praxi převažuje metoda ELISA, kterou se stanovují protilátky tříd IgG, IgM, IgA a IgE. Ke stanovení protilátek jsou často v laboratořích využívány automatické analyzátory – např. metoda ECLIA.

Problémem zůstává zdravotnická osvěta ohledně prevence onemocnění. Dle souboru vyšetřovaných pacientů z OLM Rychnov nad Kněžnou a HTO Ústí nad Orlicí z roku 2014 – 2015 vyplývá, že není prováděna systematická prevence pomocí sérologických vyšetření a to hlavně z důvodu pouhého doporučení vyšetření v době těhotenství. Řešení vidím ve větším prosazování povinných sérologických vyšetření u rizikových gravidních žen a pacientů s imunodeficitem.

10 Seznam použité literatury

- [1] JÍRA, Jindřich. *Lékařská protozoologie: protozoální nemoci*. 1. vyd. Praha: Galén, c2009. ISBN 978-80-7262-381-5.
- [2] KOUBA, K., J. JÍRA a J. HUEBNER. *Toxoplazmoza*. 1974. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, 1974.
- [3] FÖRSTL, Miroslav. *Praktický atlas lékařské parazitologie*. 1. vyd. Hradec Králové: Nucleus HK, 2003. ISBN 80-86225-38-0.
- [4] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5.
- [5] KOUBA, K. a V. FUCHS. *Lékařské repetitorium: Svazek II*. 1. Praha: Avicenum zdravotnické nakladatelství, 1982.
- [6] GELENEKY, Markéta. Současný pohled na problematiku toxoplasmózy. *Lékařské listy*. 2012, **2012**(10), 9-10.
- [7] BEDNÁŘ, Marek, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA. *Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie*. Praha: Triton, 1994. ISBN 80-901521-4-7.
- [8] PRÁŠIL, Petr. Současné možnosti diagnostiky a terapie toxoplasmózy u HIV negativních pacientů. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2009, **15**(3), 83 - 90.
- [9] MACHALA, Ladislav, Petr KODYM a Rudolf ČERNÝ. Toxoplazmóza. *Interní medicína pro praxi*. 2005, **7**(2), 120 - 122. ISSN 1212-7299.
- [10] ČERMÁKOVÁ, Zuzana, Lenka PLÍŠKOVÁ, Petr PRÁŠIL a Olga RYŠKOVÁ. Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) v diagnostice toxoplasmózy. *Acta medica (Hradec Králové). Supplementum*. 2004, **4**(2), 71-73. ISSN 1211-247X.
- [11] TOMKOVÁ, Jana, Dalibor NOVOTNÝ, J. BEDNÁŘÍKOVÁ a Petr SCHNEIDERKA. Toxoplazmóza. *Medicina pro praxi*. 2008, **16/37**(4), 232-236. ISSN 1210-7921.
- [12] Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. *American Society for Microbiology* [online]. 2013 [cit. 2016-04-28]. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/content/26/1/58/F4.expansion.html>
- [13] LINDSAY, D. S. a J. P. DUBEY. *Toxoplasma gondii: the changing paradigm of congenital toxoplasmosis*. DOI: 10.1017/S0031182011001478. ISBN 10.1017/S0031182011001478. Dostupné také z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182011001478
- [14] FUSKOVÁ, Eva, Drahomíra BARTOŠOVÁ a Marta TRNKOVÁ. Toxoplazmóza v dětském věku. *Pediatric pro praxi*. 2004, **47**(6), 312-313. ISSN 1213-0494.
- [15] KODYM, Petr a Markéta GELENEKY. Prevence, diagnostika a léčba toxoplasmózy v graviditě. *Aktuální gynekologie a porodnictví*. 2012, **4**, 31-38. ISSN 1803-9588.

- [16] CALDERARO, A., S PERUZZI, G. PICCOLO, C. GORRINI, S. MONTECCHINI, S. ROSSI, C. CHEZZI a G. DETTORI. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *International Journal of Medical Sciences* [online]. 2009, **6**(3), 135 - 136 [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2659488/>
- [17] THIÉBAUT, R., S. LEPROUST, G. CHENE a R. GILBERT. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis. *The Lancet*. 2007, **369**(9556), 115 - 122.
- [18] ČERNÝ, Z. Epidemický výskyt toxoplazmózy na Jižní Moravě. *Veterinářství*. 1994, **75**(12), 586 - 587.
- [19] PEVNÁ, Michaela, Petr VONDRÁČEK a Ivo PALÁSEK. Toxoplazmóza centrálního nervového systému po alogenní transplantaci krvetvorných buněk. *Časopis lékařů českých*. 2010, **149**(4), 184-188. ISSN 0008-7335.
- [20] Toxoplasma Centennial Congress (Toxo 100): "From Discovery to Public Health Management". *Zprávy české parazitologické společnosti*. 2009, **17**(2), 4 - 5. ISSN 1211-7897.
- [21] HOLUB, David, Lucie MOTLOVÁ a Rodriguez MABEL. *Toxoplasma gondii* u schizofrenie. *Psychiatrie*. 2006, **10**(2), 120-122. ISSN 1211-7579.
- [22] OBR, Aleš, Tomáš PAPAJÍK a Renata URBANOVÁ. Toxoplazma a imunodeficience, kazuistika. *Transfúze a hematologie dnes*. 2014, **20**(1), 13-18. ISSN 1213-5763.
- [23] PEŠÁK, Petr. Toxoplazmová myozitida. *Pediatric pro praxi*. 2005, **6**(5), 253 - 254.
- [24] ROQUE-RESENDIZ, J., R. ROSALES a P. HERION. MVA ROP2 vaccinia virus recombinant as a vaccine candidate for toxoplasmosis. *Parasitology*. 2004, (128), 397-405.
- [25] FERGUSON, DJP. *Toxoplasma gondii* 1908-2006 homage to Nicolle, Manceaux and Splendone. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009, **104**(2), 133-148.
- [26] FLEGR, Jaroslav. *Pozor, Toxo!: tajná učebnice praktické metodologie vědy*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2011. Galileo. ISBN 978-80-200-2022-2.
- [27] MACHALA, Ladislav, Petr KODYM a Marek MALÝ. Toxoplazmóza u imunokompromitovaných pacientů. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. 2015, **64**(2), 59-65.
- [28] Toxoplasma. *Full Toxoplasma* [online]. 2010 [cit. 2016-04-28]. Dostupné z: <http://fullmal.hgc.jp/tg/docs/toxoplasma.html>
- [29] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, c2010. ISBN 978-80-86850-04-7.
- [30] TOMAN, Miroslav. *Veterinární imunologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2000. ISBN 80-7169-727-3.

- [31] Protilátky vůči Toxoplasmě gondii. *FONS: Příručka laboratorních vyšetření* [online]. [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: <http://www.katalogfons.cz/Produkty/15374EB2-7914-4A45-913F-2768BBDE1B8D>
- [32] Firemní materiály EIA Toxoplasma IgA, IgE
- [33] LAPPLAINEN, M., P. KOSKELA, M. KOSKINIEMI, et al. Toxoplasmosis acquired during pregnancy: Improved serodiagnosis based on avidity of IgG. *Journal of Infectious Diseases*. 1993, **167**(3), 691 - 697.
- [34] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [35] Infekční nemoci: SZÚ. *Státní zdravotní ústav* [online]. Praha [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/infekcni-nemoci>
- [36] MONCADA, PA, JG. MONTOYA a . Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence diagnosis and treatment. *Expert Rev anti Infect Ther*. 2012, **10**(7), 815 - 828.
- [37] SENSINI, A. Toxoplasma gondii infection in pregnancy: oportunities and pitfalls of serological diagnosis. *Clin Microbiol Infect*. 2006, **12**(6), 504 - 512.
- [38] MÁLKOVÁ, Kateřina. Prenatální diagnostika TORCH infekcí v těhotenství. *Labor Aktuell* [online]. 2012, **12**(4), 28 - 29 [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: http://roche-diagnosics.cz/LaborAktuell/LA2012/Documents/LA0412/Torch_Malkova.pdf
- [39] Firemní materiál

11 Seznam obrázků

Obrázek 1: <i>Toxoplasma gondii</i>	13
Obrázek 2: Cesty nákazy <i>T. G.</i>	15
Obrázek 3: Hustota nervové hmoty u schizofreniků a psychicky zdravých osob	19
Obrázek 4: KFR, odečet výsledků v mikrotitrační destičce.....	23
Obrázek 5: Inokulace plodové vody laboratorní myši	26
Obrázek 6: Výskyt toxoplazmózy v ČR v letech 2006 - 2015	29
Obrázek 7: Protilátková odpověď v čase	30
Obrázek 8: Vyšetřovací schéma toxoplazmózy	32
Obrázek 9: Pracovní schéma EIA	39
Obrázek 10: Procentuální zastoupení mužů a žen	41
Obrázek 11: Počet jednotlivých diagnóz na OLM Rychnov nad Kněžnou	42
Obrázek 12: Procentuální vyjádření výsledků za rok 2015 OLM RK.....	43

12 Seznam tabulek

Tabulka 1: Hlášený výskyt toxoplazmózy v ČR.....	29
Tabulka 2: Interpretace protilátek	31
Tabulka 3: Interpretace výsledků	39
Tabulka 4: Charakteristika metod ECLIA a ELISA	40
Tabulka 5: Nejčastěji se vyskytující diagnózy při vyšetření <i>T. G.</i> na OLM RK .	41
Tabulka 6: Nejčastěji se vyskytující diagnózy při <i>T. G.</i> v Ústí nad Orlicí	43
Tabulka 7: Výsledky za rok 2015 HTO Ústí nad Orlicí	44
Tabulka 8: Výsledky IgM, IgG a KFR za rok 2014.....	45
Tabulka 9: Výsledky IgM, IgG a KFR za rok 2015.....	45
Tabulka 10: Nejčastější diagnózy FN Plzeň za roky 2014 a 2015	46
Tabulka 11: Výsledky protilátek IgG a IgM z univerzitní nemocnice v Parmě ..	47

13 Seznam zkratek

AIDS	syndrom získaného selhání imunity
BAL	bronchoalveolární laváž
CNS	centrální nervová soustava
ČR	Česká republika
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECLIA	elektrochemiluminiscenční imunostanovení
EIA	enzyme immunosorbent assay
ELISA	enzyme – linked immunosorbent assay
Epi-Dat	program pro sběr surveillance infekčních chorob v oboru epidemiologie v ČR
FN	fakultní nemocnice
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HTO	Hematologicko transfuzní oddělení
KFR	komplement fixační reakce
LCEM	laboratoře centra epidemiologie a mikrobiologie
MRI	magnetická rezonance
NFR	imunofluorescenční reakce
OLM	Oddělení léčebné medicíny
PCR	polymerase chain reaction
RK	Rychnov nad Kněžnou
SZÚ	Státní zdravotní ústav
T. G.	<i>Toxoplasma gondii</i>
WB	western blot