



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Toxoplazmóza u těhotných žen a metody její laboratorní diagnostiky

Toxoplasmosis in pregnant women and methods of its laboratory diagnosis

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Autor bakalářské práce: Markéta Kepková

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Karel Fajfrlík Ph.D.

Kladno 2022



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Kepková** Jméno: **Markéta** Osobní číslo: **483308**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**
Studijní program: **Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Toxoplazmóza u těhotných žen a metody její laboratorní diagnostiky

Název bakalářské práce anglicky:

Toxoplasmosis in Pregnant Women and Methods of its Laboratory Diagnosis

Pokyny pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce bude rozbor nebezpečnosti nákazy toxoplazmózou u těhotných žen, kdy hrozí nakažení plodu a vznik vývojových vad. Dále bude v práci probráno, jakými laboratorními metodami lze onemocnění způsobené prvokem, *Toxoplasma gondii*, stanovit. Teoretická část bakalářské práce bude věnována životnímu cyklu toxoplazmy. Dále bude tato část obsahovat rizika, která hrozí u nakažených těhotných žen pro jejich plod a prevenci proti naze toxoplazmózou. Taktéž zde budou popsány projevy onemocnění u zdravých či imunokompromitovaných jedinců. Poté bude vysvětlen mechanismus působení tohoto prvoka na postižené části organismu a možnosti léčby. V praktické části bakalářské práce budou statisticky zpracovány vyšetřené vzorky v letech 2011–2020 v laboratoři FN Plzeň.

Seznam doporučené literatury:

- [1] KOLÁŘOVÁ, Libuše, *Obecná a klinická mikrobiologie*, ed. 1, Galén, 2020, ISBN 978-80-7492-477-4
- [2] HURYCH, Jakub a Roman ŠTÍCHA et al, *Lékařská mikrobiologie – repetitorium*, ed. 2, Triton, 2020, ISBN 978-80-7553-900-7
- [3] MARŠOLKOVÁ, Kristýna, Juraj TIMKOVIČ, Veronika LESKOVÁ, Jan NĚMČANSKÝ a Hana WIEDERMANNOVÁ, *Vrozená centrální chorioretinitida toxoplasmové etiologie – kazuistika*, online, Česká a slovenská oftalmologie, [Revidováno 2018], ročník 74, číslo 3, Přístupné z: https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-slovenska-oftalmologie/2018-3-13/vrozena-centralni-chorioretinitida-toxoplasmove-etologie-kazuistika-106122_1211-9059

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

RNDr. Karel Fajfrlík, Ph.D.

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **15.02.2022**

Platnost zadání bakalářské práce: **22.09.2023**

doc. Mgr. Zdeněk Hon, Ph.D.
vedoucí katedry

prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA
děkan

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Toxoplazmóza u těhotných žen a metody její laboratorní diagnostiky vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 05.05.2022

.....
Markéta Kepková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Karlu Fajfrlíkovi, Ph.D. za jeho ochotu, vřelý přístup a konstruktivní připomínky. Také bych chtěla poděkovat Ústavu mikrobiologie FN Plzeň za veškerou pomoc a poskytnutí materiálu pro zpracování praktické části této práce.

ABSTRAKT

Tématem bakalářské práce je toxoplazmóza u těhotných žen a metody její laboratorní diagnostiky. Bakalářská práce shrnuje dosavadní získané poznatky o prvoku *Toxoplasma gondii* (dále jen *T. gondii*) z kmene Apicomplexa, který způsobuje onemocnění zvané toxoplazmóza, patřící mezi nejčastější zoonózy v ČR i ve světě. V teoretické části práce je uvedena historie objevu *T. gondii*, životní cyklus zahrnující pohlavní i nepohlavní fázi prvoka a mechanismus působení v těle hostitele. Jsou zde popsány zdroje nákazy, kterými se může člověk infikovat a prevence před nimi. Dále je zde uveden průběh onemocnění a přímá i nepřímá laboratorní diagnostika *T. gondii*. V neposlední řadě jsou probrány možnosti léčby nemoci.

V praktické části je podrobně popsán postup stanovení screeningové metody KFR pro stanovení celkových protilátek proti *T. gondii* a postup doplňujících metod EIA pro určení přesné třídy imunoglobulinů společně s aviditou IgG. Dále je zde statistické zhodnocení počtu vyšetření a výsledků metody KFR provedené ve FN Plzeň v letech 2011 až 2021.

Ze zpracovaných dat bylo zjištěno, že počet stanovení na celkové protilátky proti *T. gondii* metodou KFR se dlouhodobě snižuje, i když počet pozitivních výsledků není výrazně snížen. Počet výsledků s vysokým titrem u těhotných žen se v roce 2021 významně snížil. Je tedy možné, že k onemocnění dochází dříve než ve fertilním věku, a tím nedochází k ohrožení plodu.

Klíčová slova

Toxoplazmóza; *Toxoplasma gondii*; zoonóza; prvok; hostitel; komplement fixační reakce; ELISA; imunoglobuliny

ABSTRACT

The topic of the bachelor thesis is toxoplasmosis in pregnant women and methods of its laboratory diagnostics. The bachelor thesis summarizes the existing knowledge about the protozoan *Toxoplasma gondii* (hereinafter referred to as *T. gondii*) from the Apicomplexa strain, which causes a disease called toxoplasmosis, one of the most common zoonoses in the Czech Republic and the world. The theoretical part of the thesis presents the history of the discovery of *T. gondii*, the life cycle involving the sexual and asexual phases of the protozoan and the mechanism of action in the host's body. It describes the sources of infection through which a person can become infected and prevention from them. In addition, the course of the disease and direct and indirect laboratory diagnosis of *T. gondii* are presented here. Finally, the possibilities of treating the disease are discussed.

The practical part describes in detail the procedure for the determination of the KFR screening method for the determination of total antibodies to *T. gondii* and the procedure of additional EIA methods for determining the exact class of immunoglobulins together with the IgG avidity. There is also a statistical evaluation of the number of examinations and results of the KFR method performed at the FN Plzeň between 2011 and 2021.

From the processed data, it was found that the number of determinations for total antibodies against *T. gondii* by the KFR method decreases over the long term, although the number of positive results is not significantly reduced. The number of results with a high titre in pregnant women decreased significantly in 2021. It is therefore possible that the disease occurs earlier than in the childbearing age, and thus there is no threat to the fetus.

Keywords

Toxoplasmosis; *Toxoplasma gondii*; zoonosis; protozoa; host; complement fixation reaction; ELISA; immunoglobulins

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Cíle práce	11
3	Přehled současného stavu.....	12
3.1	Toxoplasma gondii	12
3.1.1	Objev	12
3.2	Životní cyklus.....	13
3.2.1	Nepohlavní fáze	13
3.2.2	Pohlavní fáze.....	15
3.3	Mechanismus působení v těle.....	16
3.4	Zdroj nákazy	18
3.4.1	Kontaminované maso.....	18
3.4.2	Kontaminovaná voda	19
3.4.3	Kontaminovaná půda	19
3.4.4	Kontaminované ovoce a zelenina.....	19
3.4.5	Nepasterizované kozí mléko	20
3.4.6	Transplacentární přenos	20
3.4.7	Přenos transfuzí.....	20
3.5	Prevence	21
3.5.1	Prevence u gravidních žen	21
3.6	Průběh onemocnění	22
3.6.1	Zdravý jedinec.....	22
3.6.2	Těhotné ženy	23
3.6.3	Imunokompromitování jedinci.....	24
3.7	Diagnostika toxoplazmózy	24
3.7.1	Nepřímé stanovení	24
3.7.2	Přímé stanovení.....	26

3.7.3	Histologické vyšetření.....	26
3.7.4	Zobrazovací metody.....	26
3.8	Léčba	27
4	Metodika	28
4.1	Komplement fixační reakce.....	28
4.1.1	Princip reakce.....	28
4.1.2	Materiál a přístrojové vybavení	29
4.1.3	Příprava pracovních roztoků	29
4.1.4	Příprava kontrol.....	30
4.1.5	Pracovní postup.....	30
4.1.6	Vyhodnocení výsledků	32
4.2	EIA Toxoplasma IgG	33
4.2.1	Princip metody	33
4.2.2	Materiál a přístrojové vybavení	33
4.2.3	Příprava pracovních roztoků	34
4.2.4	Ředění vzorků	34
4.2.5	Pracovní postup – stanovení IgG	34
4.2.6	Vyhodnocení výsledků	35
4.2.7	Princip metody – stanovení avidity.....	35
4.2.8	Pracovní postup – stanovení avidity	36
4.2.9	Vyhodnocení výsledků	37
4.3	EIA Toxoplasma IgM	37
4.3.1	Princip metody	37
4.3.2	Materiál a přístrojové vybavení	37
4.3.3	Příprava pracovních roztoků	38
4.3.4	Ředění vzorků	38
4.3.5	Pracovní postup.....	39

4.3.6	Vyhodnocení výsledků	39
4.4	EIA Toxoplasma IgA	40
4.4.1	Princip metody	40
4.4.2	Materiál a přístrojové vybavení	40
4.4.3	Příprava pracovních roztoků	41
4.4.4	Ředění vzorků	41
4.4.5	Pracovní postup	41
4.4.6	Vyhodnocení výsledků	42
5	Výsledky	43
5.1	Zhodnocení počtu vyšetření mezi lety 2011 až 2021.....	43
5.2	Zhodnocení počtu vyšetření gravidních žen.....	46
6	Diskuze.....	54
7	Závěr	59
8	Seznam použitých zkratk	60
9	Seznam použité literatury.....	62
10	Seznam použitých obrázků	67
11	Seznam použitých tabulek	69
12	Seznam Příloh	70

1 ÚVOD

Toxoplazmóza je onemocnění, které většina z nás pravděpodobně má, ale vůbec o tom neví. Patří totiž mezi nejčastější světové zoonózy. Onemocnění toxoplazmózou ovšem většina nakažených lidí ani nepostřehne, jelikož se vyskytuje v latentní formě a jinak zdravým lidem nezpůsobuje žádné komplikace. Problém může nastat, pokud se k nákaze toxoplazmózou přidá jiné onemocnění způsobující poškození a nedostatečnost našeho imunitního systému. Druhou komplikací může být, pokud k nákaze dojde v průběhu těhotenství, jelikož onemocnění může zasáhnout plod a tím zapříčinit jeho vývojové vady.

Druhým z těchto problémů se zabývá tato bakalářská práce. Stanovení toxoplazmózy totiž nepatří mezi povinná screeningová vyšetření během těhotenství, a proto se množství vyšetření liší v závislosti na indikaci tohoto vyšetření lékařem.

Téma bakalářské práce mě zajímalo, jelikož se blízkému členovi z mé rodiny narodilo postižené dítě z neznámého důvodu a později u jeho matky byla prokázána nákaza toxoplazmózou v latentní formě.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části práce je shrnutí a rozbor poznatků o nebezpečnosti nákazy toxoplazmózou se zaměřením na rizika spojená s průběhem onemocnění v těhotenství, včetně zvládnutí a popisu laboratorní diagnostiky tohoto onemocnění.

Cílem praktické části je statistické zpracování výsledků z let 2011 až 2021 v laboratoři FN Plzeň získaných metodou KFR.

3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

3.1 *Toxoplasma gondii*

Původcem celosvětového onemocnění toxoplazmózy je obligátně intracelulární vícehostitelský prvok *Toxoplasma gondii*, který může infikovat jak člověka, tak téměř všechna teplokrevná zvířata [1; 2].

Jde o dvouhostitelskou kokcidiu, která má zřetelnou tendenci vytvářet extraintestinální stádia. Konečným hostitelem jsou kočkovité šelmy a mezihostitelem jsou teplokrevní obratlovci. Mezi její vývojová stádia, která infikují člověka, patří: tachyzoit, bradyzoit a sporozoit. *T. gondii* se vyskytuje ve více sérotypech, které se liší svojí virulencí. V Evropě a Severní Americe se nachází sérologický typ II., který je méně virulentní. Toxoplazmóza je považována za nejčastější lidskou zoonózu a parazitární infekci. Celosvětově se odhaduje, že jedna třetina populace má pozitivní protilátky proti *T. gondii* [3; 4; 5; 6].

Toxoplazmóza u člověka může být buď vrozená, nebo získaná. Při získané nákaze většinou probíhá inaparentně, pokud se nejedná o imunologicky oslabenou osobu. V tom případě probíhá jako generalizovaná infekce. U vrozené nákazy dochází k malformacím, nebo až k úmrtí plodu [4]

3.1.1 Objev

Tento parazit byl objeven roku 1908 u severoafrického hlodavce gundiho saharského pány Charlesem Nicolle a Louisem Herbertem Manceauxem v Tunisku [1; 7].

Až v roce 1923 bylo zjištěno nepříznivé působení tohoto prvoka na člověka. Za objevem stál pražský oftalmolog Josef Janků, který vyšetřoval jedenáctiměsíčního chlapce trpícím hydrocefalem, mikroftalmem a degenerativními ložisky v okolí žluté skvrny. U pacienta byl přesvědčen o parazitárním původu těchto problémů [7].

Parazit byl brzy identifikován jako původce kongenitálních infekcí. Jeho role významného patogenu u pacientů nakažených HIV a pacientů s transplantovanými orgány byla rozpoznána později. Co přesně parazit člověku způsobuje, a jak se množí, bylo ovšem objeveno až v 60. letech 20. století, a to vědci napříč Evropou a Amerikou [1; 2; 7].

V této době byl prvok zařazen do podtřídy kokcií kmene Apicomplexa. Také byla popsána infekčnost tří parazitických stádií: tachyzoit, cysta a oocysty. Důležitost infekce toxoplazmózou byla uznána až v polovině 70. let minulého století a její reaktivace byla široce zkoumána imunology. V tomto století došlo díky průlomům v genotypizaci a zvýšení počtu terénních studií ke změně pochopení fylogenetické evoluce *T. gondii*. [2]

3.2 Životní cyklus

3.2.1 Nepohlavní fáze

Nepohlavní fáze probíhá, jak v těle mezihostitele, tak v těle definitivního hostitele a nazýváme ji schizogonie. Může tedy nastat jak u lidí, tak i u koček [1; 7].

Jde o vegetativní toxoplazmovou formu neboli tachyzoit, která se rychle replikuje uvnitř jakékoliv buňky a rychle se šíří po celém těle. V mikroskopu lze tuto formu rozeznat dle typického rohlíčkovitého tvaru, který dal také název samotnému prvoku, jelikož v řečtině se oblouk či luk nazývá toxon. Jádro leží ve středu buňky. Jeden konec „luku“ je zaoblený a druhý zahrocený [1; 2; 7]

Nepohlavní dělení probíhá procesem, kdy se jádro buňky rozdělí tak, že vzniknou dvě buňky dceřiné a mateřská buňka se na konci dělení rozpadne. Tento způsob se označuje jako endodyogonie. Jde o takzvaný endodyogonický typ množení. Může nastat situace, kdy z jedné mateřské buňky vznikne více buněk než dvě dceřiné buňky, takový stav se nazývá endodyopolygonický typ [1].

Uvnitř skupiny mitochondrií hostitelské buňky se nachází pseudocysta, což je skupinová forma trofozoitů. V této akutní infekční fázi se parazit dělí. Dělení v takové formě trvá pouze několik hodin a tkáň v okolí dělicího procesu se zánětlivě změní. Počet vzniklých tachyzoitů v pseudocystě činí okolo 32 jedinců, kteří se posléze dostanou do okolí hostitelské buňky, u které je ještě patrné jádro s nepravidelným tvarem [1].

Jedním z cílů toxoplazmy je dostat se do makrofágů, a to procesem aktivní penetrace a fagocytózy. Na membránu buňky se tachyzoit naváže pomocí svého zahroceného konce, čímž ji rozruší a dostává se do buňky amébovým způsobem. Pomocí vápníku získaného z cytoplazmy *T. gondii* a uloženého v mitochondriích, acidokalcisomech, i ER hostitelské buňky se reguluje invaze a únik z buňky [1].

Jestliže dojde k úhynu hostitele, tato forma *T. gondii* vydrží na živu maximálně 2 až 3 dny a poté dochází k jejímu vyschnutí. Klidová forma asexuálního dělení, která dokáže přežít v horších podmínkách, se označuje jako tkáňová cysta nebo také zoitocysta. Nemá tvar luku, ale je naopak kulovitěho tvaru dosahujícího velikosti až 300 μm . Po nákaze toxoplazmózou se tkáňové cysty tvoří již za 7 až 10 dní a u většiny hostitelů přetrvávají v těle po celý život, a to především ve svalech a mozku. [1; 2].

Parazit je chráněn proti stresovým faktorům, mechanickému poškození i působení kyselin v těle hostitele. Na svém povrchu má totiž odolnou elastickou vícevrstvou membránu. Jádro hostitelské buňky není u zoitocysty viditelné a neváže se ani na její membránu, či ER. Obsahuje bradyzoity, kterých může být až několik tisíc [1].

Po požití nedostatečně tepelně upraveného masa se dostávají tkáňové cysty do těla člověka a při průchodu trávicím traktem praskají a současně se uvolňují bradyzoity. Ty infikují střevní epitel hostitele a opět se začínají diferencovat do stádia tachyzoitů. Jestliže dojde k této přeměně během těhotenství, parazit umí projít přes placentu a infikovat plod. Tyto tkáňové formy nejsou schopny přežít zahřátí na +67 °C a zmrazení na -14 °C po dobu působení 3 hodin. Díky jejich odolnosti vůči kyselému pepsinu obsaženého v žaludku je umožněn jejich přenos požitím. Tkáňové cysty si dokážou udržet svou vitalitu po dlouhou dobu, a to i mimo hostitelské tělo [1; 2].

3.2.2 Pohlavní fáze

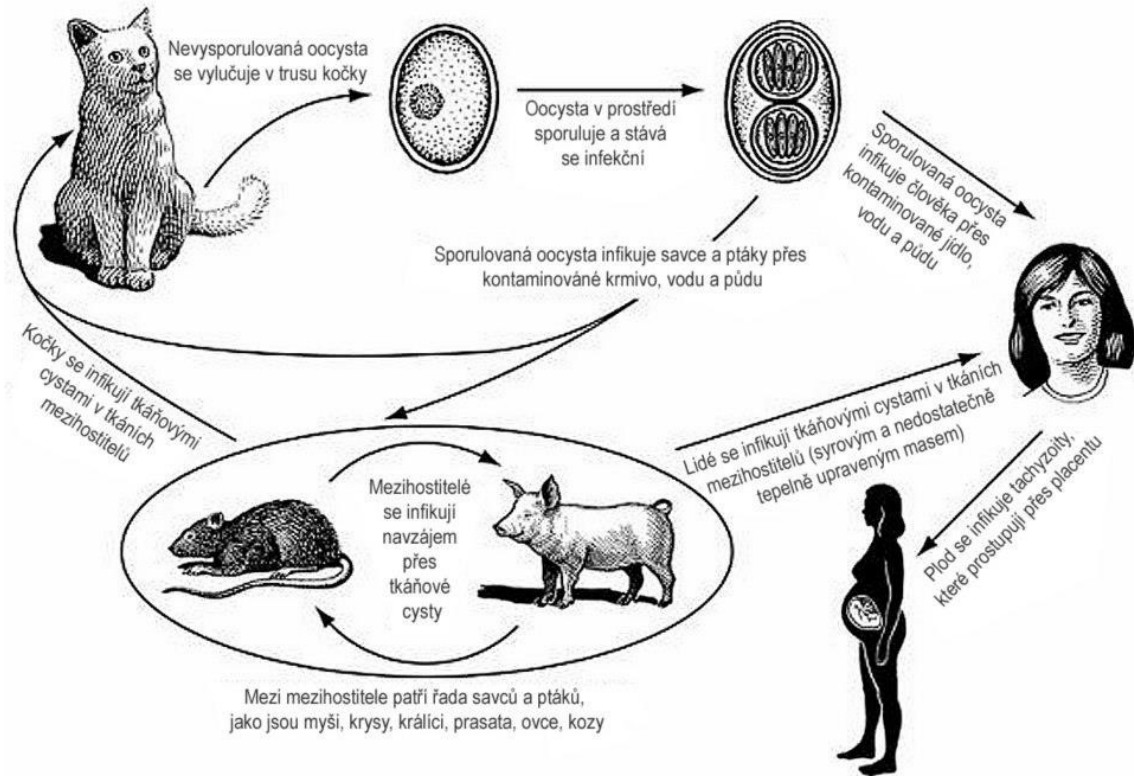
Pohlavní fázi můžeme také označit jako gametogonie. Tento proces probíhá pouze u konečného hostitele, kterým jsou kočkovité šelmy. Jde o fázi, při které vznikají gamety. Cyklus začíná pozřením cyst přítomných v tkáních mezihostitele. Stěna cysty je rozrušena žaludečními enzymy a bradyzoity se dostávají do střeva definitivního hostitele. Samoomezující počet množení probíhá v erythrocytech uložených ve střevních klících především ilea [1; 2; 7]

Vzniklé ovoidní makrogametocyty jsou složeny z měchýřkovitého jádra s jadérkem. Mikrogamety mají tři bičíky, z nichž jeden je zakrnělý. Mikrogamety se vytvářejí v kulovitých mikrogametocytech, kde se jich dokáže vyskytnout 10 až 32 [1].

Makrogamety, které jsou v hostitelské buňce, se s celou buňkou dostávají do střeva hostitele, kde se vyskytují mikrogamety, které se uvolnily z parazitoformní vakuoly. Mikrogamety prostupují do hostitelské buňky buněčnou membránou a oplodňují makrogamety. To vše se děje dříve, než vznikne stěna oocysty. Po oplodnění se dostávají oocysty rozrušením buňky z enterocytů střeva do vnějšího prostředí kočičím trusem. Nevysporulované oocysty se začínají vylučovat 3. až 7. den po pozření tkáňových cyst a vylučování může trvat až 20 dní. Kočky dokážou vyloučit během této doby až 100 milionů oocyst ve výkalech. Během této doby mohou infikovat velké množství hostitelů. Těmi jsou prakticky všichni teplokrevní živočichové, kteří požijí infikovanou potravu nebo vodu. Oocysty mohou infikovat samotné kočky ovšem s menší účinností [1; 2].

Sporulace, probíhá po několika dnech již mimo tělo kočky a při běžné teplotě trvá přibližně 1 až 5 dní. Meiotické snížení a morfologické změny předcházejí tvorbě sporulované oocysty. Vzniká tedy oocysta izosporového typu obsahující dvě haploidní sporocysty. Tyto sporocysty jsou vyplněny čtyřmi sporozoity. Oocysty dokážou vydržet dlouho dobu za velmi nepříznivých podmínek. Infekce toxoplazmou byla zjištěna například i u mořských savců, kde sporocysty v mořské vodě žijí několik měsíců a infikují živočichy [1; 2; 3].

Vývojový cyklus *Toxoplasmy gondii*



Obrázek 1 – Životní cyklus *T. gondii* [8]

3.3 Mechanismus působení v těle

Parazit je schopný procesem aktivní invaze napadnout různé buňky v těle hostitele. K tomu mu napomáhá jeho dobrá motilita a sekvenční sekrece proteinů ze sekrečních organel, mikronemů, rhoptries a denzních granulí. Patogen se připojí k membráně buňky. Mikronemy sekretují v závislosti na vápníku adheziny, jako je mikronemový protein MIC2, který rozpoznává receptory cizích buněk a zároveň podporuje reorientaci a uchycení parazita [2].

Celý děj závisí na komplexní interakci povrchu hostitelské buňky a parazita. Tento proces se nazývá klouzavá motilita a je výsledkem složitého lineárního motorického systému, který je podporovaný interakcemi aktin-myosin a dynamickými přestavbami cytoskeletu parazita [2].

Vstup do hostitelské buňky je velmi rychlý proces, při kterém mezi membránou hostitelské buňky a svým apikálním koncem tvoří toxoplazma těsné spojení. Toto spojení označujeme jako pohyblivé, jelikož se pohybuje od apikálního konce parazita k zadnímu konci a tím vytváří parazitoformní vakuolu. Mikronemy také secernují apikální membránový antigen AMA1, který je rovněž důležitý pro vytvoření tohoto pohyblivého spojení. Dále je zapotřebí sekrece Rhoptry ROP a krčních proteinů RON, vložených do membrány hostitelské buňky [2].

Parazitoformní vakuola parazita potřebuje ke svému vzniku sekreci proteinů ROP. Důležitý protein spojený s povrchem parazitoformní vakuoly je ROP18. Ten projevuje proteinkinázovou aktivitu, která má velký vliv na růst parazitů. Za ovlivňování sekrece interleukinů je zodpovědný protein ROP16, který dokáže manipulovat s genovou expresí hostitele [2].

Tvorba parazitoformní vakuoly parazita je během první hodiny po invazi taktéž ovlivněna denzními granulárními proteiny. Během procesu invaze se z parazitoformní vakuoly parazita odstraňuje většina hostitelských transmembránových proteinů. Tímto způsobem se zabráňuje fúzi s lysozomy nebo s cytoplazmatickým vezikulem a modifikují se biochemické charakteristiky parazitoformní vakuoly [2].

Sekretováním denzních granúl je podporován vývoj komplexní sítě membránových tubulů. Tyto tubuly vznikají z parazitoformní vakuoly a zasahují do vakuolárního lumenu. Tubulární síť je později zajištěna výměnou mezi parazitem a hostitelskou buňkou. Při výměně dochází k přivádění živin z cytoskeletu hostitelské buňky, exportu proteinů a lipidů z parazita do parazitoformní vakuoly nebo hostitelské buňky. Parazit využívá mitochondrií hostitelské buňky, které přispívají k metabolismu parazita. Mitochondrie jsou proto úzce spojeny s parazitoformní vakuolou [2].

Parazité opouštějí hostitelskou buňku na základě aktivního procesu, který závisí na zvýšené koncentraci vápníku po uvolnění z intracelulárních zásob. Úniku z buňky předchází dělení tachyzoitů procesem endodyogeneze v 6hodinovém až 9hodinovém cyklu. Dochází k vytvoření dvou dceřiných buněk v každé mateřské buňce a po nahromadění 64 až 128 parazitů v parazitoformní vakuole vystupují parazité z hostitelské buňky [2].

3.4 Zdroj nákazy

Horizontální přenos na člověka je ve většině případů způsoben požitím tkáňových cyst v infikovaném nesprávně tepelně upraveném masu. Další nejčastější příčiny nákazy jsou požití půdy, vody nebo potravin kontaminované sporulovanými oocystami, které se zde nacházejí z prostředí nebo přímo z kočičího trusu. Platí, že vysporulované oocysty jsou méně patogenní, než tkáňové cysty [2; 7].

Ročně je v České republice hlášeno několik stovek případů a velké množství nakažených pravděpodobně hlášení uniká [4].

Výzkumy zatím neukázaly relativní význam přenosu prostřednictvím tkáňových cyst versus oocyst v dané populaci. Studie pouze odhalily pomocí rizikových faktorů převládající cestu přenosu v dané populaci. Většina nakažených, dle provedených studií, si neuvědomuje rizika, kterým se vystavili při nákaze. Problém s rozlišením, zda se jedná o nákazu oocystami či tkáňovými cystami, může vyřešit objev specifického proteinu pro sporozoity a oocysty, který vyvolá produkci protilátek [2].

3.4.1 Kontaminované maso

Jako hlavní zdroj nákazy toxoplazmózy v západních zemích je považováno nesprávně zpracované maso z teplokrevných zvířat a ptáku, které obsahuje bradyzoitové cysty. Riziko spojené s typem masa se v různých zemích liší podle místních stravovacích návyků a podle prevalence u zvířat určených jako zdroj masa [2; 9].

Odhaduje se, že v Evropě je konzumace masa zodpovědná za 30 až 63 % případů infekce, zatímco kontakt s půdou představuje 6 až 17 % případů. Ve Spojených státech studie ukázala, že hlavním rizikem zvýšení infekce *T. gondii* je konzumace syrového mletého hovězího masa. Hospodářská zvířata představují přímý zdroj infekce pro lidi a také rezervoár pro parazita [2; 10].

3.4.2 Kontaminovaná voda

Oocysty dokážou zůstat životaschopné po dlouhou dobu ve vodě a odolávat mrazu i mírně vysokým teplotám vody. Nedokážou je zabít ani chemické či fyzikální úpravy vody, které se v dnešní době používají, včetně chlorace a úpravy ozonem. Onemocnění se častěji vyskytuje v teplých a vlhkých oblastech [2; 11].

V minulých letech již byla popsána ohniska spojená s kontaminací nádrží, které sloužily jako zásobárny vody. Epidemiím předcházely vydatné srážky a zákal v příslušných nádržích. Menší epidemie také vznikly po pití neupravené povrchové vody v odlehlých tropických oblastech [2].

Sladkovodní odtok z městských center u mořských pobřeží může kontaminovat mořskou vodu. Koryšci koncentrují *T. gondii*. Bylo prokázáno, že konzumace ústřic, škeblí a mušlí je rizikovým faktorem pro získání infekce toxoplazmou ve Spojených státech [2].

3.4.3 Kontaminovaná půda

V Evropě kontakt s půdou představuje velice silný rizikový faktor. Půda zapříčiňuje 6 až 17 % primárních infekcí u lidí. Riziko získání infekce po kontaktu s půdou je zvláště vysoké u dětí. V brazilské studii byly oocysty toxoplazmy izolovány až na 32 % školních hřišť. Pouze 2 % z populace koček v ČR vylučuje oocysty *T. gondii* [2; 7].

3.4.4 Kontaminované ovoce a zelenina

Kontaminovanou vodou a půdou může dojít k přenosu oocyst na zeleninu a ovoce pro lidskou potřebu. V několika studiích rizikových faktorů nebo případových kontrol byla konzumace nemyté syrové zeleniny nebo ovoce spojena se zvýšeným rizikem primární infekce. Experimentálně mohou oocysty *T. gondii* přilnout k bobulím, zejména

k malinám. Nejsou však žádné informace o detekci toxoplazmy na ovoci nebo zelenině za neexperimentálních podmínek [2].

3.4.5 Nepasterizované kozí mléko

Tachyzoit je forma *T. gondii*, která nedokáže příliš dlouhou dobu přežít mimo svou hostitelskou buňku. Horizontální přenos toxoplazmy prostřednictvím tachyzoitů proto pravděpodobně není z epidemiologického hlediska důležitý. Tachyzoity ovšem byly považovány za příčinu vzácných případů získané toxoplazmózy u lidí po konzumaci nepasterizovaného kozího mléka. Proto nepasterizované kozí mléko patří mezi rizikové faktory toxoplazmy, což naznačuje, že tachyzoity se mohou do hostitele dostat průnikem do slizniční tkáně [2].

3.4.6 Transplacentární přenos

Tachyzoity se mohou přenášet také transplacentárně a ohrozit tak plod. Tento způsob přenosu je u zvířat velmi vzácný, u lidí dochází k transplacentárnímu přenosu v prvním trimestru asi ve 25 % případů, ve druhém trimestru ve 45 % a v třetím trimestru asi v 65 až 80 % u nakažené matky. Frekvence vertikálního přenosu se tedy zvyšuje s gestačním věkem u infikované matky a také je závislá na celkovém stavu imunitního systému matky. Naopak závažnost příznaků s gestačním věkem klesá. Matka je ve většině případů asymptomatická, takže bez vyšetření, infekce není rozpoznána [2; 5; 7; 12].

K přenosu infekce na dítě dochází pouze při primoinfekci matky během těhotenství. Na začátku těhotenství je transplacentární přenos velmi vzácný, ale jestliže k němu dojde, následky pro dítě jsou velmi vážné. Vrozená infekce zapříčiněná toxoplazmózou je pro člověka jednou z největší zátěží. Nejvyšší pozitivita u těhotných žen na protilátky proti *T. gondii* oproti zbytku světa je v arabských a afrických zemích. V české republice jde asi o 400 až 600 případů ročně [2; 4; 6; 13].

3.4.7 Přenos transfuzí

K přenosu transfuzí nebo transplantací orgánů nemocného dárce dochází pouze vzácně [4].

3.5 Prevence

Vakcinace proti toxoplazmóze existuje pouze ve veterinární medicíně. Pro imunizaci lidí vakcína není vyvinuta a jedinou prevencí proti infekci je zabránit kontaktu člověka s tkáňovými cystami a oocystami. Mezi preventivní opatření by měla patřit edukace veřejnosti o podstatě nákazy a možnostech přenosu. Každý případ nákazy by měl být hlášen a statisticky evidován. Celosvětově se prevence proti toxoplazmóze velmi liší podle počtu zdrojů infekce a expozice jedince dle hygienických a kulturních zvyklostí [4; 9; 14; 15].

Domácí kočky by se měly vyskytovat v uzavřeném chovu a nebyť krmeny syrovým masem nebo vnitřnostmi. Tímto způsobem lze zabránit vylučování oocyst toxoplazmózy, přesto by se měly kočičí výkaly denně odstraňovat a také je doporučeno dezinfikovat jej teplem nebo 10 % čpavkem. Taktéž je nutné zamezit přístupu koček na dětská hřiště. Důsledná hygiena je důležitá pro snížení rizika nákazy. Při práci se zvířaty je nutné dodržování osobní hygieny a používat předepsané ochranné pomůcky [3; 4; 7; 14].

Při práci na zahradě by se vždy měly používat rukavice a také je zásadní konzumovat pouze omytou zeleninu a ovoce. Pokud budeme konzumovat dostatečně tepelně upravené maso a mléko je riziko nakažení tkáňovými cystami zcela vyloučené. Je důležité dbát opatrnosti i při pouhé manipulaci se syrovým masem, po které je nutné umýt si ruce a používané náčiní, popřípadě pracovat v rukavicích [3; 4; 7; 14].

3.5.1 Prevence u gravidních žen

Před začátkem gravidity by měla být žena vyšetřena na protilátky, jestliže u ní nejsou prokázány je důležité se proti naze během těhotenství chránit. Serologický screening na protilátky proti toxoplazmóze je v dnešní době v ČR dobrovolný. Pro gravidní ženu je prevencí proti naze toxoplazmózou důležitá správná hygiena a dietetické zásady, chemoterapie a vedený porod [3; 5; 12].

Pro snížení rizika nákazy již narozeného dítěte je možná chemoterapie, imunoprofylaxe a separace od matky se znemožněním kojení. Je možné také ukončit těhotenství to lze, pouze ale v zákonném termínu [12].

3.6 Průběh onemocnění

Průběh onemocnění se liší podle toho, zda se jedná o získanou či vrozenou infekci. Taktéž záleží na tom, zda jde o zdravého jedince, či o osobu imunologicky oslabenou. Nejčastěji se v České republice vyskytuje uzlinová forma, dále pak primoinfekce během gravidity, oční forma a nejméně častá je forma kongenitální. Častěji se toxoplazma vyskytuje u žen [4; 14].

3.6.1 Zdravý jedinec

U zdravého člověka tedy u imunokompetentní osoby toxoplazmóza probíhá většinou inaparentně nebo může mít abortivní průběh, ke kterému dochází pouze u 20 % nakažených. Při abortivním projevu dochází k zduření krčních, šíjových, axilárních nebo podčelistních uzlin a pacient trpí horečnatými stavy. Takové problémy člověka mohou provázet několik týdnů a podobat se infekční mononukleóze, jelikož na krevním nátěru je patrná monocytóza. Zřídka se vyskytuje gynekologická forma, při které u žen dochází k opakovaným potratům. Taktéž existuje oční forma neboli chorioretinitida, která byla dříve přisuzována pouze vrozené toxoplazmóze, studie ovšem ukázaly, že postihuje i pacienty s toxoplazmózou získanou. Nejvzácněji se projeví myokarditida či myositida [2; 3; 4].

Po několika týdnech se však vytvoří specifická buněčná a protilátková imunita, při které je aktivní stádium *T. gondii* potlačeno. Toxoplazma ovšem přežívá dále v klidovém stádiu bradyzoit, které se vyskytují v tkáňových cystách, a které jsou přítomny v těle doživotně. Tato fáze se nazývá latentní. Toxoplazma je v této fázi inaktivovaná a tělo hostitele si po celý život udržuje hladinu protilátek proti toxoplazmě, které ho chrání proti reaktivaci i reinfekci. Latentní toxoplazmóza může ovšem zapříčinit psychické změny. Podle studií se ukazuje, že v Evropě a Severní Americe je závažnost onemocnění nižší než například Africe, či Jižní Americe. To může být způsobeno tím, že v těchto oblastech se vyskytují atypické genotypy. Taktéž se z klidového stádia bradyzoit může lehce stát opět stádium aktivní tedy tachyzoit, a to nastává tehdy, pokud je hostitelův imunitní systém ohrožen a bradyzoity s tachyzoity vykazují různé antigenní profily [2; 11; 14].

3.6.2 Těhotné ženy

Primární získaná infekce od matky se označuje vrozená neboli kongenitální. Fáze těhotenství, v které dojde k nakažení plodu, určuje závažnost poškození. Na začátku těhotenství je placentární bariéra, která chrání plod a je cílovou tkání pro množení parazitů, nejméně účinnější. Během těhotenství se stává čím dál propustnější. Naopak je to se závažností případů, které jsou při proběhlé nákaze v třetím trimestru až z 80 % asymptomatické. Dalšími faktory, které ovlivňují míru zasažení plodu, jsou imunitní odpověď matky a virulence parazita [2; 16].

- První trimestr

Při nákaze v prvním trimestru dochází k závažným poškozením plodu, jako jsou různé abnormality či potrat. Během množení parazitů se vytváří ložiska nekrózy a silný zánět, to zapříčiňuje abnormality v mozkové a oční tkáni. Vzniklá nekrotická ložiska mohou blokovat Sylviusův kanálek, a to má za následek hydrocefalus postranních komor. Hlavními následky jsou záchvaty, mentální retardace, mikrocefalus, hydrocefalus, hluchota a psychomotorický deficit. Při nákaze v začátcích těhotenství jsou také závažnější oční léze, při kterých nemocný může být postihnut mikroftalmií, kataraktem, zvýšeným nitroočním tlakem, strabismem, optickou neuritidou a retinální nekrózou. Dále se může vyskytnout i uveitida s častou recidivou a retinochoroiditida, u kterých při postihnutí makuly může dojít až k oslepnutí [2; 17].

- Druhý trimestr

Pokud dojde k nákaze během druhého trimestru, je možné, že se objeví u plodu hyperechogenní mezenterie, hepatosplenomegalie a mozková kalcifikace. Po narození se u dítěte může rozvinout epilepsie, anémie, petechie vyvolané trombocytopenií, vyrážka, jaterní poruchy, pneumonitida nebo retinochoroiditida. Poslední jmenované je zvláštní tím, že je jedno z těch postižení, které se u novorozence neobjeví hned, ale projeví se až po několika letech [2; 4].

- Třetí trimestr

Jestliže dojde k nákaze plodu během třetího trimestru, infekce se většinou projeví pouze pozitivním sérologickým testem dítěte. Cysty *T. gondii* ovšem zůstávají v retině, mozku nebo myokardu a jejich přítomnost se může projevit až po několika letech [4].

3.6.3 Imunokompromitovaní jedinci

U lidí infikovaných HIV je onemocnění cerebrální toxoplazmóza považována za třetí nejčastější oportunní infekci. Mezi další imunokompromitované jedince, kteří jsou ohroženi toxoplazmózou, patří například nemocní s krevními malignitami, nemocní se solidními tumory, pacienti s vrozenou imunodeficiencí a pacienti na biologické léčbě. Reaktivace toxoplazmových cyst u lidí se sníženou imunitou může představovat smrtelné komplikace. Často se vyskytuje chorioretinitida, která se objevuje i u imunokompetentních jedinců. Dále pak mozková toxoplazmóza, u které je patrná nekrotizující mnohočetná ložisková encefalitida nejčastěji se vyskytující v bazálních gangliích, která ohrožuje pacienta na životě. Mezi méně časté projevy patří myokarditida, pneumonitida a myelitida [14; 18; 19; 20].

3.7 Diagnostika toxoplazmózy

Diagnostika toxoplazmózy zahrnuje klinický obraz, epidemiologickou anamnézu a laboratorní průkaz. V běžné praxi se nevyužívá přímé diagnostiky parazita, ale nejvýznamnějším stanovením je sérologické vyšetření založené na průkazu protilátek [21].

3.7.1 Nepřímé stanovení

- Stanovení celkových protilátek

Celkové protilátky se stanovují ze séra pacienta nejčastěji metodou KFR (komplementfixační reakce) nebo NIFR (nepřímá imunofluorescence), která se v ČR rutinně nepoužívá. Naměřené výsledky se udávají v titrech pro kvantitativní vyhodnocení. Pokud je titer nižší než 1:4, je výsledek negativní. U titrů 1:8 až 1:32 se jedná pravděpodobně o latentní infekci a při titru vyšším než 1:64 je možné, že je infekce

v akutní či postakutní fázi a dělají se doplňující vyšetření. Takové hodnoty vycházejí při použití metody KFR, u nepřímé imunofluorescence jsou obvykle hodnoty o 1 až 2 titry vyšší [14; 22].

- Stanovení specifických protilátek

Při tomto stanovení je umožněno prokázat semikvantitativně jednotlivé třídy protilátek, tedy IgG, IgM, IgA, IgE. Protilátky jsou stanovovány za pomoci imunoenzymatických testů, či imunoanalyzátorů využívající například chemiluminiscenční metody [14].

- Stanovení avidity antitoxoplazmových IgG

Stanovení je především využíváno u gravidních žen a slouží k zjištění stádia nemoci dle avidity antitoxoplazmových IgG. Čím je nižší avidita, tím je fáze onemocnění mladší [14; 22].

- Komparativní western blot

Pomocí tohoto stanovení se zjišťuje, jestli došlo k nákaze plodu u nakažené gravidní ženy. Porovnává se profil protilátek matky a dítěte. Nachází-li se jiné protilátky v séru matky a dítěte, reagují protilátky dítěte na alespoň jedné determinantě antigenu. Matky protilátky nereagují. Dítě je tudíž infikováno a tvoří si svoje vlastní protilátky. Pokud jsou profily protilátek stejné, jde o přenesené protilátky z matky na plod. Mimo sérum se může použít pro porovnání i plodová voda, pupečnicková krev, krev novorozence, likvor či nitrooční tekutiny [14].

Jestliže jsou přítomny protilátky proti toxoplazmóze, je jasné, že je infekce v těle pacienta přítomna. Pouze u novorozence se může jednat o přenesené protilátky od matky. IgG protilátky jsou na rozdíl od IgM protilátek transplacentárně přenosné. IgM protilátky plodu se začínají tvořit v 15. týdnu těhotenství, jejich diagnostika však není spolehlivá až do 20. týdne gravidity. Při pozitivitě IgM protilátek není ještě jisté poškození plodu [13; 14].

Pomocí sérologických testů lze také určit fáze infekce. Při akutní fázi, prudce stoupají protilátky IgM, IgA a v některých případech i IgE. Titr celkových protilátek se postupně zvyšuje a avidita IgG je nízká. Fáze postakutní je typická mírně klesajícími titry celkových protilátek. IgG protilátky jsou stále ve velkých titrech již s vysokou aviditou. Naopak IgA a IgE protilátky postupně zaniknou a pouze IgM protilátky mohou i při postakutní fázi přetrvat ve vysokých koncentracích. Ve fázi latentní jsou titry celkových protilátek nízké současně s nízkou hladinou IgG protilátek s vysokou aviditou. Ostatní třídy protilátek již nejsou přítomny [14].

3.7.2 Přímé stanovení

Přímé stanovení v periferní krvi je sice jednoznačným potvrzením akutní infekce, ale je nutné ho indikovat v co nejkratším čase od nakažení, jelikož DNA *T. gondii* je v periferní krvi přítomna jen krátkou dobu. Stanovení je proto významné při testování mozkomíšního moku, plodové vody, oční tekutiny, pupečnickové a novorozenecké krve a biotického materiálu. Pro stanovení DNA parazita se používá metoda PCR. Další způsob stanovení je izolační pokus, při kterém se injekčně vpraví do laboratorní myši získaný vzorek a po 2 týdnech se zjišťuje přítomnost nákazy u zvířete [14].

3.7.3 Histologické vyšetření

Postižené lymfatické uzliny u imunokompetentních osob, bývají často charakteristicky histopatologicky změněny. Je přítomna reaktivní folikulární hyperplázie, nepravidelné shluky epiteloidních histiocyty na okrajích zárodečných center a fokálně rozšířené sinusy monocytoidními buňkami [14].

3.7.4 Zobrazovací metody

Dle formy onemocnění se doplňuje vyšetření zobrazovacími metodami a klinickým vyšetřením. Při klinickém vyšetření pacient podstupuje dle příznaků např. sonografii, magnetickou rezonanci, tomografii, oftalmologické a neurologické vyšetření. Mozková toxoplazmóza se diagnostikuje nálezem četných ložisek pomocí CT, která jsou specifická [14; 23; 24].

3.8 Léčba

Léčba toxoplazmózy se napříč kontinenty i zeměmi liší. Záleží na prevalenci a incidenci případů v daném místě, a na úrovni zdravotnictví v dané zemi. Princip léčby je však na všech místech podobný. Evropská doporučení, která jsou platná v České republice, vycházejí ze získaných klinických a epidemiologických dat [22].

Bezpríznakoví a nakažení jedinci s lehkým akutním průběhem se neléčí. Léčba je zahájena pouze v případě akutní infekce v těhotenství, u kongenitální toxoplazmózy a při zasažení oka [3].

Léčba je především prováděna nasazením pyrimetaminu a sulfadiazinu. Kvůli snížení toxického působení těchto léků se podává také kyselina folinová (leukovorin). V případě zasažení CNS a očí je zahájena léčba kortikoidy. Místo sulfadiazinu se taktéž používá méně účinný kotrimoxazol. Dalšími účinnými látkami, které se jako terapie používají při onemocnění, jsou klindamycin, spiramycin, azitromycin, atovachon a jiné [3].

K zabránění přenosu infekce na plod se v prvním trimestru používá spiramycin, který se nedostává přes placentu k plodu a neléčí ho, pouze redukuje riziko přenosu, ve druhém trimestru pak sulfadiazin. Pokud je prokázáno, že k přenosu parazita na plod již došlo, kombinuje se jako terapie pyrimetamin se sulfadiazinem v kombinaci s kyselinou folinovou. Léky se 4-6 týdnů před porodem vysazují [3; 12].

4 METODIKA

Laboratorní diagnostika a vyhodnocení získaných výsledků probíhalo v Mikrobiologickém ústavu FN Plzeň Bory.

Vyšetřované vzorky pocházejí od pacientů FN Plzeň, gynekologů z celého Plzeňského kraje a také se jedná o vzorky přicházející do laboratoře ke confirmaci z ostatních mikrobiologických pracovišť z let 2011 až 2021.

Pro stanovení protilátek proti parazitu *T. gondii* se používá screeningová semikvantitativní metoda komplement fixační reakce, dále pak při pozitivitě se stanovuje třída imunoglobulinů metodou EIA, kterou rozlišujeme třídy IgG, IgM a IgA. Ke stanovení se používá patientské sérum po odebrání srážlivé krve. Sérum se skladuje při + 2 °C až +8 °C maximálně po dobu jednoho týdne. Se vzorky je zapotřebí pracovat jako s potenciálně infekčním materiálem, stejně tak i s roztoky souprav pro jejich zpracování, které obsahují antigen pro diagnostické účely [25].

4.1 Komplement fixační reakce

KFR reakce je screeningová semikvantitativní metoda pro stanovení celkových protilátek a posouzení fáze infekce při diagnostice toxoplazmózy. Její výhodou je dobrá specifická, citlivost a nenákladnost. Touto metodou však nelze rozlišit třídy imunoglobulinů, které se následně stanovují jinými metodami [26].

4.1.1 Princip reakce

KFR reakce je založena na vazbě komplementu na specifické komplexy antigenu s protilátkou. Jestliže k navázání komplementu nedojde, zůstává volný a přidané erythrocyty následně hemolyzuje. To značí negativní výsledek. Pokud se komplement naváže na komplex antigen-protilátka, po přidání erythrocytů hemolýza nenastává. Reakce je pozitivní a hledané protilátky jsou přítomny [26; 27].

4.1.2 Materiál a přístrojové vybavení

Stanovení za pomoci soupravy TestLine. Složení:

- Toxoplasma komplement fixační antigen – lyofilizovaný purifikovaný antigen prvoka *Toxoplasma gondii*;
- Barbitolový pufr pro KFR – 5x konc. (TestLine);
- Beraní erytrocyty, konzervované v Alseverově roztoku;
- CF-AMBOCEPTORset (TestLine);
- CF-COMPLEMENT (TestLine);
- Toxo-CF-Positive Control lyophil. Lidské sérum obsahující protilátky proti *Toxoplasma gondii* (TestLine);
- Toxo-CF-Negative Control lyophil. Lidské sérum neobsahující protilátky proti *Toxoplasma gondii* (TestLine);
- Mikrotitrační destičky s U jamkami;
- Chladnička (+2 °C až +8 °C) s vlhkou komůrkou;
- Vlhčený termostat 37 °C na inkubaci destiček;
- Mikropipety;
- Třepačka pro mikrotitrační destičky;
- Vodní lázeň 56 °C.

4.1.3 Příprava pracovních roztoků

- Barbitolový pufr pro KFR – 5x koncentrovaný. Zředěn 1:5 destilovanou vodou;
- Toxo-CF-Ag lyophil. rekonstituován 0,5 ml destilované vody a poté naředěn barbitolovým pufrem dle údajů v Listu kvality QC (www.testlinecd.cz, Listy kvality pro KFR);
- CF-Complement (1 ml) – rekonstituován v 1 ml destilované vody a poté naředěn barbitolovým pufrem dle údajů v Listu kvality QC (www.testlinecd.cz, Listy kvality pro KFR);
- CF-AMBOCEPTORset-Lyofylizát rekonstituován 1 ml destilované vody. Připravený roztok přenesen do lahvičky (Zásobní roztok amboceptoru) a získán předředěný amboceptor v poměru 1:100. Předředěný amboceptor

naředěn barbitalovým pufrem dle údajů v Listu kvality QC (www.testlinecd.cz, Listy kvality pro KFR);

- Beraní erythrocyty – promyté beraní erythrocyty 3krát v barbitalovém pufru, centrifugací a to 2 x 2000 rpm/10 min. a 1 x 2000 rpm/15 min.;
- Příprava 3 % beraních erythrocytů: pipetováno 30 μ l beraních erythrocytů do 1,0 ml barbitalového pufru v pracovním ředění;
- Hemolytický systém – připraveno smícháním stejných objemů 3% suspenze beraních erythrocytů a pracovního ředění amboceptoru. Senzibilizováno po dobu 30 minut při 37 °C v termostatu.

4.1.4 Příprava kontrol

- Lyofilizát negativní a pozitivní kontroly – rekonstituovány v 0,25 ml destilované vody. Inaktivace již provedena u výrobce.;
- Kontrola antigenu: 25 μ l antigenu + 50 μ l komplementu;
- Kontrola komplementu: 50 μ l barbitalového pufru + 50 μ l komplementu;
- Kontrola hemolytického systému: 100 μ l barbitalového pufru.

4.1.5 Pracovní postup

- I. 1. den
 - 1) Rozmrazit séra připravená ke stanovení.
 - 2) Nadepsat zkumavky příslušnými séry.
 - 3) Odlít do zkumavek menší objem sér (100 μ l).
 - 4) Inaktivovat séra ve vodní lázni při 56 °C po dobu 30 minut.
 - 5) Rozvržení a vyznačení rozmístění kontrol a vzorků na mikrotitrační destičce.
 - 6) Do jamek označených jako kontrola antigenu, komplementu a hemolytického systému pipetovat příslušné množství antigenu, komplementu a barbitalového pufru.
 - 7) Do všech jamek mikrotitrační destičky pipetovat 25 μ l barbitalového pufru v pracovním ředění, kromě kontroly antigenu, komplementu a hemolytického systému.
 - 8) Pipetovat 25 μ l pozitivní kontroly o známém titru a negativní kontroly do příslušných jamek v titru 1:2.

- 9) Pipetovat 25 μ l vyšetřovaných vzorků sér do vyznačených jamek v titru 1:2.
- 10) Obsah každé jamky s příslušným sérem řádně promíchat (několikrát nasát do pipety) a přenést 25 μ l takto naředěného séra ze sloupce 1 do jamky ve sloupci 2. Takto pokračovat až do posledního sloupce na mikrotitrační destičce a z něho poté odstranit 25 μ l roztoku.
- 11) Do všech jamek vyjma prvního sloupce, kde jsou séra ředěna v titru 1:2, který slouží jako kontrola antikomplementarity, pipetovat 25 μ l antigenu v pracovním ředění.
- 12) Do prvního sloupce s ředěním 1:2, doplnit 25 μ l barbitalového pufru v pracovním ředění.
- 13) Do všech jamek, kromě kontroly antigenu, komplementu, hemolytického systému, pipetovat 50 μ l vychlazeného (+2 °C až +8 °C) komplementu v pracovním ředění.
- 14) Důkladně promíchat obsah jamek za pomoci třepačky po dobu 10 minut.
- 15) Inkubovat 18 hodin při teplotě +2 °C až 8 °C ve vlhké komůrce.

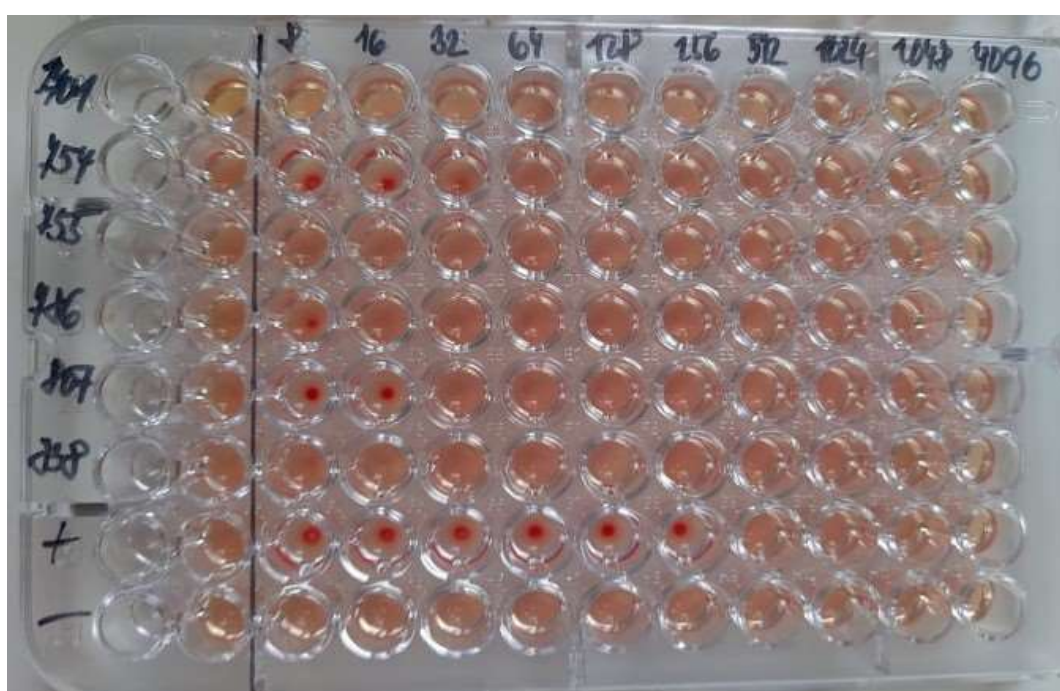
II. 2. den

- 1) Připravit hemolytický systém smícháním 3% suspenze beraních erytrocytů se stejným objemem amboceptoru v pracovním ředění (přidat hemolyzin do krvinek).
- 2) Hemolytický systém senzibilizovat ve vodní lázni při 37 °C po dobu 30 minut, každých 10 minut promíchat.
- 3) Přidat do všech jamek 25 μ l hemolytického systému a po dobu 10 minut nechat promíchat na třepačce.
- 4) Inkubovat ve vlhčeném termostatu při 37 °C po dobu 30 minut.
- 5) Po inkubaci důkladně promíchat obsah jamek pomocí třepačky 10 minut.
- 6) Inkubovat ve vlhčeném termostatu při 37 °C po dobu 30 minut.
- 7) Inkubovat 2 hodiny při teplotě +2 °C až 8 °C ve vlhké komůrce.
- 8) Po úplné sedimentaci krvinek odečíst výsledek.

Na obrázku 2 je vidět pozitivní i negativní reakce testu KFR.

Pozitivní reakce nastává tehdy, kdy beraní erythrocyty nezlyzovaly, ale sedimentovaly a jsou přítomny v knoflíkovitém útvaru na dně jamky. Znamená to, že ve vzorku jsou přítomny protilátky v daném ředění [25].

Negativní reakce nastává, pokud má obsah jamky rovnoměrně červenou barvu a na dně není přítomný sediment. Ve vzorku tedy nejsou přítomny protilátky v daném ředění [25].



Obrázek 2 – Mikrotitrační destička s KFR reakcí vzorků, s pozitivní a negativní kontrolou [vlastní zdroj]

4.1.6 Vyhodnocení výsledků

Pozitivní výsledek je při titru séra rovným či vyšším než 1:8. Přítomnost protilátek značí infekci pacienta. Hraniční výsledek je, jestliže je titr séra roven 1:4. Sérokonverze, při které je negativní výsledek v prvním a negativní výsledek v druhém vzorku séra stejného pacienta značí primární infekci. Stejný titr či pokles titru poukazuje na akutní nákazu. Při titru rovném či vyšším než 1:64 je nutné vzorek vyšetřit konfirmačními testy – EIA pro jednotlivé imunoglobuliny [25].

4.2 EIA Toxoplasma IgG

EIA metodou typ sandwich byly detekovány po pozitivní KFR reakci IgG protilátky proti *Toxoplasma gondii* a současně byla stanovena jejich avidita v lidském séru.

4.2.1 Princip metody

Na stěně jamky mikrotitrační destičky je navázán specifický antigen. K Ag se připojí primární protilátka (protilátka z vyšetřovaného vzorku) a na ní se naváže sekundární protilátka konjugovaná enzymem. Značená Ab je zvířecí imunoglobulinová frakce proti lidskému IgG konjugovaná křenovou peroxidázou. Peroxidázová aktivita se stanovuje za pomoci substrátu s TMB, který zmodrá při pozitivitě. Reakce je ukončena zastavovacím roztokem. Modré zbarvení se změní na žluté. Intenzita vzniklého žlutého zbarvení se měří fotometricky při 450 nm a je úměrná koncentraci specifických IgG protilátek ve vzorku [26].

4.2.2 Materiál a přístrojové vybavení

Stanovení za pomoci soupravy TestLine

- Potažená destička s navázaným Ag, 12 x 8 jamek;
- Negativní kontrola (kalibrátor 1) 0,1 IU/ml;
Roztok neobsahující specifické lidské protilátky, v pracovním ředění.
- CUT-OFF (kalibrátor 2) 6 IU/ml;
Roztok obsahující specifické lidské protilátky v hraniční koncentraci, v pracovním ředění.
- Pozitivní kontrola (kalibrátor 3) 60 IU/ml;
Roztok obsahující specifické lidské protilátky, v pracovním ředění.
- Kalibrátor 4 (240 IU/ml);
Roztok obsahující specifické lidské protilátky, v pracovním ředění.
- Konjugát;
Roztok obsahující zvířecí imunoglobulin proti lidskému IgG značený peroxidázou, v pracovním ředění.
- Ředící roztok vzorků 5;
Pufr se stabilizátory bílkovin, v pracovním ředění.

- TMB-Complete 2;
Jednosložkový substrátový roztok obsahující TMB/H₂O₂, v pracovním ředění.
- Promývací roztok;
20x koncentrovaný pufr.
- Zastavovací roztok;
Roztok kyseliny, v pracovním ředění.
- Aviditní roztok 1;
Stabilizovaný roztok močoviny.
- Jedno a vícekanálová pipeta;
- Špičky pro jednorázové použití;
- Promývací zařízení;
- Stopky;
- Termostat na 37 °C;
- Fotometr pro mikrotitrační destičky;

4.2.3 Příprava pracovních roztoků

- Promývací roztok zředěn 1:20 (1 díl roztoku a 19 dílů destilované vody).
- Ostatní roztoky připraveny v pracovním ředění od výrobce.

4.2.4 Ředění vzorků

- Vzorky důkladně promíchány a ředěny 1:101 ředícím roztokem vzorků.

4.2.5 Pracovní postup – stanovení IgG

Stanovení za pomoci soupravy TestLine na přístroji Dynex DSX

- 1) Všechny reagentie nechat vytemperovat na laboratorní teplotu a důkladně promíchat.
- 2) Jamku A1, na mikrotitrační destičce, nechat prázdnou (blank).
- 3) Pipetovat 100 µl negativní kontroly (kalibrátor 1) do 1 jamky.
- 4) Pipetovat 100 µl CUT-OFF (kalibrátor 2) do 2 jamky.
- 5) Pipetovat 100 µl pozitivní kontroly (kalibrátor 3) do 2 jamek.
- 6) Pipetovat 100 µl kalibrátoru 4 do 2 jamek.

- 7) Pipetovat 100 μ l vzorků v odpovídajícím ředění do zbývajících jamek.
- 8) Destičku přikrýt víčkem a inkubovat 60 minut při 37 °C.
- 9) Odsát obsah jamek a 5x promýt pracovním promývacím roztokem. Jamky plnit po okraj, a nakonec zbytky roztoku důkladně vyklepat do svého materiálu.
- 10) Do všech jamek kromě A1 přidat 100 μ l konjugátu.
- 11) Destičku přikrýt víčkem a inkubovat 60 minut při 37 °C.
- 12) Odsát obsah jamek a 5x promýt pracovním promývacím roztokem. Jamky plnit po okraj, a nakonec zbytky roztoku důkladně vyklepat do svého materiálu.
- 13) Do všech jamek dávkovat 100 μ l jednosložkového substrátu TMB-Complete.
- 14) Destičku přikrýt víčkem a inkubovat 20 minut při 37 °C v temnu.
- 15) Zastavit reakci přidáním 100 μ l Zastavovacího roztoku ve stejném pořadí a intervalech jako byl dávkován substrát.
- 16) Změřit na fotometru při vlnové délce 450 nm intenzitu zbarvení roztoků v jamkách proti blanku, a to do 30 minut po zastavení reakce.

4.2.6 Vyhodnocení výsledků

Vzorokly se hodnotí dle indexu pozitivity (IP), který nám říká, jestliže je hodnota IP menší než 0,9 jde o negativní výsledek. Pokud se hodnota IP pohybuje mezi 0,9 až 1,1 jde o hraniční hodnotu. Při IP větším, než 1,1 jedná se o pozitivní výsledek [28].

4.2.7 Princip metody – stanovení avidity

Principem testu je narušení vazby antigenu s protilátkou aviditním roztokem, kterým je roztok močoviny. Pokud má protilátka nízkou aviditu, je roztokem vymyta z vazby na antigen. Protilátky, které mají silnou aviditu, zůstanou alespoň částečně navázány na antigen i po působení aviditního roztoku. Výpočet indexu avidity určuje pevnost vazby a určuje, jaká část protilátek (v %) zůstala navázána na antigen i po inkubaci s aviditním roztokem [28].

4.2.8 Pracovní postup – stanovení avidity

Stanovení za pomoci soupravy TestLine na přístroji Dynex DSX

- 1) Vyšetřované sérum předředit na hodnotu 60 IU/ml, ředit 1:101 Ředícím roztokem vzorků.
- 2) Rozdělit si strip na N = normální test a strip Av = pro aviditní test
- 3) Jamku A1 nechat prázdnou.
- 4) Pipetovat 100 µl negativní kontroly (kalibrátor 1) do 1 jamky stripu N.
- 5) Pipetovat 100 µl CUT-OFF (kalibrátor 2) do 1 jamky stripu N.
- 6) Pipetovat 100 µl pozitivní kontroly (kalibrátor 3) do 2 sousedních jamek stripu N a Av.
- 7) Pipetovat 100 µl kalibrátoru 4 do 2 sousedních jamek stripu N a Av.
- 8) Pipetovat 100 µl vzorků v odpovídajícím ředění do dvou sousedních zbývajících jamek N a Av.
- 9) Destičku přikrýt víčkem a inkubovat 60 minut při 37 °C.
- 10) Odsát obsah jamek a 5krát promýt pracovním promývacím roztokem. Jamky plnit po okraj, a nakonec zbytky roztoku důkladně vyklepat do svého materiálu.
- 11) Dávkovat do všech jamek stripů Av 100 µl aviditního roztoku.
- 12) Dávkovat do všech jamek stripů N 100 µl pracovního promývacího roztoku.
- 13) Destičku přikrýt víčkem a inkubovat 10 minut při 37 °C.
- 14) Odsát obsah jamek a 5krát promýt pracovním promývacím roztokem. Jamky plnit po okraj, a nakonec zbytky roztoku důkladně vyklepat do svého materiálu.
- 15) Do všech jamek kromě A1 přidat 100 µl konjugátu.
- 16) Destičku přikrýt víčkem a inkubovat 60 minut při 37 °C.
- 17) Odsát obsah jamek a 5krát promýt pracovním promývacím roztokem. Jamky plnit po okraj, a nakonec zbytky roztoku důkladně vyklepat do svého materiálu.
- 18) Do všech jamek dávkovat 100 µl jednosložkového substrátu TMB-Complete.
- 19) Destičku přikrýt víčkem a inkubovat 20 minut při 37 °C v temnu.
- 20) Zastavit reakci přidáním 100 µl Zastavovacího roztoku ve stejném pořadí a intervalech jako byl dávkován substrát.

21) Změřit na fotometru při vlnové délce 450 nm intenzitu zbarvení roztoků v jamkách proti blanku, a to do 30 minut po zastavení reakce.

4.2.9 Vyhodnocení výsledků

Vzorky se vyhodnocují dle hodnoty indexu avidity (IAv), který se vypočítá jako absorbance vzorku na stripu AV lomeno absorbance vzorku na stripu N násobeno 100. Výsledek je poté v procentech. Jestliže je hodnota IAv menší, než 30 jedná se o nízkou aviditu. Pokud je hodnota mezi 30 až 35 %, jde o hraniční výsledek a při hodnotě 35 až 100 % jde o vysokou aviditu [28].

4.3 EIA Toxoplasma IgM

EIA metodou typ capture byly detekovány po pozitivní KFR reakci IgM protilátky proti *Toxoplasma gondii* v lidském séru.

4.3.1 Princip metody

Na stěně jamky mikrotitrační destičky je navázána zvířecí protilátka proti lidským imunoglobulinům třídy IgM. K protilátce se připojí stanovovaný antigen z vyšetřovaného vzorku a na ten se naváže sekundární protilátka konjugovaná enzymem. Značená Ab je zvířecí imunoglobulinová frakce proti lidskému IgM konjugovaná křenovou peroxidázou. Peroxidázová aktivita se stanovuje za pomoci substrátu s TMB, který zmodrá při pozitivitě. Reakce je ukončena zastavovacím roztokem. Modré zbarvení se změní na žluté. Intenzita vzniklého žlutého zbarvení se měří fotometricky při 450 nm a je úměrná koncentraci specifických IgM protilátek ve vzorku [26].

4.3.2 Materiál a přístrojové vybavení

- Potažená destička s navázanou protilátkou, 12 x 8 jamek;
- Negativní kontrola;
Roztok neobsahující specifické lidské protilátky, v pracovním ředění.
- CUT-OFF;
Roztok obsahující specifické lidské protilátky v hraniční koncentraci, v pracovním ředění.

- Pozitivní kontrola;
Roztok obsahující specifické lidské protilátky, v pracovním ředění.
- Tracer;
Pufr se stabilizátory bílkovin obsahující antigen *T. gondii* a konjugát, v pracovním ředění.
- Ředící roztok vzorků 5;
Pufr se stabilizátory bílkovin, v pracovním ředění.
- TMB-Complete 2;
Jednosložkový substrátový roztok obsahující TMB/H₂O₂, v pracovním ředění.
- Promývací roztok;
20krát koncentrovaný pufr.
- Zastavovací roztok;
Roztok kyseliny, v pracovním ředění.
- Jedno a vícekanálová pipeta;
- Špičky pro jednorázové použití;
- Promývací zařízení;
- Stopky;
- Termostat na 37 °C;
- Fotometr pro mikrotitrační destičky;

4.3.3 Příprava pracovních roztoků

- Promývací roztok zředěn 1:20 (1 díl roztoku a 19 dílů destilované vody).
- Ostatní roztoky připraveny v pracovním ředění od výrobce.

4.3.4 Ředění vzorků

- Vzorky důkladně promíchány a ředěny 1:101 Ředícím roztokem vzorků.

4.3.5 Pracovní postup

Stanovení za pomoci soupravy TestLine na přístroji Dynex DSX

- 1) Všechny reagenty nechat vytemperovat na laboratorní teplotu a důkladně promíchat.
- 2) Jamku A1, na mikrotitrační destičce, nechat prázdnou (blank).
- 3) Pipetovat 100 μ l Negativní kontroly do 1 jamky.
- 4) Pipetovat 100 μ l CUT-OFF do 2 jamek.
- 5) Pipetovat 100 μ l pozitivní kontroly do 1 jamky.
- 6) Pipetovat 100 μ l vzorků v odpovídajícím ředění do zbývajících jamek.
- 7) Destičku přikrýt víčkem a inkubovat 60 minut při 37 °C.
- 8) Odsát obsah jamek a 5krát promýt pracovním promývacím roztokem. Jamky plnit po okraj, a nakonec zbytky roztoku důkladně vyklepat do svého materiálu.
- 9) Do všech jamek kromě A1 přidat 100 μ l Traceru.
- 10) Destičku přikrýt víčkem a inkubovat 60 minut při 37 °C.
- 11) Odsát obsah jamek a 5krát promýt pracovním promývacím roztokem. Jamky plnit po okraj, a nakonec zbytky roztoku důkladně vyklepat do svého materiálu.
- 12) Do všech jamek dávkovat 100 μ l jednosložkového substrátu TMB-Complete.
- 13) Destičku přikrýt víčkem a inkubovat 20 minut při 37 °C v temnu.
- 14) Zastavit reakci přidáním 100 μ l Zastavovacího roztoku ve stejném pořadí a intervalech jako byl dávkován substrát.
- 15) Změřit na fotometru při vlnové délce 450 nm intenzitu zbarvení roztoků v jamkách proti blanku, a to do 30 minut po zastavení reakce.

4.3.6 Vyhodnocení výsledků

Vzorky se hodnotí dle indexu pozitivity (IP), který nám říká, že jestliže je hodnota IP menší než 0,9, jde o negativní výsledek. Pokud se hodnota IP pohybuje mezi 0,9 až 1,1, jde o hraniční hodnotu. Při IP větším, než 1,1 jedná se o pozitivní výsledek [29].

4.4 EIA Toxoplasma IgA

EIA metodou typ capture byly detekovány po pozitivní KFR reakci IgA protilátky proti *Toxoplasma gondii* v lidském séru.

4.4.1 Princip metody

Na stěně jamky mikrotitrační destičky je navázána zvířecí protilátka proti lidským imunoglobulinům třídy IgA. K protilátce se připojí stanovovaný antigen z vyšetřovaného vzorku a na ten se naváže sekundární protilátka konjugovaná enzymem. Značená Ab je zvířecí imunoglobulinová frakce proti lidskému IgA konjugovaná křenovou peroxidázou. Peroxidázová aktivita se stanovuje za pomoci substrátu s TMB, který zmodrá při pozitivitě. Reakce je ukončena zastavovacím roztokem. Modré zbarvení se změní na žluté. Intenzita vzniklého žlutého zbarvení se měří fotometricky při 450 nm a je úměrná koncentraci specifických IgA protilátek ve vzorku [26].

4.4.2 Materiál a přístrojové vybavení

- Potažená destička s navázanou protilátkou, 12 x 8 jamek;
- Negativní kontrola;
Roztok neobsahující specifické lidské protilátky, v pracovním ředění.
- CUT-OFF;
Roztok obsahující specifické lidské protilátky v hraniční koncentraci, v pracovním ředění.
- Pozitivní kontrola;
Roztok obsahující specifické lidské protilátky, v pracovním ředění.
- Tracer;
Pufr se stabilizátory bílkovin obsahující antigen *T. gondii* a konjugát, v pracovním ředění.
- Ředící roztok vzorků 5;
Pufr se stabilizátory bílkovin, v pracovním ředění.
- TMB-Complete 2;
Jednosložkový substrátový roztok obsahující TMB/H₂O₂, v pracovním ředění.
- Promývací roztok;
20krát koncentrovaný pufr.

- Zastavovací roztok;
Roztok kyseliny, v pracovním ředění.
- Jedno a vícekanálová pipeta;
- Špičky pro jednorázové použití;
- Promývací zařízení;
- Stopky;
- Termostat na 37 °C;
- Fotometr pro mikrotitrační destičky;

4.4.3 Příprava pracovních roztoků

- Promývací roztok zředěn 1:20 (1 díl roztoku a 19 dílů destilované vody).
- Ostatní roztoky připraveny v pracovním ředění od výrobce.

4.4.4 Ředění vzorků

- Vzorky důkladně promíchány a ředěny 1:101 Ředícím roztokem vzorků.

4.4.5 Pracovní postup

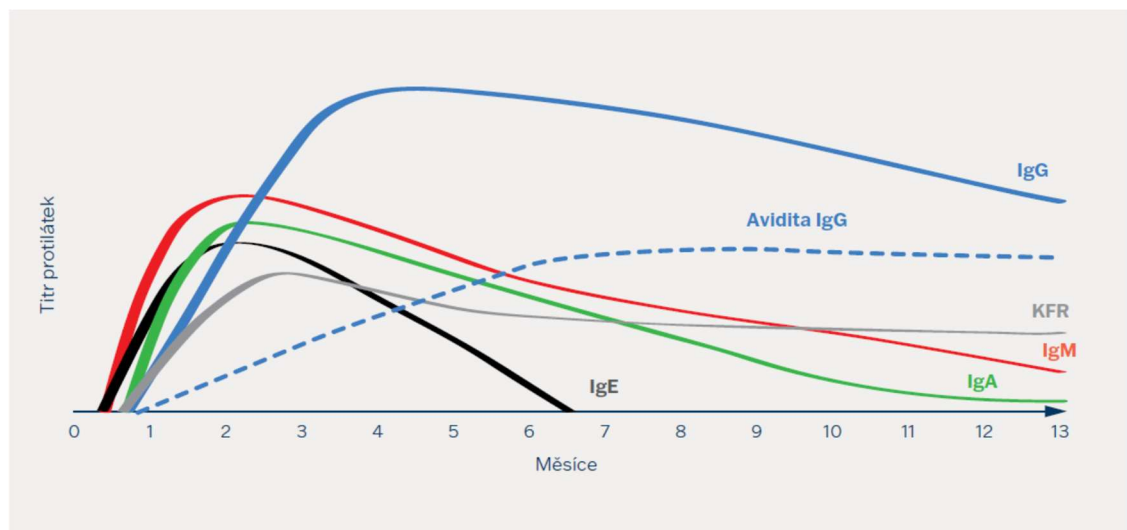
Stanovení za pomoci soupravy TestLine na přístroji Dynex DSX

- 1) Všechny reagentie nechat vytemperovat na laboratorní teplotu a důkladně promíchat.
- 2) Jamku A1, na mikrotitrační destičce, nechat prázdnou (blank).
- 3) Pipetovat 100 µl Negativní kontroly do 1 jamky.
- 4) Pipetovat 100 µl CUT-OFF do 2 jamek.
- 5) Pipetovat 100 µl Pozitivní kontroly do 1 jamky.
- 6) Pipetovat 100 µl vzorků v odpovídajícím ředění do zbývajících jamek.
- 7) Destičku přikrýt víčkem a inkubovat 60 minut při 37 °C.
- 8) Odsát obsah jamek a 5krát promýt pracovním promývacím roztokem. Jamky plnit po okraj, a nakonec zbytky roztoku důkladně vyklepat do svého materiálu.
- 9) Do všech jamek kromě A1 přidat 100 µl Traceru.
- 10) Destičku přikrýt víčkem a inkubovat 60 minut při 37 °C.

- 11) Odsát obsah jamek a 5krát promýt pracovním promývacím roztokem. Jamky plnit po okraj, a nakonec zbytky roztoku důkladně vyklepat do svého materiálu.
- 12) Do všech jamek dávkovat 100 μ l jednosložkového substrátu TMB-Complete.
- 13) Destičku přikrýt víčkem a inkubovat 20 minut při 37 °C v temnu.
- 14) Zastavit reakci přidáním 100 μ l Zastavovacího roztoku ve stejném pořadí a intervalech jako byl dávkován substrát.
- 15) Změřit na fotometru při vlnové délce 450 nm intenzitu zbarvení roztoků v jamkách proti blanku, a to do 30 minut po zastavení reakce.

4.4.6 Vyhodnocení výsledků

Vzorky se hodnotí dle indexu pozitivity (IP), který nám říká, jestliže je hodnota IP menší než 0,9 jde o negativní výsledek. Pokud se hodnota IP pohybuje mezi 0,9 až 1,1 jde o hraniční hodnotu. Při IP větším, než 1,1 jedná se o pozitivní výsledek [30].



Obrázek 3 – Protilátková odpověď v čase [30]

5 VÝSLEDKY

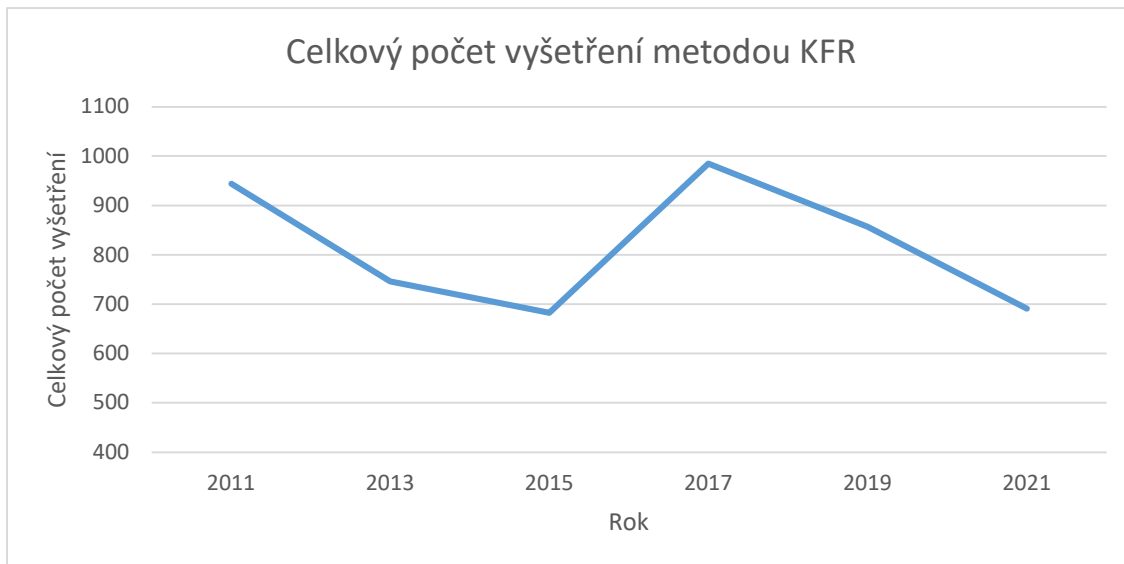
5.1 Zhodnocení počtu vyšetření mezi lety 2011 až 2021

V tabulce 1 jsou uvedeny počty vyšetření v letech 2011, 2013, 2015, 2017, 2019 a 2021. Celkový počet vyšetření a zahrnuje všechna provedená vyšetření včetně opakovaného stanovení. Počet vyšetřených osob uvádí pouze osoby, které byly daný rok změřeny. Celkový počet vyšetření u gravidních žen zahrnuje všechna provedená vyšetření u gravidních žen včetně opakovaného vyšetření.

Tabulka 1 - Počty vyšetření metodou KFR z let 2011 až 2021 [vlastní zdroj]

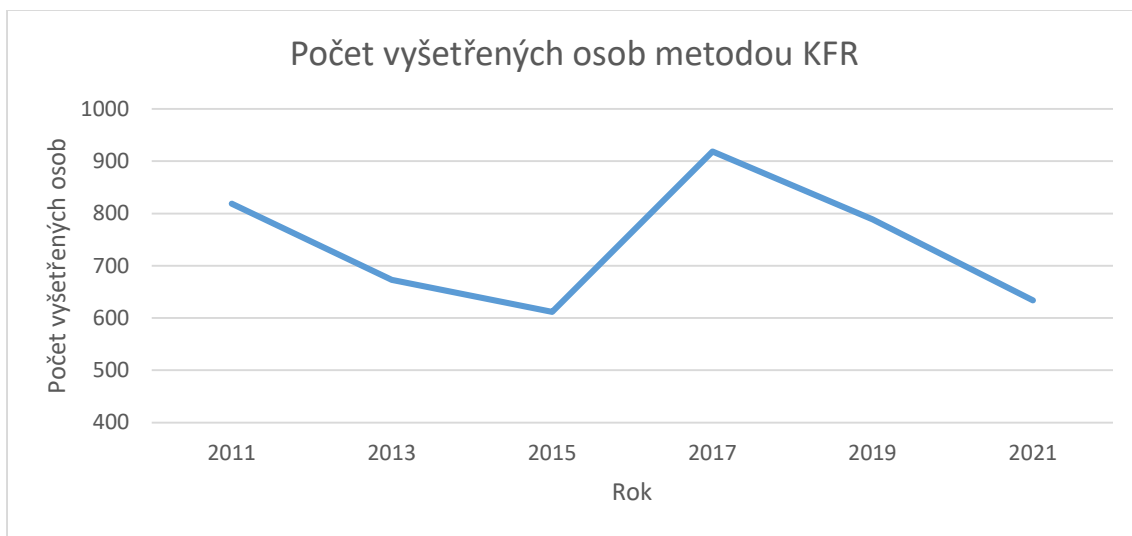
Vyšetření metodou KFR						
Rok	2011	2013	2015	2017	2019	2021
Celkový počet vyšetření	944	746	683	985	857	691
Z toho muži	268	243	225	348	280	209
Z toho ženy	676	463	476	637	577	482
Počet vyšetřených osob	819	673	612	919	789	634
Z toho muži	252	231	213	335	267	197
Z toho ženy	567	442	418	584	522	437
Celkový počet vyšetření u gravidních žen	261	118	135	231	216	182
Počet vyšetřených gravidních žen	195	99	123	184	197	161

Graf na obrázku 4 ukazuje celkové počty vyšetření metodou KFR mezi lety 2011 až 2021. Z grafu vyplývá, že nejvyšší počty vyšetření včetně opakovaného vyšetření byly v letech 2017 a 2011. Naopak nejméně vyšetření se provedlo v letech 2015 a 2021.



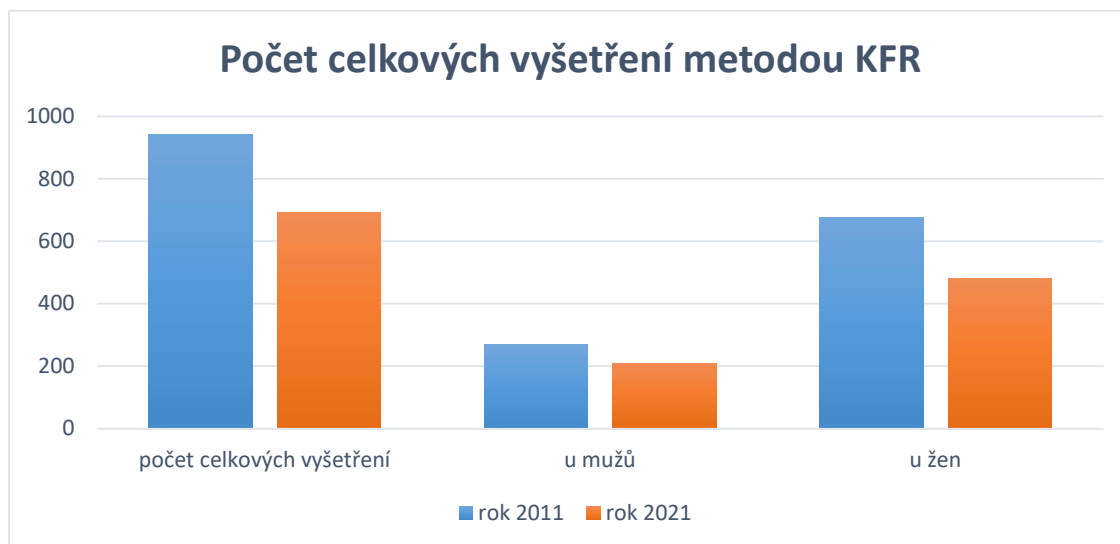
Obrázek 4 – Celkový počet vyšetření metodou KFR mezi lety 2011 až 2021 [vlastní zdroj]

Graf na obrázku 5 ukazuje počet vyšetřených osob metodou KFR mezi lety 2011 až 2021. Z grafu vyplývá, že nejvyšší počty vyšetřených osob byly v letech 2017 a 2011. Naopak nejméně vyšetřených osob bylo v letech 2015 a 2021.



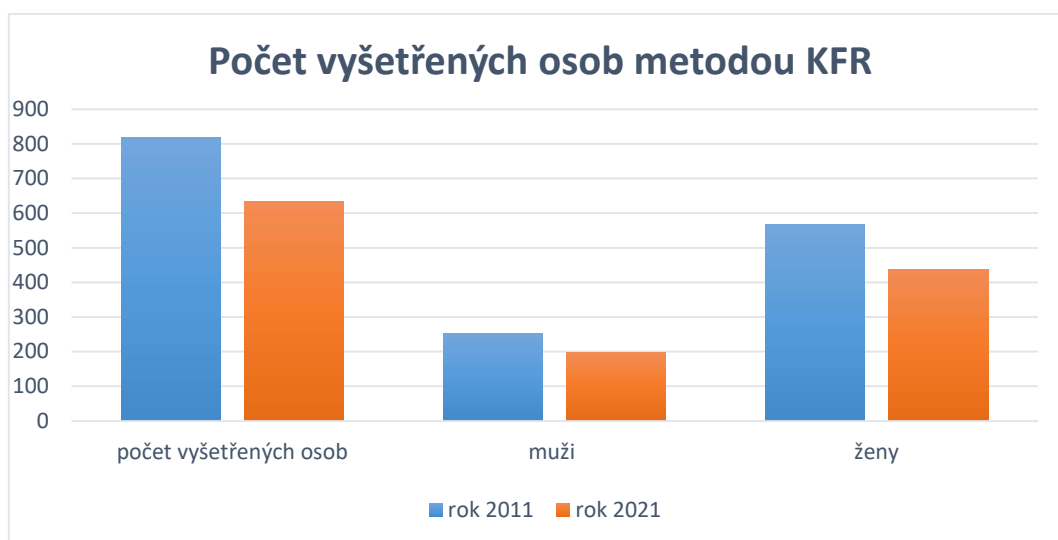
Obrázek 5 – Počet vyšetřených osob metodou KFR mezi lety 2011 až 2021 [vlastní zdroj]

Graf na obrázku 6 představuje celkové počty vyšetření metodou KFR a celkový počet tohoto vyšetření u mužů a žen v letech 2011 a 2021. Z grafu vyplývá, že vyšší počet vyšetření včetně opakovaného vyšetření byl v roce 2011 a v obou letech převládá vyšetření žen.



Obrázek 6 – Počet celkových vyšetření metodou KFR dle pohlaví v letech 2011 a 2021 [vlastní zdroj]

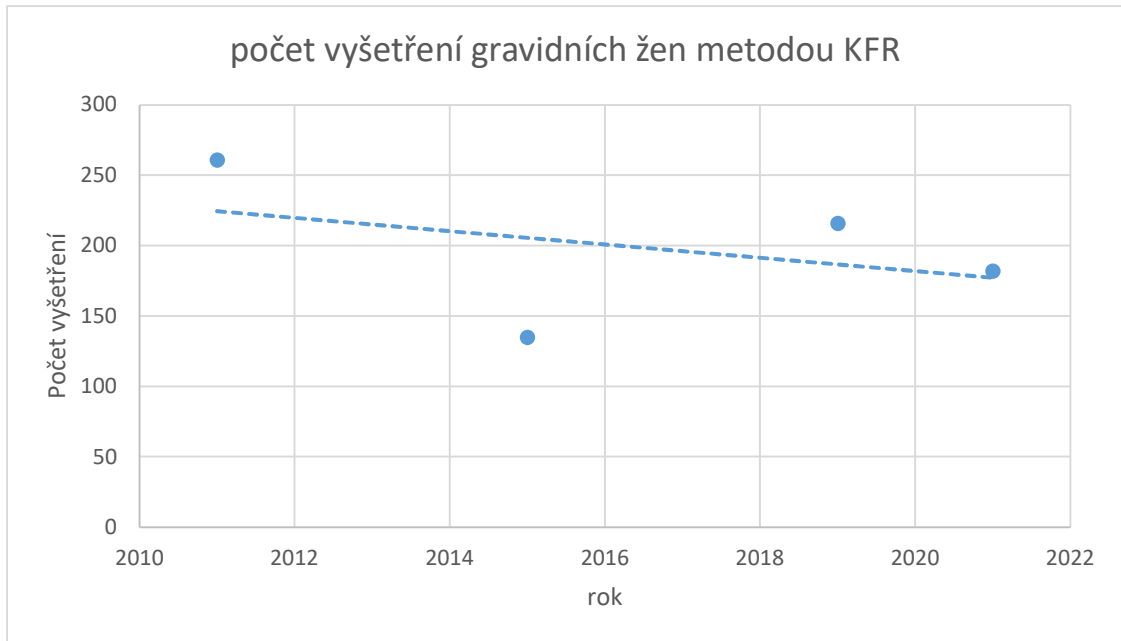
Graf na obrázku 7 představuje počet vyšetřených osob metodou KFR a z toho počet vyšetření u mužů a žen v letech 2011 a 2021. Z grafu vyplývá, že vyšší počet vyšetření byl v roce 2011 a v obou letech převládá vyšetření žen.



Obrázek 7 – Počet vyšetřených osob metodou KFR dle pohlaví v letech 2011 a 2021 [vlastní zdroj]

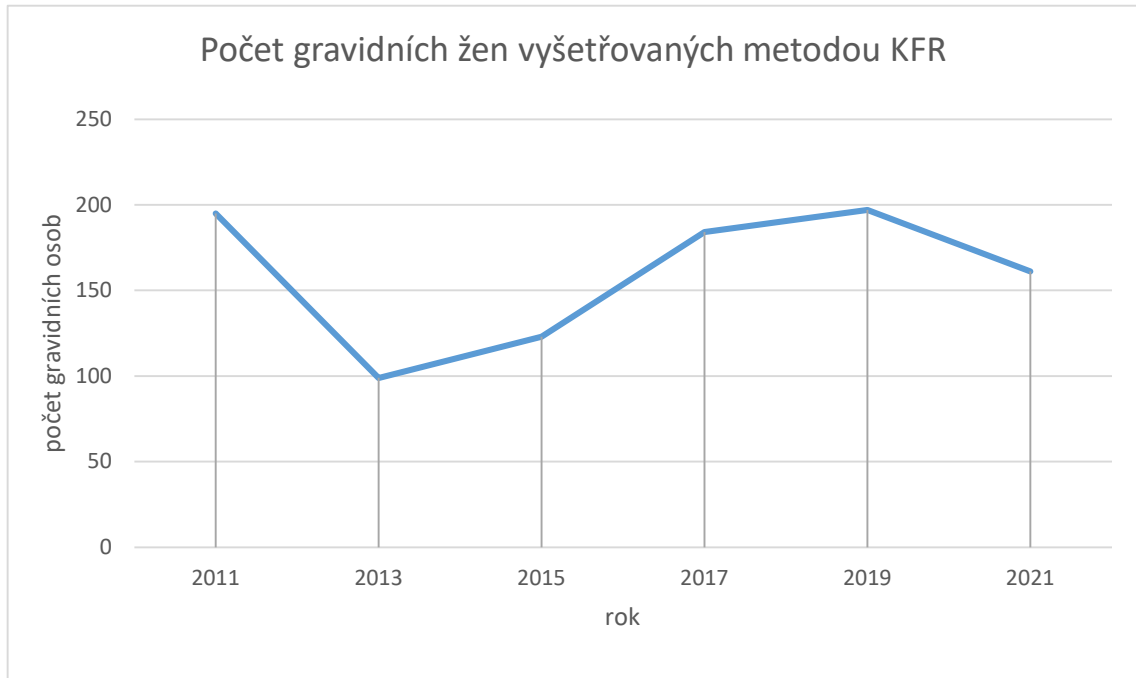
5.2 Zhodnocení počtu vyšetření gravidních žen

Graf na obrázku 8 představuje celkový počet vyšetření gravidních žen metodou KFR v letech 2011, 2015, 2019 a 2021. Z grafu vyplývá, že během let má počet celkových vyšetření gravidních žen klesající tendenci.



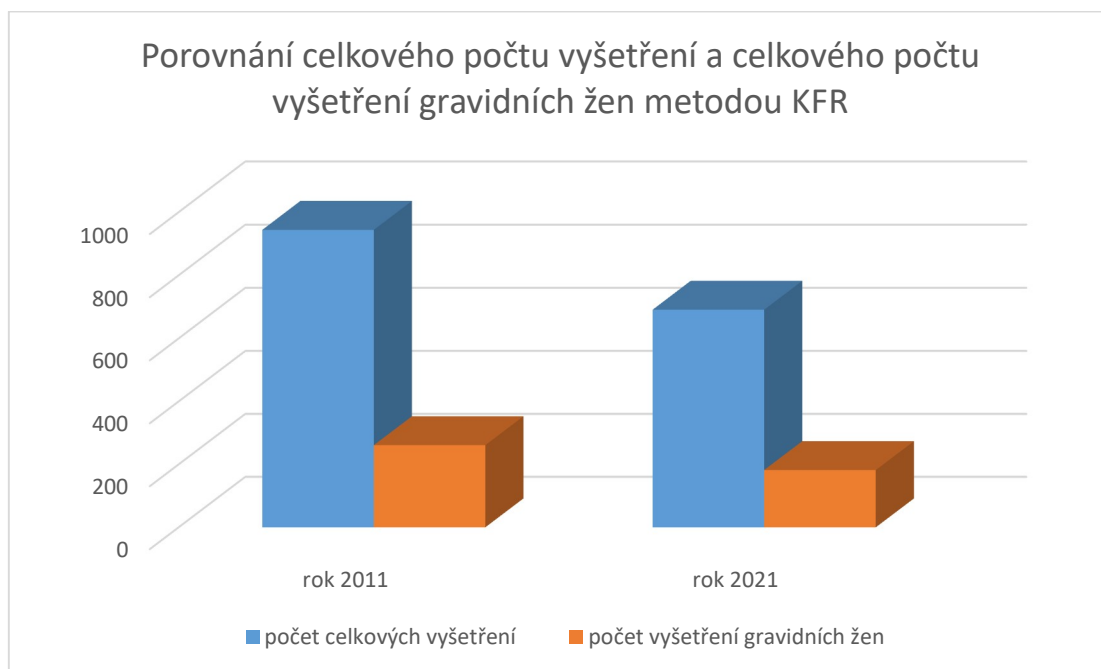
Obrázek 8 – Celkový počet vyšetření gravidních žen metodou KFR v letech 2011, 2015, 2019 a 2021 [vlastní zdroj]

Graf na obrázku 9 představuje počet gravidních žen vyšetřených metodou KFR mezi lety 2011 až 2021. Z grafu vyplývá, že nejvíce vyšetření gravidních žen bylo v letech 2019, 2011. Nejméně vyšetření gravidních žen probíhalo v roce 2013 a 2021.



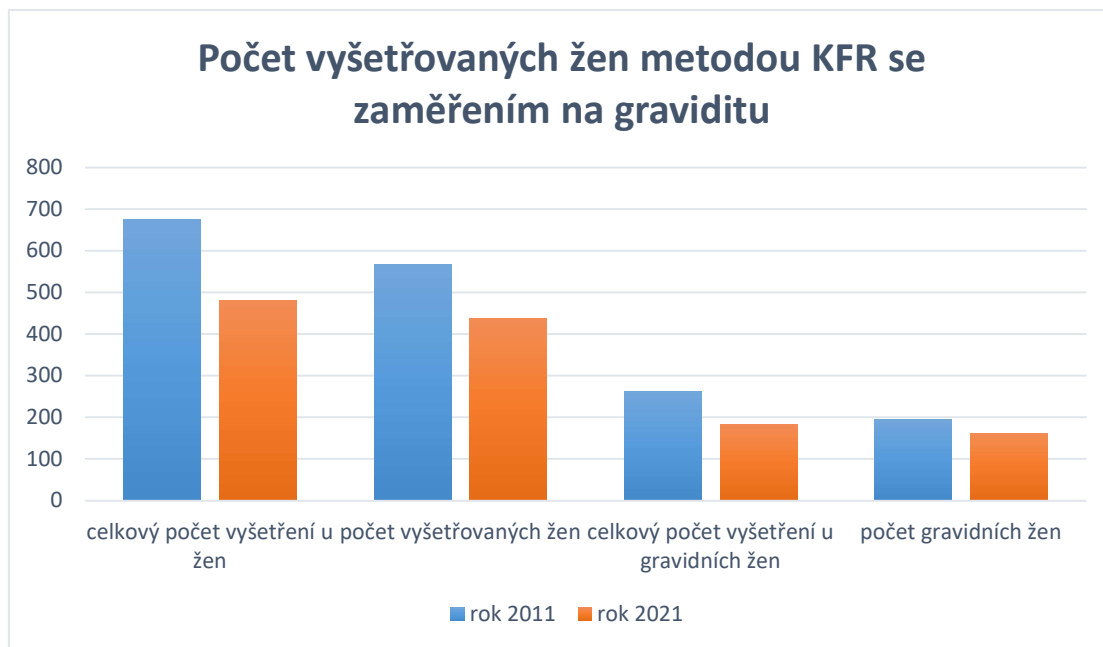
Obrázek 9 – Počet gravidních žen vyšetřovaných metodou KFR v letech 2011 až 2021 [vlastní zdroj]

Graf na obrázku 10 ukazuje celkový počet vyšetření metodou KFR v letech 2011 a 2021 a celkový počet vyšetření gravidních žen metodou KFR v letech 2011 a 2021. Z grafu vyplývá, že celkový počet vyšetření gravidních žen je méně než polovina z celkového počtu vyšetření. V roce 2011 je více celkových vyšetření i vyšetření těhotných žen než v roce 2021.



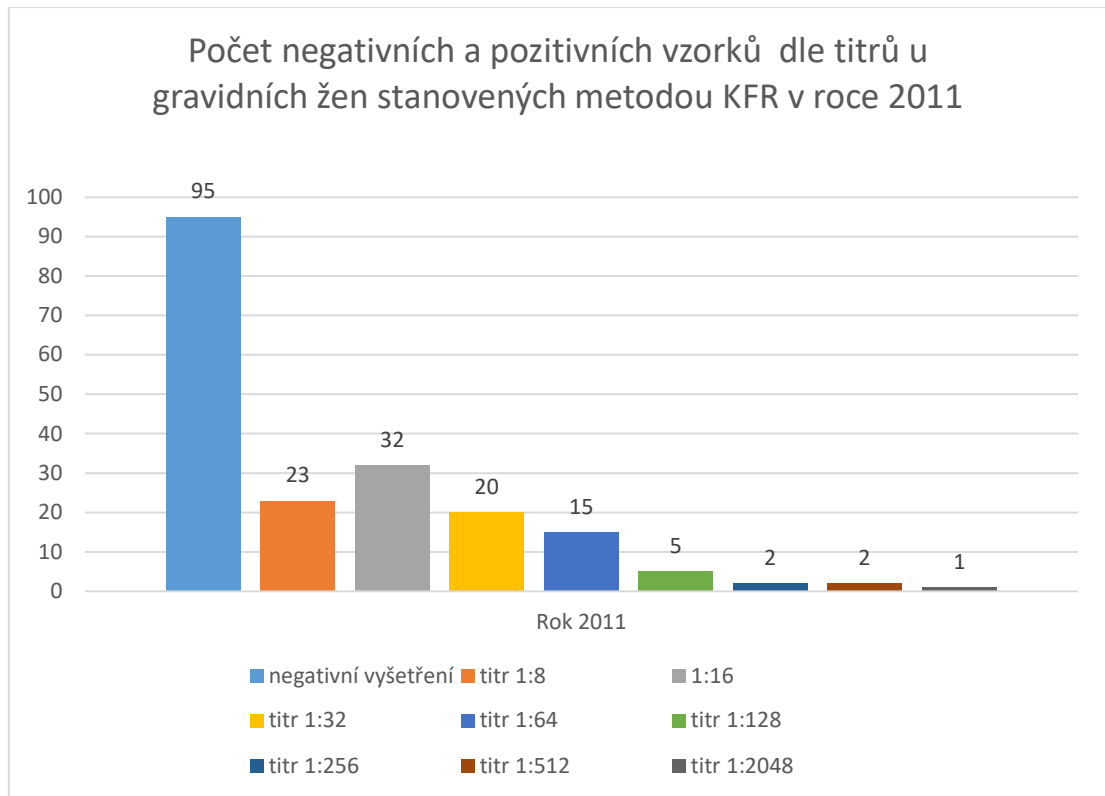
Obrázek 10 – Porovnání celkového počtu vyšetření metodou KFR a z toho vyšetření gravidních žen v letech 2011 a 2021 [vlastní zdroj]

Graf na obrázku 11 zobrazuje souhrn počtu vyšetřovaných žen metodou KFR se zaměřením na graviditu v letech 2011 a 2021. Z grafu je patrné, že v roce 2021 bylo vyšetřeno méně žen, než v roce 2011.



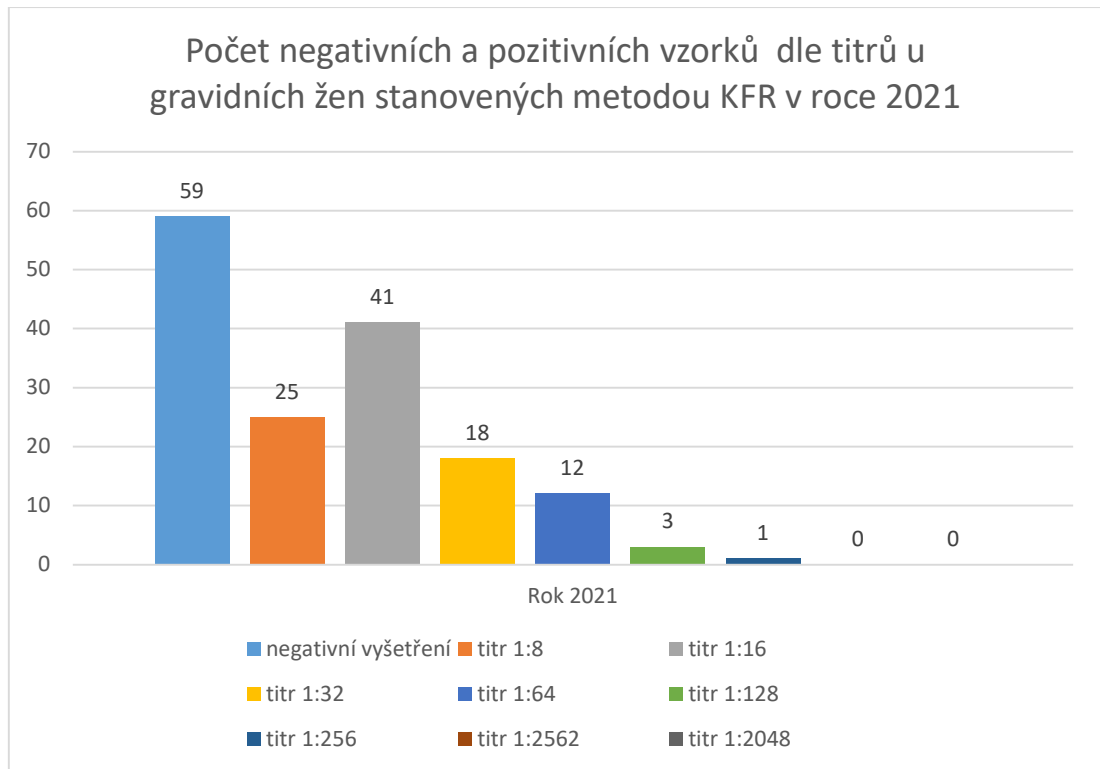
Obrázek 11 – Počet vyšetřovaných žen metodou KFR se zaměřením na graviditu v letech 2011 a 2021 [vlastní zdroj]

Graf na obrázku 12 znázorňuje počet negativních a pozitivních vzorků dle titrů u gravidních žen stanovených metodou KFR v roce 2011. Z grafu vyplývá, že pozitivních vzorků, bylo více než negativních vzorků. Nejvíce zastoupeným titrem byl titer s hodnotou 1:16. Nejméně bylo hodnoty titru 1:2048, což byl zároveň nejnižší přítomný titer.



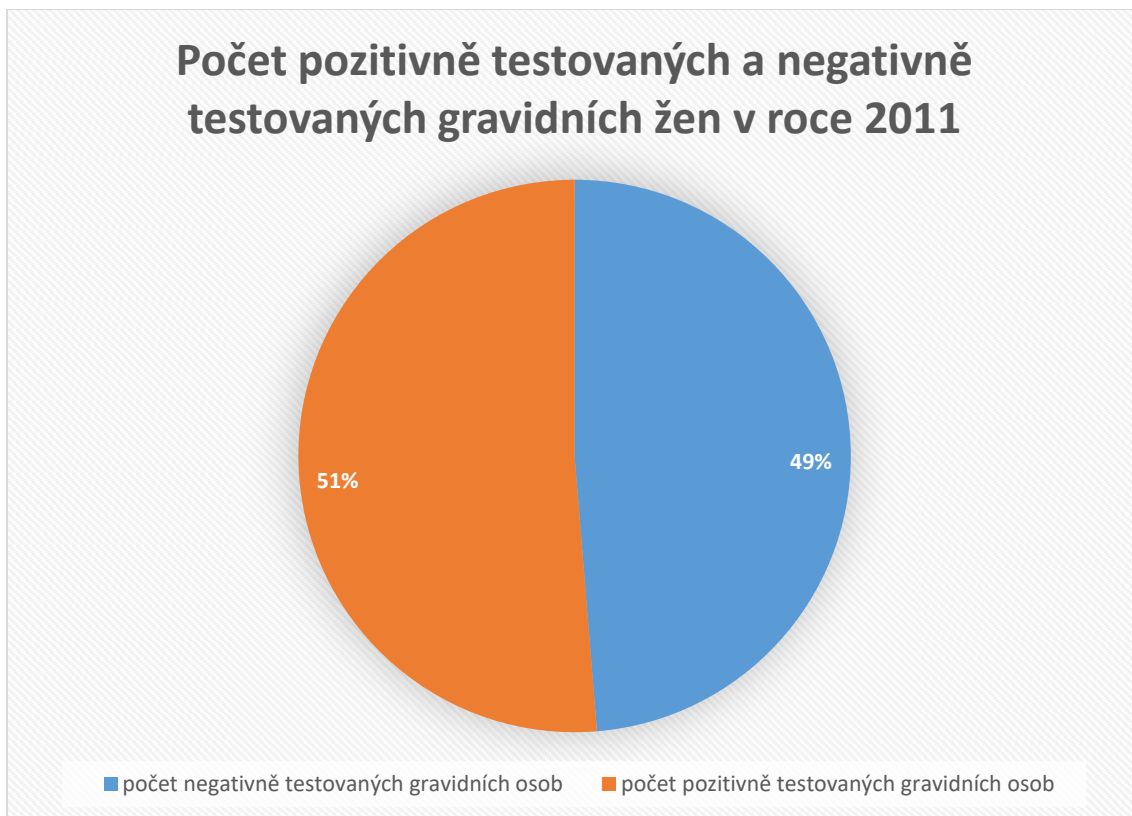
Obrázek 12 – Počet negativních a pozitivních vzorků dle titrů u gravidních žen stanovených metodou KFR v roce 2011 [vlastní zdroj]

Graf na obrázku 13 znázorňuje počet negativních a pozitivních vzorků dle titrů u gravidních žen stanovených metodou KFR v roce 2021. Z grafu vyplývá, že pozitivních vzorků, bylo více než negativních vzorků. Nejvíce zastoupeným titrem byl titr s hodnotou 1:16. Nejméně bylo hodnoty titru 1:256, což byl zároveň nejnižší přítomný titr.



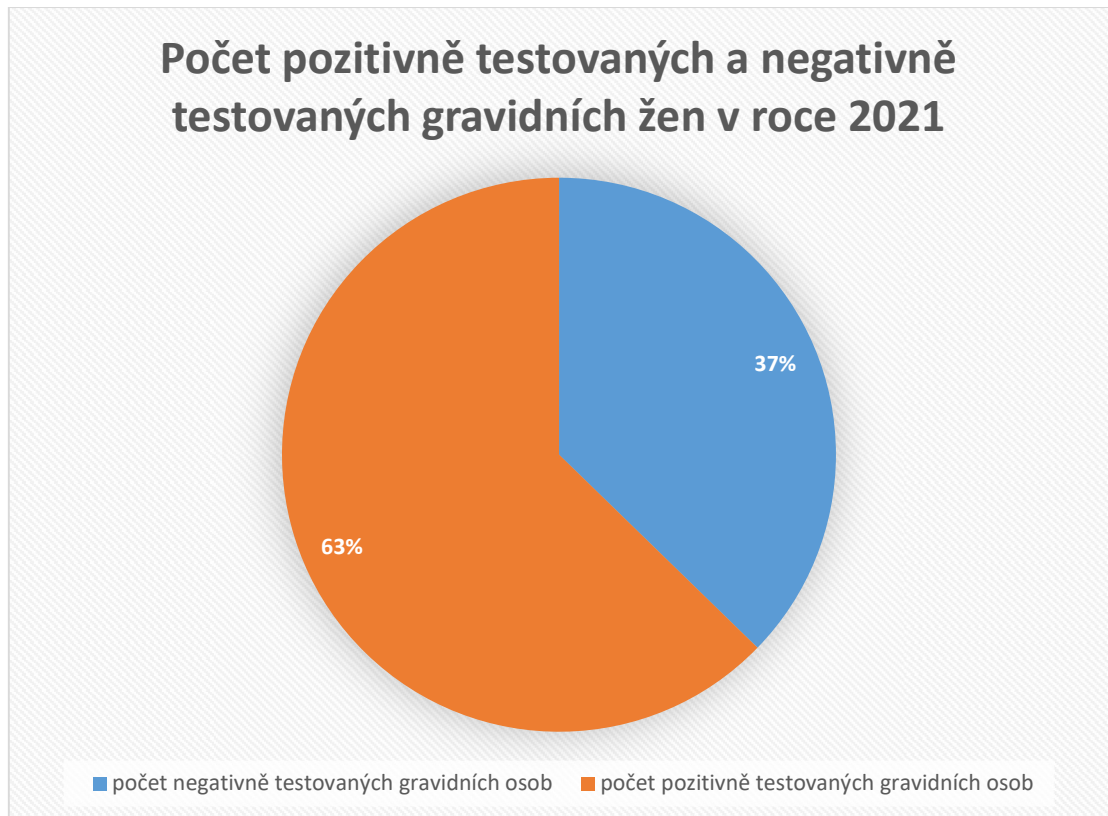
Obrázek 13 – Počet negativních a pozitivních vzorků dle titrů u gravidních žen stanovených metodou KFR v roce 2021 [vlastní zdroj]

Graf na obrázku 14 znázorňuje počet pozitivně testovaných a negativně testovaných gravidních žen z celkového počtu 195 testovaných gravidních žen metodou KFR v roce 2011. Z grafu je patrné, že v roce 2011 bylo více pozitivně testovaných gravidních žen a to 51 %, než negativně testovaných.



Obrázek 14 – Počet pozitivně testovaných a negativně testovaných gravidních žen z celkového počtu 195 testovaných gravidních žen metodou KFR v roce 2011 [vlastní zdroj]

Graf na obrázku 15 znázorňuje počet pozitivně testovaných a negativně testovaných gravidních žen z celkového počtu 161 testovaných gravidních žen metodou KFR v roce 2021. Z grafu je patrné, že v roce 2021 bylo více pozitivně testovaných gravidních žen a to 63 %, než negativně testovaných.



Obrázek 15 – Počet pozitivně testovaných a negativně testovaných gravidních žen z celkového počtu 161 testovaných gravidních žen metodou KFR v roce 2021 [vlastní zdroj]

6 DISKUZE

Cílem práce je statistické zpracování výsledků vyšetřování těhotných žen z let 2011 až 2021 v laboratoři FN Plzeň získaných metodou KFR. Komplement fixační reakce je sérologická screeningová metoda pro stanovení titru celkových protilátek proti *T. gondii* v patientském séru. Jelikož v České republice vyšetření na protilátky proti *T. gondii* u gravidních žen nebylo nikdy povinné, všechny tyto ženy vyšetření nepodstoupí. V ČR tak byly pouze výjimečné oblasti nebo laboratoře (Plzeň, Praha, Karviná), kde se dá mluvit o systematické práci v této problematice alespoň v nějakém časovém období. Konkrétně v Plzni byly gravidní ženy systematicky vyšetřovány zhruba od roku 1990. V této době na projektu spolupracovali regionální gynekologové a na rozdíl od ekonomů pochopili, že záchrana i jednoho novorozence je důležitější s ohledem na etickou a sociální stránku než ekonomické zájmy. Ovšem v případě narození postiženého dítěte by pak i ekonomika hrála svoji určitou roli, jelikož péče o člověka se zdravotním postižením je velmi nákladná. V laboratoři FN tak jsou k dispozici dlouhodobé výsledky od roku 1990 a celkový počet vyšetřených žen se dnes pohybuje okolo 50 000. Bohužel díky stále horší finanční situaci ve zdravotním systému, díky neexistující opoře v legislativě a výměně generace gynekologů se počet provedení těchto vyšetření s každým rokem snižuje, a to i tam, kde vyšetřování mělo tradici. Toto nepovinné vyšetření je ale v současnosti možno indikovat na žádost samotné ženy nebo na základě doporučení ošetřujícího lékaře. Základním cílem bylo a je včas zachytit infekci těhotné ženy a vhodnými terapeutickými opatřeními zabránit infekci a poškození plodu [31].

Screeningovou metodou KFR byly zpracovány výsledky získané v letech 2011, 2013, 2015, 2017, 2019 a 2021. Z grafů vyplývá, že nejvíce vyšetření včetně opakovaného vyšetření bylo provedeno v roce 2017. Důvodem bylo, že v tomto roce se v Plzeňském regionu narodilo nevratně poškozené dítě následkem kongenitální toxoplazmové infekce. Jeho matka nebyla nikdy vyšetřena. Takové negativní zkušenosti vždy vedou ošetřující lékaře k větší opatrnosti a bez ohledu na povinnost vždy dojde k vzestupu požadovaných konkrétních vyšetření [31].

Nejmenší počet celkových vyšetření byl proveden v roce 2015. V celkového počtu vyšetření převažuje vyšetření žen, kterých se uskutečnilo nejvíce v roce 2011. Nejméně celkových vyšetření u žen bylo provedeno v roce 2013. Z celkového počtu vyšetření žen

bylo nejvíce vyšetření u gravidních žen v roce 2011. Naopak nejméně vyšetření indikovaných gravidním ženám bylo v roce 2013.

Jestliže se zaměříme na od sebe nejvzdálenější roky, kterými jsou rok 2011 a 2021, je jasné, že v roce 2021 bylo provedeno daleko méně vyšetření než v roce 2011, a to ať už se jedná o počet celkových vyšetření, o počet osob, či o počet těhotných žen. Graf na obrázku 14 představuje procentuální zastoupení pozitivně a negativně testovaných gravidních žen v roce 2011. Konkrétně se jedná o 49 % negativně testovaných a 51 % pozitivně testovaných z celkového počtu 195 testovaných gravidních žen. Graf na obrázku 15 představuje procentuální zastoupení pozitivně a negativně testovaných gravidních žen v roce 2021. Konkrétně se jedná o 37 % negativně testovaných a 63 % pozitivně testovaných z celkového počtu 161 testovaných gravidních žen. Tím lze tedy poukázat na to, že i když bylo v roce 2011 testováno více osob než v roce 2021, byla prokázána pozitivita u méně vzorků nežli v roce 2021, a to o 12 % pozitivních případů.

Petr Kodým a Markéta Gelineky uvádějí v článku „*Prevence, diagnostika a léčba toxoplazmózy v graviditě*“, že počet případů klesl od roku 2000, kdy byl počet nakažených 670 osob a z toho 425 žen, během roku 2009 na 231 případů a z toho bylo pozitivních 156 žen. Z dat Státního zdravotnického úřadu byla dle počtu nahlášeného onemocnění nemocnost toxoplazmózou na 100 000 obyvatel v ČR v roce 2012 nemocnost 1,8 a v roce 2021 nemocnost 0,9. Tato data tedy ukazují, že počet případů nákazy toxoplazmózou již dlouhodobě klesá a dle našich dat zároveň klesá i počet vyšetření nemoci. Naše práce ovšem ukazuje, že procentuální zastoupení pozitivních případů v roce 2021 je vyšší, než v roce 2011, i když počet vyšetření je nižší [32; 33].

Metodou KFR se nejen může porovnávat počet pozitivních a negativních vzorků, či počet vyšetření, ale také výše titru, která nám orientačně udává, v jaké koncentraci jsou dané protilátky přítomny v séru a tím orientačně zjistit fázi onemocnění. Výsledek je pozitivní, jestliže titr je rovný či přesahuje hodnotu 1:8. Při tomto titru a titru 1:32 se může jednat o latentní infekci. Pokud je titr vyšší než 1:64, může být infekce v akutní nebo postakutní fázi. Grafy 12 a 13 tyto hodnoty titrů v roce 2011 a 2021 porovnávají a ukazují, že v roce 2011 byl naměřen nejvyšší titr 1:2048 a v roce 2021 titr 1:256. V roce 2011 bylo stanoveno 75 gravidních žen, u kterých pravděpodobně probíhala latentní fáze infekce. V roce 2021 bylo odhaleno 84 gravidních žen, u kterých pravděpodobně probíhala latentní

fáze infekce. Pokud se diagnostikuje u těhotných žen latentní fáze infekce, neměla by tato skutečnost nijak ohrozit plod.

V roce 2011 bylo odhaleno 10 gravidních žen, u kterých pravděpodobně probíhala akutní či postakutní fáze infekce. V roce 2021 byly 4 gravidní ženy s pravděpodobně akutní či postakutní fází infekce. Pokud se diagnostikuje u těhotných žen akutní fáze infekce, je možné, že by mohlo dojít k infikování a poškození plodu. Z těchto dat vyplývá, že v roce 2011 bylo pravděpodobně více žen diagnostikovaných s akutní fází infekce, nežli v roce 2021. To, o jakou fázi infekce se jedná, se musí vždy dovyšetřit pomocí dalších metod. V případě FN Plzeň se jedná o metodu EIA IgG, IgM a IgA [34].

Na základě vyšetření protilátek proti *T. gondii* a zjištěných výsledků metodou KFR dáváme klinikovi odpověď na otázku, jestli žena má protilátky (setkala se v minulosti s tímto parazitem) anebo je negativní (nesetkala se s parazitem). Toto rozdělení má velký význam pro prevenci v období gravidity. U pozitivních žen s jakýmkoliv nízkým nebo středním titrem protilátek je riziko přenosu na plod v případě infekce matky minimální, téměř nulové. Všechny negativní ženy by měly dodržovat pečlivěji jednoduchá opatření k zabránění své infekce. Spočívají v dodržování základní hygieny (mytí rukou po kontaktu s kočkami nebo po práci na zahrádce, nekonzumovat nedostatečně tepelně zpracované maso atd.). To je tedy jeden význam screeningu těhotných. Druhý, důležitější, spočívá ve vyhledávání žen s akutní nebo nedávno proběhlou infekcí matky, u které hrozí přenos na plod a jako následek jeho možné poškození nebo dokonce nedonošení. I v případě nákazy matky během gravidity máme možnost prognózy vývoje plodu významně terapeuticky ovlivnit. Tato situace musí být, ale podchycena co nejdříve po nákaze matky, ve většině případů bezpříznakové. Jak bylo výše napsáno, ke konkrétnějšímu a nutnému určení fáze infekce (latentní, chronická, akutní) nám slouží detekce jednotlivých specifických imunoglobulinů IgG, IgM a IgA. Zatímco imunoglobuliny IgG v podstatě kopírují výsledky metody KFR, imunoglobuliny IgM a IgA mají významnější roli a umožňují nám časově konkrétněji specifikovat fázi infekce – jde hlavně o akutní stav. Obě třídy charakterizuje jejich rychlý vzestup po nákaze a jejich rychlá degradace (v rámci měsíců). V historii jsme měli nejprve možnost detekovat imunoglobuliny IgM. Jejich přetrvávání bylo garantováno opravdu v řádech měsíců, ale později se ukázalo, že si dokážou udržet hladinu detekovatelnosti (pozitivity) i jeden rok. Další nevýhodou je možnost jejich nespecifické syntézy a vzniku tzv. falešné

pozitivity v graviditě. Proto bylo nutné zavést laboratorní metodu, která by nám ještě konkrétněji časově specifikovala čas nákazy matky. Tou je detekce imunoglobulinů IgA, která je již mnoho let součástí běžné laboratorní diagnostiky toxoplazmózy. U těchto imunoglobulinů opravdu platí, že jejich detekovatelnost je v řádu měsíců. Jejich koncentrace slábne, až zcela vymizí (viz obrázek 3). Chceme-li, ještě více specifikovat čas nákazy, používáme v laboratoři metodu zjištění avidity IgG imunoglobulinů, která nám rozliší infekce na starší než 4 měsíce a infekce získané do 4 měsíců od laboratorního vyšetření. Infekce starší než 4 měsíce mají aviditu vysokou, infekce vzniklé do 4 měsíců od získaného výsledku mají aviditu nízkou (pevnost vazby antigenu s protilátkou je slabá). V praxi tedy algoritmus vyšetření protilátek proti *T. gondii* a laboratorní interpretace získaného výsledku vypadá následovně. V případě středních a vysokých titrů (někdy na žádost gynekologa i nízkých titrů) v KFR jsou vyšetřeny i všechny tři třídy specifických imunoglobulinů. Při pozitivitě v KFR, IgG, IgM, IgA se jedná zcela jistě o akutní toxoplazmózu a ženu je nutno léčit. Avidita bývá zpravidla nízká. Při pozitivitě KFR, IgG, IgM a negativitě IgA se může jednat již o starší nákazu a terapie nemusí být indikována. V tomto případě nám velmi pomáhá index avidity. Každý případ je ale samozřejmě unikátní a musí se posuzovat individuálně [3; 14; 28; 29; 30]

Při péči o těhotné ženy, infikované toxoplazmovou infekcí, nejsou laboratorní vyšetření jedinými metodami, z jejichž výsledků gynekolog, infektolog někdy i genetik vycházejí a rozhodují o další péči o těhotnou ženu. Je nutná mezioborová spolupráce a v současné době jsou velmi často využívány také zobrazovací metody, které odborníkům umožňují sledovat aktuální vývoj plodu. Terapie je jedinou možností, jak v případě infekce ženy v graviditě plod ochránit. Ne vždy je ale stoprocentní.

I když v některých letech bylo vyšetření více než v předešlých, dlouhodobým trendem v počtu vyšetření onemocnění toxoplazmózy je značný úbytek stanovení. Otázkou zůstává, zda je tato skutečnost dána tím, že nákazy ubývá, a proto ji lékaři přestávají ordinovat nebo ji nepřikládají tak velký význam, či ženy nechťejí podstupovat vícero vyšetření, které jsou nad rámec povinných vyšetření v ČR.

Dle našich statistických zpracování je pozitivita stanovení stále vysoká, ovšem v akutní fázi je v roce 2021 méně případů, což značí, že těhotné ženy pravděpodobně prodělaly onemocnění před otěhotnění. Tím přestává být onemocnění toxoplazmózou ohrožujícím pro plod. Jinak tomu však bylo v předchozích letech, kdy více akutních onemocnění probíhalo přímo v těhotenství. Přesto se nejedná o pravidlo a je nutné stále kontrolovat šíření toxoplazmózy v populaci, a to především u gravidních žen. Postižení plodu může být velmi vážné s komplikovanou léčbou, včetně možnosti trvalých následků u novorozenců, proto je diagnostika toxoplazmózy v těhotenství stále velmi důležitá.

7 ZÁVĚR

Hlavním cílem práce bylo statistické zpracování počtu stanovení celkových protilátek proti *T. gondii* metodou KFR. Statisticky byly zpracovány výsledky získané metodou KFR z let 2011, 2013, 2015, 2017, 2019 a 2021. Podrobněji byly porovnány roky 2011 a 2021.

V roce 2011 bylo testováno 195 gravidních žen z toho pozitivně testováno bylo 51 % gravidních žen. V roce 2021 bylo testováno 161 gravidních žen z toho pozitivně testováno bylo 63 % gravidních žen. Počet vyšetření se tedy snížil, i když pozitivita vzrostla. Přesto ale nemůžeme konstatovat, že musela být nasazena léčba a mohlo dojít k poškození plodu, jelikož diagnóza je závislá na doplňujících vyšetření určujících třídu imunoglobulinů.

V roce 2011 byly výsledky titrů metodou KFR vyšší, nežli v roce 2021. To mohlo znamenat, že v roce 2011 bylo více případů gravidních žen s toxoplazmózou v akutní fázi. K poškození plodu může dojít, pokud u gravidní ženy probíhá onemocnění v akutní fázi. Jestliže je onemocnění v latentní fázi, plod není ohrožen. Míra poškození plodu také závisí na trimestru, v kterém probíhá akutní fáze onemocnění. Tento aspekt ovšem nebyl do statistického zpracování zahrnut, jelikož těmito daty mikrobiologická laboratoř nedisponuje.

Náplní práce bylo poukázat na snížený počet vyšetření během let, který může být zapříčiněn mnoha důvody, ale hlavně je způsobený nepovinným testováním těhotných žen na protilátky proti *T. gondii*. Počet vyšetřených pacientů na toxoplazmózu ubývá, ale to není známkou toho, že by pozitivních případů bylo méně.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ab	protilátka
Ag	antigen
AMA	apikální membránový antigen
Av	aviditní test
CNS	centrální nervový systém
ČR	Česká republika
CT	výpočetní tomografie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EIA	enzyme immunosorbent assay
ER	endoplazmatické retikulum
FN	fakultní nemocnice
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
I _{Av}	index avidity
I _g	imunoglobulin
IP	index positivity
KFR	komplement fixační reakce
MIC	mikronemový protein

n	normální test
NIFR	nepřímá imunofluorescence
PCR	polymerase chain reaction
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplazma gondii</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] JÍRA, Jindřich. *Lékařská Protozoologie: Protozoální nemoci*. 1. Praha: Galén, 2009, 567 s. ISBN 978-80-7262-381-5.
- [2] ROBERT-GANGNEUX, Florence a Marie-Laure DARDÉ. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2012, **2**(2), 264-296. ISSN 0893-8512. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11](https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11)
- [3] KOLÁŘOVÁ, Libuše. *Obecná a klinická mikrobiologie*. 1. Praha: Galén, 2020, 441 s. ISBN 978-80-7492-477-4.
- [4] GÖPFERTOVÁ, Dana a Petr PAZDIORA A KOL. *100 infekcí: (epidemiologie pro praxi)*. Vydání první. Praha: Triton, 2015. ISBN 978-80-7387-846-7.
- [5] MARŠOLKOVÁ, Kristýna, Juraj TIMKOVIČ, Veronika LESKOVÁ, Jan NĚMČANSKÝ a Hana WIEDERMANNOVÁ. Vrozená centrální chorioretinitida toxoplasmové etiologie - kazuistika. *Česká a slovenská oftalmologie* [online]. 2018, **74**(3), 114-118 [cit. 2022-04-22]. ISSN 1211-9059. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-slovenska-oftalmologie/2018-3-13/vrozena-centralni-chorioretinitida-toxoplasmove-etologie-kazuistika-106122>
- [6] SHAAELDIN, Mohamed, Sumeya KHIERI, Khalid NASRALLA, Zaheera SAADIA a Mohamed ALSAMMANI. Toxoplasmosis in Pregnancy: Diagnosis, Risk Factors, and Management. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research* [online]. 2018, **37**(3), 205-211 [cit. 2022-04-22].

ISSN 2307-4531. Dostupné z: <https://poliklinika-harni.hr/images/uploads/360/toksoplazmoza-u-trudnoci.pdf>

- [7] SEDLÁK, Kamil a Markéta TOMŠÍČKOVÁ. *Nebezpečné infekce zvířat a člověka*. 1. Praha: Scientia, 2006, 167 s. ISBN 80-86960-07-2.
- [8] Těhotenství a toxoplazmóza koček: pozor na steaky, ne na kočky. In: *Veterinární klinika* [online]. Praha: Martina Načeradská, 2014 [cit. 2022-04-25]. Dostupné z: <http://www.naceradska.cz/tehotenstvi-toxoplazmoza-kocek/>
- [9] DA SILVA, Marcos, Marina VINAUD a Ana DE CASTRO. Prevalence of toxoplasmosis in pregnant women and vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in patients from basic units of health from Gurupi, Tocantins, Brazil, from 2012 to 2014. *Ploese one* [online]. 2015, 1-15 [cit. 2022-01-28]. Dostupné z: [doi:10.1371/journal.pone.0141700](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141700)
- [10] STELZER, S., W. BASSO, J. BENAVIDES SILVÁNC, L.M ORTEGA-MORAD, P. MAKSIMOVA, J. GETHMANN, F.J. CONRATHSA a G. SCHARESA. *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. *Food and Waterborne Parasitology* [online]. 2019, **15**(12), 1-32 [cit. 2022-01-27]. Dostupné z: [doi:10.1016/j.fawpar.2019.e00037](https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00037)
- [11] SUN, X., H. LU a B. JIA. A comparative study of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in three healthy Chinese populations detected using native and recombinant antigens. *Parasites Vectors* [online]. 2013, **241**(6), 1-7 [cit. 2022-01-25]. Dostupné z: [doi:10.1186/1756-3305-6-241](https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-241)
- [12] ROZSYPAL, Hanuš. *Základy infekčního lékařství*. Vydání první. Praha: Karolinum, 2015. ISBN 978-80-246-2932-2.

- [13] ROZTOČIL, Aleš. *Moderní porodnictví*. 2. Praha: Grada, 2017. ISBN 978-80-247-5753-7.
- [14] GELENEKY, Markéta, Petr PRÁŠIL a Petr KODYM. *Doporučený postup pro diagnostiku a léčbu toxoplasmózy: Doporučený postup Společnosti infekčního lékařství České lékařské společnosti J. E. Purkyně* [online]. 1-16 [cit. 2022-01-03]. Dostupné z: <https://www.infekce.cz/DoporToxo17t.htm>
- [15] MACHALA, Ladislav, Petr KODYM a Rudolf ČERNÝ. *Toxoplazmóza. Interní medicína pro praxi* [online]. 2005, 120-122 [cit. 2022-01-28]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2005/03/03.pdf>
- [16] CAPOBIANGO, Jaqueline, Regina BREGANÓ, Itamar NAVARRO et al. *Congenital toxoplasmosis in a reference center of Paraná, Southern Brazil. The Brazilian Journal of INFECTIOUS DISEASES* [online]. 2014, **18**(4), 364-371 [cit. 2022-01-28]. Dostupné z: [doi:10.1016/j.bjid.2013.11.009](https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.11.009)
- [17] SVOZÍKOVÁ, Petra a KOLEKTIV. *Diagnostika a léčba očních zánětů*. 1. Praha: Maxdorf, 2014. ISBN 978-80-7345-391-6.
- [18] KHAN, Amjad a Rahmah NOORDIN. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases volume: Serological and molecular rapid diagnostic tests for Toxoplasma infection in humans and animals* [online]. 2020, [cit. 2022-01-04]. Dostupné z: [DOI:https://doi.org/10.1007/s10096-019-03680-2](https://doi.org/10.1007/s10096-019-03680-2)
- [19] FLEGR, Jaroslav, Joseph PRANDOTA, Michaela SOVIČKOVÁ a Zafar ISRAILI. *Toxoplasmosis – A Global Threat. Correlation of Latent Toxoplasmosis with Specific Disease Burden in a Set of 88 Countries. PLOS ONE* [online]. 2014, **9**(3), 1-22 [cit. 2022-01-04]. Dostupné z: [doi:10.1371/journal.pone.0090203](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090203)

- [20] SEIDL, Zdeněk a Manuela VANĚČKOVÁ. *Diagnostická radiologie: neurologie*. 1. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4546-6.
- [21] *INFEKČNÍ SÉROLOGIE – Parazitologie: Toxoplasma gondii* [online]. In: . s. 1-8 [cit. 2022-01-31]. Dostupné z: https://www.testlinecd.cz/file/108/TOXOPLASMA_CZ_2021.pdf?version=202104131327
- [22] BOŠTÍKOVÁ, Vanda, Petr PRÁŠIL, Miloslav SALAVEC a Pavel BOŠTÍK. Vybrané virové a bakteriální perinatálně přenosné infekce: 3. část: Toxoplazmóza. *Pediatric pro praxi* [online]. 2016, **17**(2), 77-79 [cit. 2022-02-10]. Dostupné z: doi:10.36290/ped.2016.016
- [23] RŮŽIČKA, Evžen. *Neurologie*. 2. Praha: Triton, 2021. ISBN 978-80-7553-908-3.
- [24] STRHÁRSKY, J., L. MAĐAROVÁ a C. KLEMENT. Laboratorná diagnostika toxoplazmózy. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie* [online]. 2009, **58**(2), 51-62 [cit. 2022-02-07]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/epidemiologie/2009-2/laboratorna-diagnostika-toxoplazmozy-4681>
- [25] *Návod pro použití: TOXO - CF - Ag lyophil*. 2021.
- [26] HURYCH, Jakub a Roman ŠTÍCHA. *Lékařská mikrobiologie - repetitorium - 2. vydání*. 2. Praha: Triton, 2021, 488 s. ISBN 978-80-7553-900-7.
- [27] AMLEROVÁ, Jana. Výukový materiál: Imunologie. In: *Imunologie* [online]. Ostrava: <http://www.vovcr.cz>, 2020 [cit. 2022-03-14]. Dostupné z: <https://www.vovcr.cz/odz/zdrav/187/page49.html>

- [28] *TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.: EIA Toxoplasma IgG* [online]. In: . 2021 [cit. 2022-04-14]. Dostupné z: <https://www.testlinecd.cz/eia-toxoplasma-igg>
- [29] *TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.: EIA Toxoplasma IgM* [online]. In: . 2021 [cit. 2022-04-14]. Dostupné z: <https://www.testlinecd.cz/eia-toxoplasma-igm>
- [30] *TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.: EIA Toxoplasma IgA* [online]. In: . 2021 [cit. 2022-04-14]. Dostupné z: <https://www.testlinecd.cz/eia-toxoplasma-iga>
- [31] FAJFRLÍK, Karel. přednosta Ústavu mikrobiologie [ústní sdělení]. Plzeň, 2.5. 2022.
- [32] KODYM, Petr a Markéta GELENEKY. Prevence, diagnostika a léčba toxoplazmózy v graviditě. *Actual gyn* [online]. 2012, **4**, 31-38 [cit. 2022-04-23]. Dostupné z: https://www.actualgyn.com/pdf/cz_2012_69.pdf
- [33] *SZÚ - Epidat 2012 -2017, ISIN 2018 - 2021: Výskyt vybraných hlášených infekcí v České republice nemocnost na 100 000 obyvatel v letech 2012-2021* [online]. In: . 2022 [cit. 2022-04-25]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/szu/infekce/2021/tabulka_nemocnost_2021.pdf
- [34] BOUDAOUARA, Yosr, Karim AOUN, Rania MAATOUG, Olfá SOUISSI, Aïda BOURATBINE a Rym ABDALLAH. Congenital Toxoplasmosis in Tunisia: Prenatal and Neonatal Diagnosis and Postnatal Follow-up of 35 Cases. *The American journal of tropical medicine and hygiene* [online]. 2018, **98**(6), 1722-1726 [cit. 2022-04-22]. Dostupné z: doi:10.4269/ajtmh.17-0580

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Životní cyklus <i>T. gondii</i> [8].....	16
Obrázek 2 – Mikrotitrační destička s KFR reakcí vzorků, s pozitivní a negativní kontrolou [vlastní zdroj]	32
Obrázek 3 – Protilátková odpověď v čase [30]	42
Obrázek 4 – Celkový počet vyšetření metodou KFR mezi lety 2011 až 2021 [vlastní zdroj].....	44
Obrázek 5 – Počet vyšetřených osob metodou KFR mezi lety 2011 až 2021 [vlastní zdroj].....	44
Obrázek 6 – Počet celkových vyšetření metodou KFR dle pohlaví v letech 2011 a 2021 [vlastní zdroj].....	45
Obrázek 7 – Počet vyšetřených osob metodou KFR dle pohlaví v letech 2011 a 2021 [vlastní zdroj].....	45
Obrázek 8 – Celkový počet vyšetření gravidních žen metodou KFR v letech 2011, 2015, 2019 a 2021 [vlastní zdroj]	46
Obrázek 9 – Počet gravidních žen vyšetřovaných metodou KFR v letech 2011 až 2021 [vlastní zdroj].....	47
Obrázek 10 – Porovnání celkového počtu vyšetření metodou KFR a z toho vyšetření gravidních žen v letech 2011 a 2021 [vlastní zdroj].....	48
Obrázek 11 – Počet vyšetřovaných žen metodou KFR se zaměřením na graviditu v letech 2011 a 2021 [vlastní zdroj]	49
Obrázek 12 – Počet negativních a pozitivních vzorků dle titrů u gravidních žen stanovených metodou KFR v roce 2011 [vlastní zdroj]	50
Obrázek 13 – Počet negativních a pozitivních vzorků dle titrů u gravidních žen stanovených metodou KFR v roce 2021 [vlastní zdroj].....	51
Obrázek 14 – Počet pozitivně testovaných a negativně testovaných gravidních žen z celkového počtu 195 testovaných gravidních žen metodou KFR v roce 2011 [vlastní zdroj].....	52

Obrázek 15 – Počet pozitivně testovaných a negativně testovaných gravidních žen z celkového počtu 161 testovaných gravidních žen metodou KFR v roce 2021 [vlastní zdroj]..... 53

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 - Počty vyšetření metodou KFR z let 2011 až 2021 [vlastní zdroj]	43
--	----

12 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 – Souhlas s poskytováním informací	71
--	----

Přílohy

Příloha 1 – Souhlas s poskytováním informací



Vážená paní
Markéta Kepková
Studentka oboru Zdravotní laborant
Fakulta biomedicínského inženýrství – Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva
České vysoké učení technické v Praze

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se získáváním / zpracováním anonymizovaných informací o laboratorních metodách, používaných na pracovišti Ústavu mikrobiologie (MIKRO) FN Plzeň. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „Toxoplazmóza u těhotných žen a metody její laboratorní diagnostiky“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Přednosta MIKRO souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.**
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být zcela anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je **pan RNDr. Karel Fajfrlík, Ph.D., přednosta MIKRO FN Plzeň.**

Po zpracování Vámi zjištěných údajů **poskytnete** zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová
manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP
zástupkyně náměstkyně pro oš. péči

Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň
tel.: 377 103 204, 377 402 207
e-mail: chabrovass@fnplzen.cz

7. 4. 2022