

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Marko KOLENC

**PRIMERJAVA DVEH METOD ZA UGOTAVLJANJE PROTITELES
IgG AVIDNOSTI PROTI *Toxoplasma gondii***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF TWO METHODS FOR DETERMINATION OF
THE AVIDITY OF IgG ANTIBODIES TO *Toxoplasma gondii***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij in v Laboratoriju za parazitologijo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija študija mikrobiologije je za mentorja diplomske naloge imenovala doc. dr. Miroslava Petrovca, za somentorja prof. dr. Jerneja Logarja in za recenzentko prof. dr. Tatjano Avšič Županc.

Mentor: doc.dr. Miroslav Petrovec, dr. med.

Somentor: prof. dr. Jernej Logar, univ. dipl. biol.

Recenzentka: prof. dr. Tatjana Avšič Županc, univ. dipl. biol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur Bertok, univ.dipl.biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Miroslav Petrovec, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: prof. dr. Jernej Logar, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Tatjana Avšič Županc, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Marko Kolenc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 577.336.08: 616.993(043)=163.6
KG serološki testi/ mikrobiološke tehnike/ *Toxoplasma gondii*/ toksoplazmoza/ avidnost protiteles IgG / fluorescenčni testi/ občutljivost diagnostičnih metod/ diagnostični komplet BEIA Toxo IgG avidity/ aparat Liaison
AV KOLENC, Marko
SA PETROVEC, Miroslav (mentor) / LOGAR, Jernej (somentor) / AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2009
IN PRIMERJAVA DVEH METOD ZA UGOTAVLJANJE PROTITELES IgG AVIDNOSTI PROTI *Toxoplasma gondii*
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 51 str., 16 pregl., 2 sl., 1 pril., 29 vir.
IJ SI
JI sl/en
AI V diplomski nalogi smo primerjali in ovrednotili dve diagnostični metodi za določanje avidnosti protiteles IgG proti parazitu *Toxoplasma gondii*. Z določanjem avidnosti specifičnih protiteles IgG lahko bolj natančno, kot z ostalimi serološkimi testi (za določanje protiteles IgG in IgM) določimo čas okužbe s toksoplazmami. Metodo BEIA Toxo IgG avidity smo primerjali z avtomatiziranim sistemom Liaison. Z obema metodama smo v obdobju od septembra 2007 do januarja 2008 pregledali 82 serumov nosečnic. Vzorce smo zbirali na osnovi serološkega statusa protiteles IgG in IgM. Rezultate obeh metod smo med seboj primerjali in ugotavljali odstotek ujemanja med obema testoma. Skladen rezultat smo ugotovili pri 62 (75,6 %) vzorcih, do neujemanja pa je prišlo pri 20 (24,4 %) vzorcih. Za sistem Liaison smo ugotovili 100 % občutljivost in 95,5 % specifičnost. Za test BEIA Toxo IgG avidity pa 85 % občutljivost in 100 % specifičnost. Ker že z rezultati testiranja na toksoplazemska protitelesa razredov IgG in IgM v nosečnosti razmeroma zanesljivo opredelimo svežo okužbo, menimo, da sta obe metodi za določanje avidnosti protiteles IgG proti *T. gondii* primerni za dopolnilno diagnostiko kongenitalne toksoplazmoze.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 577.336.08: 616.993(043)=163.6
- CX serologic tests/ microbiological techniques/ *Toxoplasma gondii*/
toxoplasmosis/ IgG avidity index/ fluorescent tests/ sensitivity of diagnostic
methods/ BEIA Toxo IgG avidity assay/ Liaison analyser
- AU KOLENC, Marko
- AA PETROVEC, Miroslav (supervisor) / LOGAR, Jernej (co-advisor) / AVŠIČ
ŽUPANC, Tatjana (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
- PY 2009
- TI COMPARISON OF TWO METHODS FOR DETERMINATION OF THE
AVIDITY OF IgG ANTIBODIES TO *Toxoplasma gondii*
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO IX, 51 p., 16 tab., 2 fig., 1 app., 29 ref.
- LA SI
- AL sl/en
- AB The objective of our task was to test and evaluate two diagnostic methods for
determination of the avidity of IgG antibodies against protozoan *Toxoplasma
gondii*. By determination of the avidity of IgG antibodies we can more
precisely estimate the time of infection with toxoplasmosis, as with other
serological tests (for determination of IgG, IgM antibodies). We compared the
diagnostic kit BEIA Toxo IgG avidity with the automated system Liaison. In
the period from September 2007 to January 2008 we have examined 82 sera
from pregnant women. The samples were collected on the basis of the
serological status of IgG and IgM antibodies. We compared the results of both
methods and determinate the percentage of matches and discrepancy between
the two tests. We found a matching result in 62 (75.6 %) samples, the
discrepancy has occurred in 20 (24.4 %) samples. The Liaison system had 100
% sensitivity and 95.5 % specificity. Test BEIA Toxo IgG avidity had 85 %
sensitivity and 100 % specificity. While the test results of IgG and IgM
specific antibodies against *T. gondii* already show rather strong possibility of
the first infection, we believe that both methods for determining the avidity of
IgG antibodies against *T. gondii* are suitable for complementary diagnosis of
congenital toxoplasmosis.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	II
KEY WORDS DOCUMENTATION	III
KAZALO VSEBINE	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO PRILOG	IX
1 UVOD	1
1.1 Namen dela.....	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 <i>Toxoplasma gondii</i>.....	2
2.2 Oblike in življenjski krog parazita.....	3
2.2.1 Oocista in sporozoiti.....	3
2.2.2 Tahizoiti.....	3
2.2.3 Bradioziti in tkivna cista	4
2.2.4 Življenjski krog.....	4
2.3 Epidemiologija in prenos	6
2.4 Patogeneza in imunski odziv.....	7
2.5 Klinična slika.....	8
2.5.1 Toksoplazmoza pri ljudeh z normalnim imunskim odzivom	8
2.5.2 Očesna toksoplazmoza	8
2.5.3 Toksoplazmoza pri imunsko oslabljenih	9
2.5.4 Kongenitalna toksoplazmoza.....	9
2.6 Preprečevanje in zdravljenje.....	10
2.7 Diagnoza	11
2.7.1 Posredne serološke tehnike.....	12
2.7.1.1 Barvanje po Sabin Feldmanu.....	14
2.7.1.2 Direktni aglutinacijski test.....	14
2.7.1.3 Lateksna aglutinacija	14
2.7.1.4 Encimsko imunski test (ELISA).....	15
2.7.1.5 Imunski aglutinacijski test (ISAGA)	15
2.7.1.6 Western blotting (WB)	15
2.7.2 Neposredne tehnike	16

2.7.2.1	Histološke tehnike	16
2.7.2.2	Osamitev parazita	16
2.7.2.3	Molekularne tehnike	17
2.7.3	Interpretacija rezultatov diagnostičnih tehnik	18
2.8	Presejalno testiranje	20
2.8.1	Potek presejalnega testiranja na <i>Toksoplasma gondii</i> v Sloveniji	21
2.9	Test avidnosti protiteles IgG	22
3	MATERIAL IN METODE	26
3.1	Vzorci	26
3.2	Metode	26
3.2.1	BEIA Toxo IgG avidity	27
3.2.1.1	Princip metode	27
3.2.1.2	Vrednotenje rezultatov	28
3.2.2	Diagnostični sistem Liaison	28
3.2.2.1	Princip metode	29
3.2.2.2	Vrednotenje rezultatov	30
3.3	<i>recomLine Toxoplasma IgG avidity</i>	30
3.3.1	Princip metode	32
3.3.2	Vrednotenje in interpretacija rezultatov	32
3.3.2.1	Vrednotenje rezultatov protiteles IgG	33
3.3.2.2	Vrednotenje rezultatov avidnosti	34
3.3.2.3	Interpretacija rezultatov	34
3.4	Izračun občutljivosti in specifičnosti testov	35
4	REZULTATI	36
4.1	Tolmačenje rezultatov z metodo <i>recomLine</i>	37
4.2	Izračun občutljivosti in specifičnosti testov	40
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	41
5.1	Sklepi	45
6	POVZETEK	47
7	VIRI	49
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 2. 1: Razlaga seroloških testov IgG in IgM proti <i>T. gondii</i> pri odraslih ljudeh (Jones in sod., 2001).	18
Preglednica 2. 2: Možnosti izvajanja presejalnega testiranja na okužbo s <i>T. gondii</i> glede na populacijo (Holliman, 1995).	21
Preglednica 2. 3: Načela presejalnega testiranja (Holliman, 1995).	21
Preglednica 2. 4: Vrednosti toxo-IgG avidnosti pri nosečnicah z različnim imunskim statusom (Logar in sod., 1999).	24
Preglednica 3. 1: Redčitve vzorcev pri testu BEIA Toxo IgG Avidity.	27
Preglednica 3. 2: Rekombinantni antigeni uporabljeni pri testu <i>recomLine</i> Toksoplazma.	31
Preglednica 3. 3: Vrednotenje točk <i>T. gondii</i> antigenov za protitelesa IgG pri testu <i>recomLINE</i>	33
Preglednica 3. 4: Vrednotenje testa za protitelesa IgG pri testu <i>recomLine</i>	33
Preglednica 3. 5: Običajni rezultati testa <i>recomLine</i> pri ugotavljanju avidnosti.	34
Preglednica 4. 1: Primerjava vrednosti oz. deležev avidnosti testa BEIA Toxo IgG Avidity in sistema Liaison.	36
Preglednica 4. 2: Ujemanje rezultatov avidnosti testa BEIA Toxo IgG Avidity in sistema Liaison.	36
Preglednica 4. 3: Križna tabela – primerjava rezultatov BEIA Toxo IgG Avidity in sistema Liaison.	37
Preglednica 4. 4: Vrednosti protiteles IgG, IgM in avidnosti pri katerih je prišlo do neujmanja metode BEIA Toxo IgG Avidity (visoka avidnost) in metode Liaison (nizka avidnost).	38
Preglednica 4. 5: Vrednosti IgG avidnosti neujemajočih vzorcev s tremi testi (testom BEIA Toxo IgG Avidity, sistemom Liaison in testom <i>recomLine</i>).	39
Preglednica 4. 6: Primerjava rezultatov avidnosti IgG obeh metod (testa BEIA Toxo IgG Avidity in sistema Liaison) po testiranju z <i>recomLine</i> testom.	39

Preglednica 5. 1: Primerjava rezultatov VIDAS testa IgG avidnosti in TSP rezultatov za 132 serumov nosečnic (Montoya in sod., 2002).....	42
---	----

KAZALO SLIK

Slika 1: Življenjski krog parazita <i>Toksoplasma gondii</i> (Logar, 1999).	5
Slika 2: Testni trak <i>recomLine</i> Toxoplasma IgG, IgM, IgA.....	32

KAZALO PRILOG

Priloga A: Seznam vzorcev in rezultatov vzorcev, ki smo jih testirali z metodami BEIA Toxo IgG avidity ELISA, Liaison Toxo IgG Avidity II CLIA in Mikrogen <i>recomLine</i> Toxoplasma IgG Avidity na avidnost protiteles IgG proti <i>T. gondii</i>	2
---	---

1 UVOD

Toksoplazmoza, ki jo povzroča pražival *Toxoplasma gondii*, je ena izmed najbolj pogostih parazitskih okužb človeka. Človek se lahko okuži s parazitom pred rojstvom ali po rojstvu. Zdravju nevarna je predvsem okužba pred rojstvom, t.i. kongenitalna toksoplazmoza. Do kongenitalne toksoplazmoze pride, ko se nosečnica prvič okuži s *T. gondii* v nosečnosti in parazit po krvnem obtoku doseže in okuži plod. Toksoplazma povzroča poškodbe oči in možganov, kar lahko vodi do hudih poškodb ploda ali celo do njegove smrti. Človek se ponavadi okuži z hrano ali vodo onesnaženo z mačjimi iztrebki, ki vsebujejo oociste parazita ali z zaužitjem mesa, ki je okuženo s tkivnimi cistami te praživali.

Kongenitalno toksoplazmozo lahko preprečimo s presejalnim testiranjem serumov nosečnic na toksoplazmozo trikrat v nosečnosti. V Sloveniji smo obvezno presejalno testiranje nosečnic na toksoplazmozo uvedli leta 1995. V primeru pozitivnega rezultata presejalnega testiranja, sum na primarno svežo okužbo potrdimo ali ovržemo z določanjem avidnosti protiteles IgG. Z določanjem IgG avidnosti pri akutni bolezni lahko ovržemo prvo okužbo v času nosečnosti oziroma ugotovimo ali je do okužbe prišlo pred zanositvijo. Na ta način lahko izključimo staro oz. latentno okužbo, ki ne predstavlja nevarnosti za plod.

1.1 Namen dela

V diplomskem delu smo primerjali učinkovitost dveh metod za določanje avidnosti protiteles IgG. Primerjali smo rezultate, ki smo jih dobili s testom BEIA Toxo IgG avidity (S.p.A. Italiana Laboratori Bouty, Milano, Italija), z avtomatiziranim diagnostičnim sistemom Liaison (DiaSorin, Sallugia, Italija). Testirali smo 81 serumov, ki so po predhodnem rutinskem testiranju na protitelesa proti *T. gondii* pokazali pozitiven rezultat na specifična protitelesa IgG in IgM. Poskušali smo ugotoviti, kako se rezultati obeh metod skladajo oziroma razlikujejo oz. poskušali ugotoviti katera metoda je boljša za potrjevanje primarne akutne toksoplazemske okužbe v nosečnosti. Serume, ki so pokazali neujemajoče rezultate smo dodatno testirali s testom imunoblot *recomLine Toxoplasma IgG Avidity* (Mikrogen, Neuried, Nemčija).

2 PREGLED OBJAV

2.1 *Toxoplasma gondii*

Parazita *T. gondii* sta v Tunisu prvič opisala leta 1908 Nicolle in Manceaux v tkivu severnoafriškega glodavca *Ctenodactylus gundi*, istočasno ga je v Braziliji odkril Splendor v tkivu zajca. Njegov medicinski pomen so ugotovili leta 1939, ko so *T. gondii* izolirali iz tkiva kongenitalno okuženega otroka. Odkritje barvanja po Sabin-Feldmanu leta 1948 je vodilo do spoznanja, da je *T. gondii* pogost parazit v toplokrvnih gostiteljih in da je razširjen po vsem svetu. Prve toksoplazmoze je žive osamil Wikerhauser s sodelavci iz svinjine leta 1983. (Dubey, 2008; Kim in Weiss, 2008) Pri nas so prvi klinični primer toksoplazmoze ugotovili pri otroku leta 1953 (Wikerhauser in Brglez, 1996).

Toxoplasma gondii je znotrajcelični parazit, ki ga uvrščamo med praživali. Spada v deblo *Apicomplexa*, razred *Coccidia*. Pojavlja se v več oblikah: oocisti, tahizoitu in cisti. Ima haploiden genom, razen med spolno delitvijo v mačkah. Genom vsebuje 8×10^7 baznih parov (Montoya in Liesenfeld, 2004).

Večino izolatov *T. gondii* lahko razdelimo v 3 osnovne genotipe: I, II in III. Kongenitalno toksoplazmozo povzročata genotipa I in II. Večina izolatov iz bolnikov okuženih z aidsom spada v genotip I. Genotip III je najpogostejši povzročitelj bolezni pri živalih. Nizki genetski polimorfizem je posledica možnosti samooploditve v mački, med moško in žensko gameto istega genotipa (Montoya in Liesenfeld, 2004).

Patogenost okužbe s parazitom močno niha med posameznimi vrstami. Lahko se kaže kot okužba brez bolezenskih znakov ali bolezen s smrtnim izidom. Končni gostitelj parazita je mačka. Okužba je zelo razširjena med farmskimi živalmi kot so: ovce, koze in prašiči. Bolezen je najbolj nevarna za avstralske vrečarje, kot sta kenguru (*Macropus fuliginosus*) in koala (*Phascolarctos cinereus*). Zelo nevarna je tudi za opice Novega Sveta. Poročajo tudi o smrtnih primerih med populacijo pingvinov (Elizabeth, 1997).

Približno polovica človeške populacije je okužena s *T. gondii*. Pri imunsko neprizadetih posameznikih se okužba s *T. gondii* navadno kaže brez bolezenskih znakov. Parazit se s krvnim obtokom in limfnim sistemom razširi v več organov; npr. v skeletne in srčno

mišico ter v osrednje živčevje. Parazit in imunski sistem pri človeku dosežeta ravnovesje, ko se parazit encistira in nato doživljensko ostane v gostitelju (Mehlhorn in sod., 2008).

Okužba s *T. gondii* je postala ena od najbolj pogostih oportunističnih okužb pri bolnikih z aidsom. Toksoplazmoza pri bolniki z aidsom je navadno rezultat reaktivacije latentne okužbe (Dubey in sod., 1998).

T. gondii je postal modelni organizem za raziskovanje znotrajceličnih povzročiteljev bolezni in je najboljši modelni sistem za raziskovanje biologije organizmov, ki jih uvrščamo v deblo *Apicomplexa*. Z razliko večine organizmov iz debla *Apicomplexa*, je *T. gondii* najbolj pripraven za gensko manipulacijo v laboratoriju. Za raziskovanje ima na razpolago veliko celičnih markerjev in ga lahko opazujemo pod mikroskopom z uporabo naprednih mikroskopskih tehnik. Z njegovo pomočjo se je spremenilo naše razumevanje mehanizmov rezistence proti zdravilom, biologije apikoplasta in procesov vstopa v gostiteljsko celico. Novejše študije genskega sekveniranja so dale vpogled v presenetljive razlike v celični biologiji in metabolizmu med organizmi debla *Apicomplexa* (Kim in Weiss, 2004).

2.2 Oblike in življenjski krog parazita

2.2.1 Oocista in sporozoiti

Nesporulirana oocista je sferične oblike, velika med 10-12 μm . Sporulacija se zgodi po 1 do 5 dni po izločanju oocist. Vsaka oocista vsebuje 2 elipsoidni sporocisti v velikosti 6-8 μm . V sporocistah se nahajajo 4 sporozoiti (Dubey in sod., 1998).

Oocista je posledica spolnega razmnoževanja protozoja znotraj črevesja mačke. Med akutno okužbo mačka s fecesom izloča več milijonov oocist na dan. Po nekaj dnevih oocista postane kužna za človeka ali žival, ki se lahko okužita z njenim zaužitjem. Oocista lahko v vlažnem okolju preživi tudi več kot eno leto. Lahko jo uničimo z segrevanjem. Slabo je odporna v okolju z mrzlim in suhim podnebjem (Montoya in Liesenfeld, 2004).

2.2.2 Tahizoiti

Tahioziti je oblika parazita, ki se hitro deli znotraj celic vmesnega gostitelja in v nečrevesnih epitelih končnega gostitelja. Tahoziti imajo polmesečasto oz. ovalno

obliko in so 2 – 4 μm široki in 4 – 8 μm dolgi. Vstopijo lahko v katerikoli tip celic. Tahizoit vsebuje različne celične organele in inkluzijska telesa.

V celice vstopijo z aktivno penetracijo in oblikujejo citoplazemsko vakuolo, imenovano parazitoforma vakuola. Po večkrat ponovljenem podvojevanju in po sprostitvi iz uničene gostiteljske celice, se tahioziti razširijo po organizmu s pomočjo krvnega obtoka in okužijo tkiva kot so: osrednje živčevje, oči, skeletne in srčno mišico ter posteljico. Tahioziti lahko preko posteljice preidejo na plod in povzročijo kongenitalno toksoplazmozo. Redko tahioziti povzročajo okužbe s krvno transfuzijo in okužbe v laboratorijih.

Zaradi imunskega sistema se tahiozidi pretvorijo v bradizoite in nato cisto (Dubey in sod., 1998; Mehlhorn in sod., 2008).

2.2.3 Bradioziti in tkivna cista

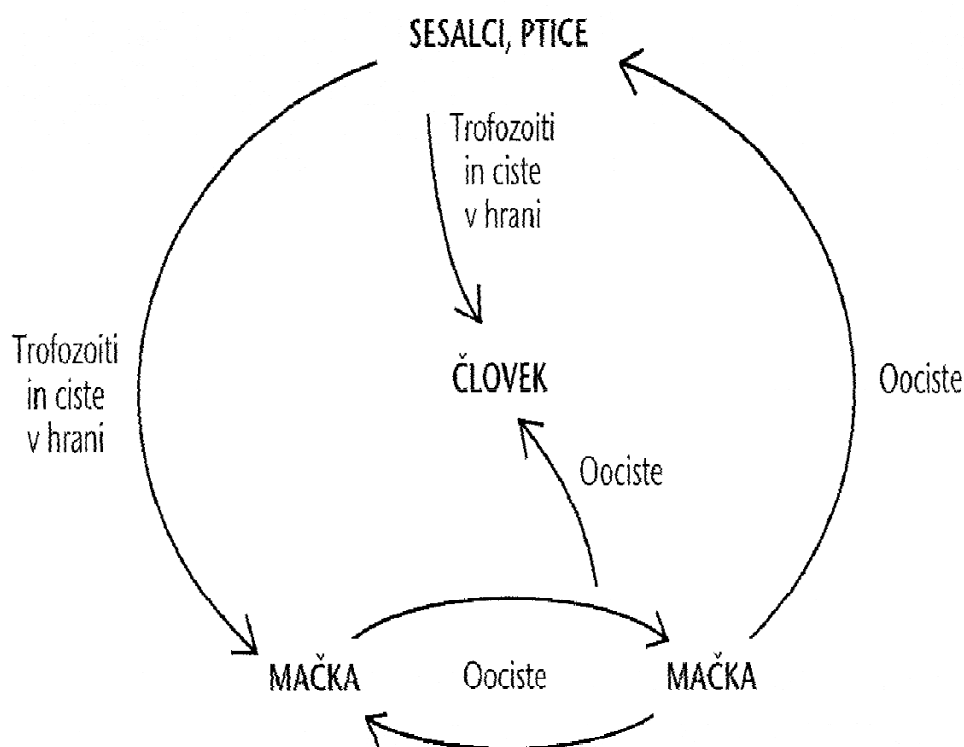
Bradioziti se nahajajo znotraj tkivne ciste, kjer se počasi delijo. So latentna oblika parazita. Morfološko so enaki tahiozitom. Bradizoite imenujemo tudi cistozoiti. Bradioziti se lahko sprostijo iz ciste in se transformirajo nazaj v tahiozite ter povzročijo ponovno okužbo pri imunsko prizadetih osebah (Montoya in Liesenfeld, 2004).

Ciste so lahko različnih velikosti, odvisno od starosti. Mlade ciste so majhne, do 5 μm in vsebujejo samo 2 bradizoita, starejše pa lahko dosežejo do 100 μm in vsebujejo več sto bradizoitov. Ciste se tvorijo v živčnem in mišičnem tkivu, redkeje v pljučih, ledvicah in jetrih. Ciste so kužna oblika parazita za končnega ali vmesne gostitelje (Dubey in sod., 1998).

2.2.4 Življenjski krog

Življenjski krog *T. gondii* se začne v črevesnem epiteliju mačke, ki se okuži z zaužitjem sporulirane oociste, pseudociste ali tkivne ciste v mesu različnih vmesnih gostiteljev. Toksoplazme se v njenem črevesju razmnožujejo nespolno z endodiogenijo in shizogonijo ter spolno z gametogonijo. Pri nespolnem razmnoževanju nastanejo shizonti iz katerih lahko nastanejo moške in ženske gamete. Oociste nastanejo z združitvijo gamet. Nesporulirane oociste nato mačka izloča z fecesom. Sporulacija se zgodi izven končnega gostitelja. Oociste lahko v okolju širijo različni organizmi kot so muhe in ščurki. Vmesni gostitelj lahko zaužije oocisto iz katere se v črevesju sprostijo sporozoiti in vdrejo v črevesne epitelne celice. Sporozoiti v vmesnem gostitelju ne morejo zaključiti

reprodukcijskega kroga, zato vstopijo v nespolni cikel pri katerem se tvorijo trofozoiti (tahizoiti). Znotraj gostiteljskih celic se parazit razmnožuje z endodiogenijo. Nastane pseudocista, ki vsebuje merozoite oz. tahizoite. Ovojnica pseudociste oziroma parazitoforme vakuole je gostiteljskega in parazitskega izvora in se tako izogne uničenju z lizosomi gostitelja. Ko se pseudocista razpoči se tahizoiti sprostijo in razširijo po krvnem obtoku ali limfi. Zaradi neznanih dejavnikov, verjetno tudi zaradi imunskega odziva gostitelja, pride do tvorbe tkivnih cist, znotraj katerih se z endodiogenijo razmnožujejo merozoiti oz. bradizoiti. Do te latentne nespolne faze pride 8 dni po okužbi. Tkivne ciste lahko poleg končnega gostitelja zaužije tudi vmesni gostitelj, pri katerem se ponovi krog nespolnega razmnoževanja z endodiogenijo znotraj pseudociste. Mačke se lahko okužijo s pseudocisto ali tkivno cisto vmesnega gostitelja (Logar, 1999; Mehlhorn in sod., 2008). Mehanizem reaktivacije toksoplazmoze ni poznan. Ni znano ali lahko bradizoiti starejših tkivnih cist sami ustvarijo nove tkivne ciste ali se morajo najprej preobraziti v tahizoite. To je pomembno iz vidika zdravljenja, saj so tahizoiti dosti bolj dovzetni na zdravila kot bradizoiti (Dubey, 1998).



Slika 1: Življenjski krog parazita *Toxoplasma gondii* (Logar, 1999).

2.3 Epidemiologija in prenos

Toksoplazmoza je razširjena po celem svetu med rastlinojedimi in mesojedimi živalmi ter pri človeku. Seroprevalenca okužbe s *T. gondii* narašča z leti in se ne razlikuje med spoloma. Do serokonverzije ponavadi pride med 15 in 35 letom starosti. Seroprevalenca se niža z nadmorsko višino; nižja je v mrzlih regijah ter vročih in suhih področjih. Globalno se incidenca okužbe spreminja glede na populacijo in geografsko območje. V El Salvadorju je tako kar 75 % prebivalcev seropozitivnih, medtem ko je seroprevalenca v Združenih državah Amerike 22,5 %. (Montoya in Liesenfeld, 2004) V ZDA je približno 225.000 primerov bolezni letno, 5000 hospitalizacij in 750 smrti zaradi okužbe s toksoplazmozo; prizadetih je 400 – 4000 novorojenčkov (Kravetz in Federman, 2005).

Zelo nizka je prevalenca v Jugo-vzhodni Aziji in na Japonskem, manj kot 10 %. V Indiji in na Srednjem Vzhodu se prevalenca okužb giblje med 20 in 30 %.

Okužba v tropskih Afriških in Ameriških deželah je večinoma posledica zaužitja oociste, kjer je prevalenca v vlažnih regijah tudi do 80 %.

Prekuženost s toksoplazmozo v srednji Evropi je med 50 – 60 %. Manjša je prekuženost v skandinavskih deželah in Angliji, večja pa v Franciji in Nemčiji.

V Sloveniji so s serološkimi preiskavami odkrili, da je prekuženost žensk v rodni dobi iz 52 % v 80. letih padla na 37 % v devetdesetih letih.

V nekaterih razvitih državah se seroprevalenca vztrajno niža zadnjih nekaj desetletij. S padanjem števila prekuženih žensk pa se je povečala populacija potencialno ogroženih žensk za prvo okužbo s *T. gondii* med nosečnostjo in razvoj kongenitalne toksoplazmoze (Logar, 1999).

Prenos *Toxoplasma gondii*

Človek se najpogosteje okuži z zaužitjem mesa, ki je okuženo s tkivnimi cistami parazita. Ciste so ponavadi v prašičjem, ovčjem in kozjem mesu, redko v govejem mesu in perutnini. Bradizoite lahko najdemo v 8 % govejega mesa in 20 % prašičjega in ovčjega mesa. Raziskava, ki so jo v Beogradu naredili pri rizični skupini žensk (v času nosečnosti ali pred nosečnostjo) je pokazala, da je bil edini vir okužbe s *T. gondii*, posledica uživanja okuženega in premalo obdelanega mesa (Kravetz in Federman, 2005).

Ciste v mesu lahko uničimo s kuhanjem mesa pri 67 °C ali zmrzovanjem pri manj kot -12 °C, uničuje jih tudi ionizacijsko sevanje (Wikerhauser in Brglez, 1996). Poročajo celo o okužbah zaradi uživanja svežega nepasteriziranega mleka koz (Ho-Yen, 1990). Do okužbe pride tudi z zaužitjem oociste v vodi in hrani onesnaženi z mačjimi iztrebki. Razlike v seroprevalenci so povezane s prehranskimi navadami in higieno določene populacije, kar kaže na dejstvo, da do večine okužb s parazitom pride po oralni poti. Zaenkrat še niso ugotovili prenosa okužbe med ljudmi, razen v primeru kongenitalne okužbe. Do sveže okužbe ali reaktivacije bolezni lahko pride tudi pri transplantaciji organov. Prenos bolezni se zgodi med seropozitivnim darovalcem in seronegativnim prejemnikom organa. Zelo redki so primeri prenosa parazita s transfuzijo krvi. Poročajo tudi o okužbah laboratorijskih delavcev z okuženimi živalmi, kontaminiranimi iglami in steklovino (Montoya in Liesenfeld, 2004).

2.4 Patogeneza in imunski odziv

Potek bolezni pri ljudeh in živalih je odvisen od velikosti inokuluma, virulence organizma, genetskega ozadja, spola in imunskega stanja. Toksoplazma ne proizvaja toksinov. Parazit vstopi v črevesne epitelne celice ali pa ga te fagocitirajo. Prvi korak vstopa je proces prepoznave in vezave na tarčno celico. Pri vezavi sodeluje eden glavnih površinskih beljakovin parazita, SAG-1. Znotraj celice *T. gondii* inducira nastanek parazitoforne vakuole, ki vsebuje izločene proteine parazita in izloči proteine gostiteljske celice, ki so odgovorne za dozorevanje fagosoma in s tem prepreči zlitje z lizosomom (Montoya in Liesenfeld, 2004).

Od imunskega sistema gostitelja je odvisno kako bo potekala okužba s *T. gondii*. Okužba sproži aktivacijo celic T pomagalk, ki izločajo vnetne citokine kot so interleukin 12 (IL-12), interferon γ (IFN- γ) in nekrozni tumorski faktor α (TNF- α). Delovanje teh citokinov in ostalih mehanizmov imunskega sistema zaščiti gostitelja proti hitremu pomnoževanju tahizoitov in posledičnim patološkim spremembam. INF- γ predstavlja glavno komponento imunske zaščite proti *T. gondii*. Aktivirani CD4 + in CD8 + T limfociti proizvajajo INF- γ in so citotoksični za celice okužene s *T. gondii*. Tako vnetni kot regulatorni citokini so vključeni v ta proces. Po dveh tednih po okužbi se pojavijo protitelesa IgG, IgM, IgA in IgE proti parazitu. Protitelesa IgA ščitijo mukozne površine in varujejo gostitelja proti

ponovni okužbi. Do ponovne okužbe lahko pride, vendar v tem primeru ne pride do bolezni ali kongenitalnega prenosa na plod (Bhopale, 2003; Elizabeth, 1997).

Večino raziskav imunskega odziva na *T. gondii* so opravili na miših. Miši so zelo občutljive za okužbo s toksoplazmo in zato ne predstavljajo idealnega modela za raziskave in razlago imunskega odziva pri človeku. Boljši model za raziskave predstavljajo podgane in ovce, ki so odpornejše proti parazitu in zato dajejo boljše rezultate (Elizabeth, 1997).

T. gondii v organizmu sproži nastajanje INF- γ , ki pa ima negativen učinek v primeru, da ga nastane preveč. Pri kongenitalno okuženih otrocih lahko antigeni *T. gondii* sprožijo zelo močan imunski odgovor s prekomerno produkcijo citokinov, ki zato delujejo toksično.

2.5 Klinična slika

2.5.1 Toksoplazmoza pri ljudeh z normalnim imunskim odzivom

Pri večini primerov gre za okužbo brez bolezenskih znakov. Človek se najpogosteje okuži po rojstvu, govorimo o t.i. pridobljeni ali akvirirani toksoplazmozi. V 10 % lahko povzroča bolezen podobno mononukleози, brez značilnih kliničnih znakov. Kažejo se težave kot so vročina, bolečine v mišicah, glavobol in utrujenost. Za bolezen je najbolj značilno povečanje bezgavk, t.i. limfadenopatija, ki ostanejo povečane 4 – 6 tednov. Taka bolezen redko potrebuje zdravljenje. Zelo redko pride do zapletov bolezni, ki povzročajo okvare v drugih organih kot so možgani, gibalno mišičje, srce ali jetra. Akutna toksoplazmoza je navadno asimptomatska tudi pri ženskah med nosečnostjo. Okužbo potrdimo s serološkimi testi in histološkimi preiskavami (Logar, 1999; Montoya in Liesenfeld, 2004).

2.5.2 Očesna toksoplazmoza

Očesna toksoplazmoza je lahko posledica kongenitalne okužbe ali pridobljene okužbe. Za primere očesne toksoplazmoze večino avtorjev meni, da so večinoma kongenitalnega izvora. Okužba oči s toksoplazmami povzroča poškodbe na očeh kot je horioretinitis. Pojavlja se pri okuženih novorojenčkih, otrocih, mladostnikih in odraslih. Redko je posledica akutne okužbe, bolj pogosta je med kronično okužbo, ko pride do razgradnje tkivne ciste v mrežnici. Pride do lokalnega uničenja celic očesne mrežnice in vnetja, kar vodi do bolezenskih sprememb očesnega tkiva in lahko pripelje celo do slepote. Je pogost

zaplet pri imunsko oslabljenih bolnikih (Montoya in Liesenfeld, 2004; Mehlhorn in sod., 2008).

2.5.3 Toksoplazmoza pri imunsko oslabljenih

Pri imunsko oslabljenih bolnikih, kot so bolniki z Hodgkinovo boleznijo, rakavimi obolenji, aidsom in bolnikih zdravljenih s kortikosteroidi po transplantaciji organov, je bolezen zelo resna in se lahko konča tudi s smrtnim izidom. Pri teh bolnikih je toksoplazmoza skoraj vedno posledica reaktivacije kronične bolezni. Najpogosteje je prizadeto osrednje živčevje. Encefalitis je posledica kronične okužbe. Do njega verjetno pride po razpoku tkivne ciste. Zaradi imunosupresije se bradioziti lahko razvijejo v tahiozite in se razmnožujejo, ter povzročajo nekroze možganskega tkiva, ki ga spremlja šibek vnetni odziv. V možganih imunsko oslabljenih bolnikov lahko najdemo eno ali več bolezenskih sprememb. Lahko jih odkrijemo z računalniško tomografijo (CT) ali magnetno resonanco (MR). Posledica so glavobol, zmedenost, motorične motnje, ataksija in krči.

Toksoplazmoza pri imunsko oslabljenih bolnikih se lahko kaže tudi kot horioretinitis, pljučnica ali razsejana večorganska okužba, z akutno dihalno stisko in stanjem, ki spominja na septični šok (Logar, 1999).

2.5.4 Kongenitalna toksoplazmoza

Kongenitalna toksoplazmoza je okužba ploda, ki ima za posledico bolezen ploda ali splav. O kongenitalni toksoplazmozi govorimo samo takrat, ko se ženska med nosečnostjo prvič okuži in toksoplazme po krvnem obtoku okužijo plod. Prenos parazita iz okužene nosečnice na plod se zgodi v 20 – 40 %. Toksoplazmoza pri zarodku je pogosto asimptomatska, v 10 – 20 % pa se razvijejo bolezenski znaki, takrat govorimo o kongenitalni toksoplazmozi. Resnost bolezni je odvisna od časa v katerem pride do prenosa parazita na plod; najresnejše posledice ima okužba v prvem trimesečju nosečnosti, najmanjše posledice pa okužba v zadnjem trimesečju.

Kongenitalna toksoplazmoza nastopa v eni izmed štirih oblik:

- simptomatska kongenitalna bolezen novorojenčka
- blaga ali resna bolezen v prvem mesecu
- otroška oz. adolescenčna bolezen prej nediagnosticirane okužbe s toksoplazmozo
- okužba brez bolezenskih znakov (subklinična okužba)

Značilni bolezenski znaki so horiretinitis, hidrocefalija in možganske zaapnitve (klasična trojica bolezenskih znakov kongenitalne okužbe), pojavljajo pa se tudi psihomotorična zapoznelost, ter pri novorojenčku hepatomegalija, splenomegalija, pljučnica, izpuščaji, anemija, zlatenica in krči.

V 70 % primerih se ženskam, ki so se okužile v zadnjem trimesečju rodijo otroci z brezsimptomno toksoplazmozo, pri katerih se lahko bolezenski znaki kot je horiretinitis pokažejo šele kasneje (Gagne, 2001; Logar, 1999).

2.6 Preprečevanje in zdravljenje

Kongenitalno toksoplazmozo lahko preprečujemo s t.i. primarnim, sekundarnim in terciarnim preprečevanjem.

Pod primarno preprečevanje uvrščamo izobraževanje žensk v rodni dobi o načinih okužbe s parazitom in o načinih varovanja pred okužbo s *T. gondii*. Ameriški Center za nadzor bolezni (CDC) je sestavil seznam priporočil za primarno preprečevanje toksoplazmoze. Izobraževalni programi imajo poudarek na higieni živil. Z njimi želimo zmanjšati incidenco akutne toksoplazmoze posebno pri nosečnicah. Med primarno preprečevanje uvrščamo tudi cepljenje, vendar zaenkrat nobeno od cepiv ni primerno za uporabo pri ljudeh. Pojavljajo se problemi zaradi toksičnosti cepiv in kratkotrajne imunosti. Po cepljenju lahko pride tudi do reaktivacije bolezni. Atenuirano cepivo tahizoitov *T. gondii* so uspešno uporabili na živalih, vendar ga na ljudeh ne uporabljamo. Živa cepiva proti *T. gondii* izzovejo močnejši imunski odziv kot »mrtva« cepiva z imunogenimi komponentami mrtvega parazita. Raziskovali so tudi možnost heterologne imunizacije z uporabo sorodnih organizmov, kot je *Hammondia hammondi*. V novejših raziskavah preučujejo možnost uporabe očiščenih, rekombinantnih površinskih antigenov parazita za razvoj cepiva. Še posebno je za raziskovalce zanimiva beljakovina SAG1 (Bhopale, 2003).

Pri sekundarnem preprečevanju izvajamo presejalno testiranje nosečnic na toksoplazmozo, ter zdravimo tiste nosečnice, pri katerih odkrijemo prvo okužbo s *T. gondii*.

S terciarnim preprečevanjem želimo zmanjšati število prizadetih primerov in ne moremo zmanjšati incidence okužbe. Med terciarno preprečevanje uvrščamo prekinitve nosečnosti zaradi okužbe in zdravljenje ploda (Holliman, 1995).

Zdravljenje

Osebe z normalnim imunskim odgovorom v večini primerov ne potrebujejo zdravljenja. Pri kongenitalni toksoplazmozi v nosečnosti lahko zdravimo mater, plod ali novorojenčka. Z zdravljenjem nosečnice želimo preprečiti okužbo ploda, z zdravljenjem ploda oz. novorojenčka, pa želimo preprečiti poškodbe otroka, kot posledico okužbe. Vse nosečnice z akutno toksoplazmozo, pri katerih obstaja nevarnost za okužbo ploda in razvoj kongenitalne toksoplazmoze je potrebno zdraviti. Za zdravljenje v nosečnosti najpogosteje uporabljamo spiramicin. Spiramicin doseže visoke koncentracije v posteljici in preprečuje prenos parazita preko posteljice na plod. Toksoplazmozo lahko zdravimo tudi s kombinacijo pirimetamina in sulfonamidi. Ti dve protimikrobni učinkovini delujeta sinergistično in uspešno prehajata skozi posteljico, ter tako preprečujeta razvoj bolezni pri plodu. Pirimetamin deluje škodljivo na kostni mozeg, zato ga dajemo v kombinaciji z folno kislino, ki nevtralizira škodljivo delovanje pirimetamina. Pirimetamina ni priporočljivo dajati pred 12. tednom nosečnosti. Pri imunsko oslabljenih bolnikih toksoplazmozo zdravimo s pirimetaminom, sulfadiazinom in folno kislino. Namesto sulfadiazina lahko uporabimo tudi klindamicin. Klindamicin uporabljamo predvsem za zdravljenje očesne toksoplazmoze. V nekaterih primerih bolniki prejemajo tudi kortikosteroide zaradi njihovega protivnetnega delovanja. Vsa omenjena zdravila delujejo proti prostim oblikam parazita in ne na tkivne ciste (Montoya in Liesenfeld, 2004).

2.7 Diagnoza

Diagnoza infekcijskih bolezni običajno temelji na osamitvi patogenega mikroorganizma ali dokazu protiteles proti njemu. Diagnoza okužbe ni pomembna samo zaradi zdravljenja ampak tudi z vidika epidemiologije in preprečevanja. *T. gondii* je težko osamiti, ker je gojenje parazita izredno zahtevno. Okužbo s *T. gondii* lahko diagnosticiramo na tri načine (Gagne, 2001):

- Z osamitvijo organizma *T. gondii*
- Histološko identifikacijo parazita v tkivu
- Dokazom protiteles proti parazitu s serološkimi preiskavami

Okužbo dokažemo posredno z uporabo seroloških metod ali neposredno z verižno reakcijo s polimerazo (PCR), hibridizacije, osamitvijo in histološkimi tehnikami. Povečane

bezgavke so značilen znak okužbe. Do nje pride zaradi delovanja imunskega sistema, zato je število parazitov v histoloških vzorcih povečanih limfnih vozličkov zelo majhno. Osamitev toksoplazem iz drugih tkiv je zahteven in dolgotrajen proces (Fleck, 1989). Zaradi teh razlogov diagnostika imunsko kompetentnih oseb temelji na dokazu specifičnih protiteles s serološkimi testi. Povečanje nivoja protiteles je značilen pokazatelj pridobljene sveže okužbe. Klinična diagnoza toksoplazmoze je težavna in simptomi okužbe se pogosto pojavijo pozno.

Posredne serološke metode uporabljamo za dokazovanje okužbe pri ljudeh z normalnim imunskim odzivom, medtem ko negativne vrednosti nivoja protiteles ne izključujejo bolezni pri imunsko oslabljenih posameznikih. V takih primerih uporabimo tehnike za neposredno dokazovanje parazita v kužnini, kot so inokulacija v miške in celične kulture, histološki prikaz parazita, mikroskopski pregled preparatov ter PCR testiranje (za ugotavljanje parazitske DNA v krvi, telesnih tekočinah ali biopsijskem materialu). Pri sumu na možgansko toksoplazmozo lahko uporabimo pregled z računalniško tomografijo (CT) in magnetno resonanco (MR) (Logar, 1999; Montoya in Liesenfeld, 2004).

2.7.1 Posredne serološke tehnike

S serološkimi metodami določamo različne razrede specifičnih protiteles. Ugotavljamo lahko tudi naraščanje ali upadanje koncentracije specifičnih protiteles. Za potrjevanje akutne oblike bolezni so pomembne naraščajoče koncentracije protiteles IgG in prisotnost IgM protiteles. Težava nastane zaradi pozno postavljene klinične diagnoze. V tem primeru bolezen ugotovimo z dokazom perzistentnih specifičnih protiteles IgG. Koncentracije specifičnih protiteles niso povezane z resnostjo okužbe (Barker in Holliman, 1992).

Protitelesa IgG, IgM, IgA in IgE

Specifična protitelesa IgG ugotavljamo pri nosečnicah in imunsko oslabljenih osebah. Odsotnost protiteles IgG pred ali v zgodnji nosečnosti nam nakazuje katere ženske so ogrožene za toksoplazmozo. Pri imunsko oslabljenih osebah lahko z dokazom protiteles IgG ugotovimo pri katerih posameznikih lahko pride do reaktivacije latentne okužbe. Protitelesa IgG določamo s testom po Sabin Feldmanu, encimsko imunskim testom (ELISA), aglutinacijo in diferencialno aglutinacijo, imunofluorescenco ter določanjem avidnosti protiteles IgG. Test za določanje avidnosti protiteles IgG je postal standardni test

za ločevanje med novo okužbo in okužbo v preteklosti. Dokaz protiteles z visoko avidnostjo izključuje okužbo v zadnjih treh mesecih, protitelesa z nizko avidnostjo pa lahko v organizmu vztrajajo več kot tri mesece. Protitelesa IgG se pojavijo 1-2 meseca po okužbi in so prisotna doživljensko.

Za dokaz protiteles IgM najpogosteje uporabljamo sistem dvojnih protiteles »sendvič« ELISA (DS-ELISA) in imunsko aglutinacijski test (ISAGA). Protitelesa IgM se pojavijo v prvem tednu okužbe. Njihova koncentracija hitro naraste, vendar začnejo kmalu upadati in nato popolnoma izginejo. Težavo pri interpretaciji rezultatov protiteles IgM povzročajo lažno pozitivni rezultati in vztrajanje protiteles še leta po okužbi. Prednost testiranja protiteles IgM je v tem, da negativen rezultat izključuje v kratkem pridobljeno okužbo. ISAGA test IgM je zelo občutljiv in specifičen, zato ga pogosto uporabljajo za diagnozo kongenitalne toksoplazmoze.

S testiranjem na protitelesa IgM in IgA ugotovimo okužbo pri približno 75 % novorojenčkov. Protitelesa IgG v serumu novorojenčka so lahko novonastala ali pasivno prenesena od matere. Od matere prenesena protitelesa IgG izginejo po 6-12 mesecih.

Pri odraslih so lahko protitelesa IgA v organizmu prisotna tudi do enega leta in zato nimajo pomembne vloge pri dokazovanju sveže okužbe. Teste za določanje protiteles IgE uporabljajo samo v kombinaciji s serološkimi metodami za dokazovanje drugih protiteles.

Dokazali so, da lahko z ugotavljanjem lokalne proizvodnje protiteles v očesu uspešno diagnosticiramo očesno toksoplazmozo (Montoya in Liesenfeld, 2004).

Serološke tehnike

Teste za ugotavljanje protiteles razdelimo v dve skupini, odvisno od vrste antigena proti kateremu je usmerjeno njihovo delovanje. V skupini testov, s katerimi ugotavljamo antigene celotnih organizmov, uvrščamo barvanje po Sabin Feldmanu, direktni aglutinacijski test in imunski aglutinacijski test (ISAGA). S temi testi ugotavljamo protitelesa proti antigenom, ki se nahajajo na membrani parazita. Z njimi učinkovito določimo okužbo v zgodnjih fazah okužbe.

Druga vrsta testov je usmerjena proti antigenom citoplazme, ki jih lahko dokažemo po uničenju tahizoitov. Mednje uvrščamo reakcijo vezave komplementa, encimsko imunski test (ELISA), lateksno aglutinacijo in hemaglutinacijski test. Testi s katerimi ugotavljamo

protitelesa proti antigenom citoplazme postanejo pozitivni kasneje, vendar ostanejo pozitivni dalj časa (Barker in Holliman, 1992).

2.7.1.1 Barvanje po Sabin Feldmanu

Barvanje po Sabin Feldmanu je referenčna metoda (zlati standard) za ugotavljanje specifičnih protiteles proti toksoplazmi. Pri barvanju uporabljamo žive, virulentne trofozoite. Zato lahko to metodo izvajajo samo v referenčnih laboratorijih. Z alkalnim barvilom metilen modro se živi tahizoiti obarvajo modro. Živim tahizoitom dodajo različne razredčine pacientovega seruma. Mešanice inkubirajo eno uro, nato dodajo metilensko modrilo in pregledajo preparat pod mikroskopom. Če so v serumu pacienta prisotna protitelesa proti *T. gondii*, ta vežejo komplement, ki poškoduje celično steno parazita. Poškodovani organizmi ne prevzamejo barve in ostanejo neobarvani. Ta metoda omogoča ugotavljanje protiteles IgG in IgM. Čeprav je njegova izvedba zahtevna, je test izredno občutljiv in specifičen (Barker in Holliman, 1992; Fleck, 1989).

2.7.1.2 Direktni aglutinacijski test

Test temelji na reakciji med specifičnimi protitelesi in trofozoiti vezanimi v formalinu ali acetonu. Tvorijo se značilen aglutinacijski vzorec. Občutljivost in specifičnost testa se povečata z predhodno obdelavo trofozoitov s tripsinom, kar povzroči izpostavitve dodatnih antigenov. Občutljivost testa je glede na referenčno metodo 96 %, specifičnost pa 98 % (Barker in Holliman, 1992; Fleck, 1989).

2.7.1.3 Lateksna aglutinacija

Metodo lateksne aglutinacije lahko uporabljamo v presejalnem testiranju na toksoplazmozo. Antigeni uničenih trofozoitov so vezani na lateksne delce. Serijske redčitve serumov naredimo v luknjicah mikrotiterskih plošč in zmešamo s pripravljenimi lateksnimi delci, ter inkubiramo na sobni temperaturi 12 ur. V primeru da serum vsebuje specifična protitelesa se tvorijo vidni aglutinacijski vzorci. Test ne bo zaznal protiteles v prvih nekaj tednih okužbe, ker je usmerjen proti antigenom citoplazme trofozoitov. Pri testu lahko pride do lažno pozitivnih rezultatov. Občutljivost testa je 99 %, specifičnost 81 % (Barker in Holliman, 1992; Fleck, 1989).

2.7.1.4 Encimsko imunski test (ELISA)

Na osnovi encimsko imunskih testov ELISA je narejenih več komercialnih testov za odkrivanje specifičnih protiteles proti toksoplazmi. Specifična protitelesa proti toksoplazmi ugotavljamo z antigenom, ki je vezan na podlago. Uporabljamo protitelesa proti človeškim imunoglobulinom na katere je vezan encim, kot je hrenova peroksidaza. Dodan je substrat, ki se v primeru pozitivne reakcije obarva. Reakcijo ustavimo z dodatkom žveplove kisline. Spektrofotometrično merimo absorbanco, ki je proporcionalna količini specifičnih protiteles proti toksoplazmi. Občutljivost metode ELISA je mogoče povečati z uporabo dvojne »sendvič« metode (DS-ELISA). Tak test lahko uporabljamo za dokazovanje protiteles IgG, IgM in IgA. Pojavljajo se lahko lažno pozitivni IgM rezultati zaradi navzkrižnih reakcij z revmatoidnim (Barker in Holliman, 1992; Fleck, 1989).

2.7.1.5 Imunski aglutinacijski test (ISAGA)

Test uporabljamo za določanje IgM protiteles proti toksoplazmi. Z uporabo monoklonskih protiteles se posledično aglutinirajo celotni trofozoiti *T. gondii*. Test ima višjo občutljivost kot ELISA, ter podobno specifičnost. Omogoča zgodnjo diagnozo akutne in kongenitalne toksoplazmoze. Rutinsko test uporabljajo v Franciji (Barker in Holliman, 1992; Fleck, 1989).

2.7.1.6 Western blotting (WB)

Metoda vključuje ločevanje z elektroforezo, prenos in vezavo proteinov na membrano, ki je ponavadi nitrocelulozna. Z vrstno specifičnimi protitelesi proti človeškim imunoglobulinom je možno analizirati vzorce antigenov toksoplazme na nitroceluloznih trakovih, ki jih prepoznajo protitelesa v človeškem serumu. Izvedene so bile raziskave v katerih so preiskovali serume bolnikov v različnih fazah bolezni. Na podlagi teh rezultatov so naredili antigenske profile in te medsebojno primerjali. Težava pri interpretaciji metode WB se pojavlja zaradi naravne tvorbe protiteles pri neokuženih bolnikih, ki so reaktivna z antigeni toksoplazme (Barker in Holliman, 1992).

2.7.2 Neposredne tehnike

Osamitev *T. gondii* iz krvi ali drugih telesnih tekočin je dokaz akutne okužbe. Z osamitvenimi tehnikami dokazujemo žive parazite, zato niso občutljive.

Dokaz tahizoitov v določenem tkivu ali razmazih telesnih tekočin (npr. bronhialnem izpirku ali tekočini odvzeti iz hrbtenjače) nam pove, da parazit povzroča patološke spremembe v organskem sistemu iz katerega smo ga osamili. Tahizoite lahko najdemo kot posledico akutne okužbe ali reaktivacije latentne okužbe.

Tudi z uporabo tehnike PCR v telesnih tekočinah in tkivih lahko uspešno diagnosticiramo očesno, kongenitalno, diseminirano oz. razsejano toksoplazmozo ali toksoplazmozo pri kateri je prizadet centralni živčni sistem (Montoya in Liesenfeld, 2004).

2.7.2.1 Histološke tehnike

Za dokaz okužbe opravljamo histološki pregled povečanih bolezensko spremenjenih bezgavk. Ohranjena je normalna zgradba tkiva, značilna znaka okužbe sta hiperplazija foliklov in skupek enojedrnih celic na obrobju bezgavk.

Za diagnostiko toksoplazmoze osrednjega živčevja, uporabljajo tudi možgansko biopsijo. Občutljivost in specifičnost tega postopka je različna. V tkivu se pojavljajo dobro vidna področja odmrlega tkiva (nekroz), na robu katerih je prisotno vneto tkivo. V primeru tvorbe tkivnih cist, te najdemo na stičišču nekroz. Metoda je vprašljiva pri bolnikih z aidsom, saj so patološke spremembe tkiva lahko posledica okužbe z drugimi mikroorganizmi. Pri njih se lahko namesto »agresivne« strategije diagnostike, ki vključuje možgansko biopsijo, odločimo za »konzervativnejšo« strategijo in takega bolnika s sumom na toksoplazmozo, ki jo nakazujejo tudi klinične in laboratorijske preiskave, poskusno zdravimo s protiparazitskimi zdravili in spremljamo spremembo njegovega stanja (Barker in Holliman, 1992).

2.7.2.2 Osamitev parazita

Parazita *T. gondii* lahko osamimo z biopsijo poskusnih mišk, ki smo jim predhodno inokulirali kužnino v intraperitonealni prostor. Rezultate dobimo šele po 6 – 8 tednih. V primeru da miške zbolijo, lahko parazite najdemo v tekočini peritonealnega prostora ali možganih. Možna je tudi inokulacija kužnine na celično kulturo, pri katerih dobimo

rezultat hitreje, vendar je ta postopek v primerjavi z inokulacijo v miške manj občutljiv. V celičnih kulturah prisotnost parazita dokazujemo z imunofluorescenco.

Metode osamitve uporabljamo pri preiskavi zarodka. Amnijsko tekočino ali kri zarodka inokuliramo v miške, da potrdimo okužbo. Kužnine bolnikov z aidsom je zakonsko prepovedano cepiti v poskusne živali, lahko pa jih cepimo na celične kulture. Diagnostično dokazovanje toksoplazmoze s celičnimi kulturami se opušta, še vedno pa celične kulture veliko uporabljajo v farmakoloških raziskavah. Težava metod osamitve je lahko v tem, da ne ločijo med akutno okužbo in latentno okužbo (Barker in Holliman, 1992).

2.7.2.3 Molekularne tehnike

Dokazovanje specifičnih nukleinskih kislin v kliničnih vzorcih z uporabo DNK sond in z hibridizacijskimi tehnikami so uspešno uporabili za dokazovanje toksoplazmoze. To dokazovanje predstavlja dobro dopolnitev serološkim metodam in metodam gojenja parazita. Z metodo PCR pomnožujemo denaturirano enoverižno ali dvoverižno DNK s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi. Začetna oligonukleotida se vežeta vsak na svoj konec tarčnega zaporedja DNK, sledi sinteza zaporedja med oligonukleotidoma v več avtomatiziranih ciklih. Večina laboratorijev za dokaz okužbe s *T. gondii* s tehniko PCR uporablja zaporedje B1 in ribosomalne DNK, v nekaterih evropskih laboratorijih pa uporabljajo zaporedje AF146527. V Franciji so naredili primerjavo vseh treh PCR tarč in ugotovili, da razlike niso statistično pomembne (Remington in sod., 2004). Občutljivost metode se lahko zmanjša z nepravilnim ravnanjem, transportom in hranjenjem vzorcev, ter predhodnim zdravljenjem z protiparazitskimi zdravili. Občutljivost in specifičnost metode sta blizu 100 %.

V zadnjem desetletju je doseglo dokazovanje kongenitalne okužbe in akutne bolezni pri imunsko oslabljenih ljudeh z metodo PCR velik napredek. Raziskave so pokazale, da je dokaz DNA *T. gondii* v amnijski tekočini nosečnic zelo uporabna metoda za potrditev ali izključitev okužbe ploda s *T. gondii*. Metoda je omogočila zgodnjo diagnostiko kongenitalne toksoplazmoze in s tem zmanjšala uporabo bolj invazivnih diagnostičnih metod.

Vedno bolj se uveljavlja metoda PCR v realnem času. Metoda je avtomatizirana, hitrejša, z manjšimi možnostmi kontaminacije, omogočena je tudi standardizacija rezultatov (Bastien, 2002; Montoya in Liesenfeld, 2004).

2.7.3 Interpretacija rezultatov diagnostičnih tehnik

Dokaz parazita *T. gondii* na obarvanem preparatu kužnine potrdi okužbo. Na žalost so taki diagnostični primeri redki. Tudi osamitev parazita iz inokuliranih mišk ali celičnih kultur je zelo zanesljiv pokazatelj okužbe. Prisotnost toksoplazme v placenti je zadosten kriterij za potrditev okužbe s kongenitalno toksoplazmozo.

PCR rezultate razlagamo glede na klinične znake okužbe. Če je metoda izvedena pravilno (pozitivna kontrola, negativna kontrola, kontrola pomnoževanja, možnosti kontaminacije) lahko postavimo diagnozo.

Ameriška FDA (Food and Drug Administration) je leta 1997 objavila splošen vodič za interpretacijo seroloških testov proti *T. gondii* (Jones in sod., 2001).

Preglednica 2. 1: Razlaga seroloških testov IgG in IgM proti *T. gondii* pri odraslih ljudeh (Jones in sod., 2001).

Rezultati		Razlaga testov
IgG	IgM	
Negativno	Negativno	Ni serološkega dokaza za okužbo s <i>T. gondii</i> .
Negativno	Mejno	Možna je zgodnja akutna okužba ali lažno pozitivna reakcija s protitelesi IgM. Pridobiti je potrebno nov vzorec in ponoviti testiranje. Če je rezultat drugega testiranja enak, bolnik verjetno ni okužen s <i>T. gondii</i> .
Negativno	Pozitivno	Možna je akutna okužba ali lažno pozitivna reakcija s protitelesi IgM. Pridobiti je potrebno nov vzorec in ponoviti testiranje. Če je rezultat drugega testiranja enak, bolnik verjetno ni okužen s <i>T. gondii</i> .
Mejno	Negativno	Nedoločeno. Pridobiti je potrebno nov vzorec in ponoviti test za protitelesa IgG.
Mejno	Mejno	Nedoločeno. Pridobiti je potrebno nov vzorec in ponoviti tako test za specifična protitelesa IgG kot tudi za specifična protitelesa IgM.
Mejno	Pozitivno	Možna je akutna okužba s <i>T. gondii</i> . Pridobiti je potrebno nov vzorec in ponoviti tako test za specifična protitelesa IgG kot tudi za specifična protitelesa IgM. Če rezultat ostane enak ali rezultat reakcije s specifičnimi protitelesi IgG postane pozitiven, je potrebno oba vzorca poslati v referenčni laboratorij.
Pozitivno	Negativno	Bolnik se je s <i>T. gondii</i> okužil pred več kot enim letom.
Pozitivno	Mejno	Bolnik se je verjetno s <i>T. gondii</i> okužil pred več kot enim letom ali pa je reakcija s specifičnimi protitelesi IgM lažno pozitivna. Pridobiti je potrebno nov vzorec za testiranje specifičnih protiteles IgM. Če rezultat ostane enak, je potrebno oba vzorca poslati v referenčni laboratorij.
Pozitivno	Pozitivno	Bolnik se je verjetno s <i>T. gondii</i> okužil v zadnjih 12 mesecih ali pa je reakcija s specifičnimi protitelesi IgM lažno pozitivna. Vzorec je potrebno poslati v referenčni laboratorij.

Nosečnice, s koncentracijami protiteles IgG blizu mejne vrednosti, je potrebno serološko in klinično spremljati.

Tehnike za določanje protiteles IgM so zelo občutljive. S testom ISAGA najdemo protitelesa IgM pri 50 % bolnikov še 18 mesecev po serokonverziji, z metodo ELISA pa pri približno 30 % bolnikov. Komercialni diagnostični kompleti v začetku serokonverzije relativno slabo zaznajo protitelesa IgM. To je slabost omenjenih tehnik, saj je poglavitni cilj ugotoviti serokonverzijo pri nosečnicah čim hitreje.

Prisotnost protiteles IgM in IgG ni zadosten razlog za zaključek, da je prišlo do sveže okužbe, ampak le opozorilni znak, na podlagi katerega nadaljujemo preiskave za bolj natančno ugotavljanje začetka okužbe. Za bolj natančno določitev sveže okužbe, uporabljamo tehniko za ugotavljanje avidnosti protiteles IgG.

Sprememba iz stanja brez specifičnih protiteles v stanje, kjer dokažemo protitelesa IgG imenujemo serokonverzija in pomeni svežo okužbo. Pojav protiteles IgM ni vedno zadostna potrditev sveže okužbe lahko je tudi posledica nespecifičnih reakcij. Z metodo ELISA neredko ugotovimo protitelesa IgM, za katera se kasneje izkaže, da niso bila specifična.

Protitelesa IgA se pojavijo skoraj istočasno kot protitelesa IgM in izginejo po 6-7 mesecih. Do serokonverzije lahko pride brez pojava protiteles IgA.

Pri ljudeh z oslabljenim imunskim odzivom se protitelesa proti toksoplazmozi lahko pojavijo kasneje (npr. zaradi imunosupresivnega zdravljenja pri bolnikih s presajenimi organi), v takih primerih so neposredne tehnike dokaza parazita bolj primerne od seroloških. Pri serološki diagnostiki lahko imunsko oslABLJENE bolnike razdelimo v dve skupini:

- Bolniki, ki so v nevarnosti za reaktivacijo stare okužbe s toksoplazmozo. Serološke preiskave v tem primeru ne nudijo odgovora ali je prišlo do izbruha akutne oblike bolezni. Neposredne osamitvene tehnike in poskusno protiparazitsko zdravljenje potrdijo diagnozo. V to skupino uvrščamo predvsem bolnike z aidsom in bolnike po presaditvi kostnega mozga (bolniki, s pozitivnimi koncentracijami protiteles IgG na toksoplazmozo že pred presaditvijo).
- V to skupino uvrščamo bolnike po presaditvi organov, ki so imeli negativno koncentracijo protiteles IgG pred presaditvijo. Darovalec organa ima pozitivno koncentracijo protiteles IgG na toksoplazmozo, zato lahko pride do sveže primarne okužbe prejemnika organa s transplantatom. Pri diagnostiki lahko uporabljamo tudi neposredne metode, npr. biološki poskus.

Pred presaditvijo bolniki s pozitivnimi koncentracijami protiteles IgG (v nasprotju s bolniki z negativnimi koncentracijami protiteles IgG), po presaditvi organa lahko razvijejo močan imunski odziv protiteles IgG, vendar brez kliničnih posledic.

Pri kongenitalni toksoplazmozi diagnostika okužbe ploda temelji na inokulaciji amnijske tekočine v miške in na metodi PCR. Negativni rezultat ne izključuje okužbe, saj raziskave kažejo na 35 % možnost lažno negativnega rezultata. Prisotna protitelesa IgM in IgA pri novorojenčku, zaradi možnosti kontaminacije novorojenčkove krvi z materino krvjo, niso vedno zanesljiv pokazatelj okužbe. Na tej stopnji je primerjalni imunološki profil parov otrok-mater tisti, ki nam omogoči diagnozo. Nekaj dni po rojstvu nam prisotnost protiteles IgM in IgA potrди diagnozo kongenitalne toksoplazmoze. Vendar odsotnost teh protiteles ne izključuje možnosti bolezni, pri 6 % primerov je diagnoza potrjena z dokazom protiteles IgG, ki izginejo po enem letu. Občutljivost diagnostičnih metod za dokazovanje toksoplazmoze pri plodu se zmanjša v primeru, če mati zdravimo z zdravili proti parazitu (npr. kombinacija pirimetamina in sulfonamidov). Novorojenček zdravljen matere ima po rojstvu lahko negativne koncentracije protiteles IgG in IgM na toksoplazmozo, kljub temu da je okužen s toksoplazmozo. Protitelesa proti *T. gondii* se pri takem otoku lahko pojavijo šele kasneje.

2.8 Presejalno testiranje

S presejalnim testiranjem žensk pred nosečnostjo želimo ugotoviti katere so v nevarnosti za svežo akutno okužbo in jim nuditi ustrezno zdravstveno izobraževanje ter v prihodnosti morda tudi cepljenje. Presejalno testiranje nosečnic je namenjeno prepoznavanju prvih toksoplazemskih okužb v nosečnosti. Prvič okužene nosečnice zdravimo z zdravili proti parazitu in z nadaljnjim spremljanjem ugotavljamo uspešnost zdravljenja. S presejalnimi testi serumov novorojenčkov, želimo ugotoviti pri katerih novorojenčkih je prišlo do kongenitalne okužbe in jih čimprej zdraviti (Holliman, 1995).

Preglednica 2. 2: Možnosti izvajanja presejalnega testiranja na okužbo s *T. gondii* glede na populacijo (Holliman, 1995).

Preiskovana populacija	Tarčna populacija	Ukrepi
Ženske pred nosečnostjo	Neokužene ženske	<ul style="list-style-type: none"> • Zdravstveno izobraževanje
Nosečnice	Nosečnice z akutno toksoplazmozo	<ul style="list-style-type: none"> • Prekinitev nosečnosti • Zdravljenje • Ugotavljanje okuženosti
Novorojenčki	Novorojenčki s kongenitalno toksoplazmozo	<ul style="list-style-type: none"> • Zdravljenje • Pregledi oči

V državah z visoko pojavnostjo toksoplazmoze, kot sta Francija in Avstrija, izvajajo presejalno testiranje že več kot 20 let. Program slovenskega presejalnega testiranja so uvedli leta 1995 po vzoru avstrijskega sistema (Logar in sod., 2002).

Omejitve presejalnih programov se pojavljajo v določenih regijah zaradi nepoznane incidence kongenitalne toksoplazmoze. Težava je tudi v tem, da specifičnost in občutljivost seroloških testov nista dovolj veliki, ko preiskujemo veliko populacijo ljudi z nizko incidenco. Tako se lahko pojavi veliko število lažno pozitivnih ter lažno negativnih rezultatov. Zdravljenje s spiramicinom je lahko v določenih primerih kongenitalne toksoplazmoze neuspešno. Ta dejstva so mnoge države odvrnile od vpeljave presejalnega testiranja na toksoplazmozo v svoj zdravstveni sistem (Holliman, 1995).

Preglednica 2. 3: Načela presejalnega testiranja (Holliman, 1995).

Bolezen	Bolezen mora biti pomemben zdravstveni problem z dobro opisanim potekom bolezni ter možnostjo prepoznavne bolezni v zgodnji fazi
Test	Na razpolago mora biti primeren diagnostični test, sprejemljiv za tarčno populacijo
Zdravljenje	Uspešnost zdravljenja v zgodnji fazi bolezni mora biti uspešnejše kot kasnejše zdravljenje
Administracija	Na razpolago mora biti dovolj primernih ustanov za diagnozo in zdravljenje v primeru odkritja bolezni
Razmerje škoda:korist	Preiskovani posamezniki morajo imeti več koristi od testiranja, kot škode zaradi psihičnih in fizičnih posledic

2.8.1 Potek presejalnega testiranja na *Toxoplasma gondii* v Sloveniji

V Sloveniji presejalno testiranje opravljajo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani ter v sedmih mikrobioloških laboratorijih območnih zavodov za zdravstveno varstvo (Koper, Nova Gorica, Kranj, Novo mesto, Celje, Maribor, Murska Sobota). Serume nosečnic pregledujejo v prvem trimesečju nosečnosti oz. najkasneje v 10. do 12. tednu nosečnosti. S serološkimi testi istočasno ugotavljajo

prisotnost protiteles IgG in IgM proti *T. gondii*. V primeru, da pri ženski z imunofluorescenčnim testom (IFT) ali ELISA testom ugotovijo protitelesa proti toksoplazmam že pred nosečnostjo nadaljnjo preiskovanje ni več potrebno. Če je nosečnica prvič pregledana v nosečnosti in je test ELISA pozitiven z nizko vrednostjo mednarodnih enot (< 300 IU/ml) ali pozitiven IFT z nizko vrednostjo, potem je potrebna druga serološka preiskava po dveh do treh tednih po prvem pregledu. Če pri drugem testiranju potrdijo enake vrednosti protiteles IgG prvega testiranja potem gre za staro, za plod nenevarno okužbo. V primeru, da se titri protiteles IgG pri drugem testiranju povečajo za štirikrat ali več (IU/ml na več kot 300 enot), to kaže na svežo okužbo. Nosečnica, pri kateri v prvem trimesečju ne dokažemo protiteles IgG in IgM, se lahko med nadaljnjo nosečnostjo prvič okuži in je potencialno ogrožena za okužbo. Zato jih ponovno serološko pregledujejo v drugem trimesečju (v 20. - 24. tednu) in v tretjem trimesečju (v 24. - 36. tednu). V primeru, da pride do serokonverzije oz. do tega, da postanejo titri protiteles ELISA ali IFT testa pri prvi ali drugi kontroli pozitivni, to pomeni da je prišlo do okužbe med nosečnostjo. Serume nosečnic pri katerih je prišlo do serokonverzije, dodatno ovrednotijo še z dodatnimi testi. Če pri serološkem pregledu poleg IgG ugotovimo tudi protitelesa IgM, le-ta kažejo na možno primarno svežo okužbo ali pa na več tednov ali mesecev staro okužbo. Da potrdijo ali ovržejo svežo okužbo, tak serum testirajo z ELISA testom za ugotavljanje specifične avidnosti protiteles IgG. Če želimo pri nosečnici z akutno toksoplazmozo ugotoviti ali so paraziti prešli preko placente na plod, preiskujemo amnijsko tekočino z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Ob rojstvu otroka akutno okužene matere je potreben pregled posteljice (inokulacija kužnine v miši, PCR), serološki in klinični pregled ter sledenje novorojenčka. Klinične preglede opravljajo na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja in Očesni kliniki Kliničnega centra v Ljubljani (Logar in sod., 2006).

2.9 Test avidnosti protiteles IgG

Metodo je leta 1989 razvil Hedmann s sodelavci na Finskem. Uporabil je serijske redčitve serumov in jih testiral z ELISA testom z in brez dodatka 6 M uree. Testiranje vzorca po enojnem redčenju sta dodatno ovrednotila Prince in Wilson. Danes s komercialnimi testi lahko izračunamo indeks IgG avidnosti samo z dvema meritvama. S prvo meritvijo določimo vrednost vzorca obdelanega z ureo, z drugo pa vrednost vzorca, ki mu ne

dodamo uree. Z primerjavo obeh rezultatov nato določimo indeks avidnosti protiteles IgG. Metoda je dostopna v obliki komercialno dostopnih reagentov, ki se uporabljajo predvsem v Evropi.

Test IgG avidnosti so razvili z namenom ločevanja med staro in svežo okužbo. Rezultate dobimo na osnovi merjenja avidnosti – funkcionalni afiniteti (privlačnosti med protitelesi in antigeni), specifičnih protiteles IgG proti toksoplazmi. Ugotovili so, da moč vezanja protiteles IgG na toksoplazemski antigen sčasoma raste. Po odzivu organizma na toksoplazemski antigen se najprej tvorijo protitelesa z nizko afiniteto vezave na tarčni antigen. Med procesom imunskega odziva sledi zorenje protiteles, kar se kaže z večanjem afinitete protiteles. Povečanje afinitete protiteles IgG je rezultat selekcijskega procesa imunskih B-celic. Moč vezave med protitelesi in antigeni je odvisna od kemijskih povezav kot so hidrostatske vezi, elektrostatske in van der Waalove sile. Pri testu avidnosti IgG uporabljamo metodo ELISA, pri kateri vključimo ureo ali drug disociativni reagent, ki prekine vezi med kompleksom antigen-protitelo. Test delamo v vzporednih ponovitvah in nato primerjamo optično gostoto vzorcev obdelanih z ureo in tistih katerim uree nismo dodali. Rezultat nam pove kakšno je razmerje med vsemi protitelesi IgG in protitelesi IgG odpornimi na obdelavo z ureo. Problem se pojavi, ker lahko odgovor imunskega sistema močno varira med posamezniki. Ne vemo ali je modelna krivulja zorenja oz. avidnosti protiteles IgG linearna skozi čas. Dokazali so, da zdravljenje z zdravili proti parazitu močno vpliva na zorenje protiteles IgG. Protitelesa IgG dozori kasneje in s tem zdravljenje vpliva tudi na avidnost protiteles IgG. Na osnovi podobnih študij bi morda lahko postavili različne mejne oz. »cut-off« vrednosti za zdravljene in nezdravljene bolnike (Remington in sod., 2004; Lappalainen in Hedman, 2004).

Test avidnosti izključuje možnost, da je prišlo do okužbe v zadnjih 4 – 5 mesecih. Ta podatek je zelo pomemben pri diagnostiki nosečnic v prvih mesecih nosečnosti, s prisotnimi protitelesi IgG in IgM. Če pri nosečnici v prvem trimesečju nosečnosti dokažemo visoko avidna protitelesa IgG, to izključuje možnost okužbe v zadnjih treh mesecih, zato lahko zaključimo, da je do okužbe prišlo pred nosečnostjo in zato ta ne predstavlja nevarnosti za plod. Pri interpretaciji rezultatov je pomembno dejstvo, da nizka avidnost in prisotnost protiteles IgM še ne pomenita pred kratkim časom pridobljene okužbe. Nizko avidna protitelesa IgG lahko v organizmu vztrajajo tudi leto ali več. Težava se pojavlja tudi v tem, da ima velik del preiskovanih ljudi mejno avidnost v t.i. sivi coni,

pri katerih ne moremo priti do zaključka ali gre za staro ali novo okužbo. S testom avidnosti ugotavljamo čas v katerem je prišlo do okužbe. Uporabljamo ga lahko v povezavi z drugimi serološkimi metodami (na protitelesa IgG in IgM), nikakor pa se pri diagnozi ne smemo zanašati izključno na rezultate samega testa avidnosti.

Z nadaljnjim razvojem testa avidnosti se bo zmanjšala možnost napačne diagnoze. Vključevanje testa IgG avidnosti v diagnostiko toksoplazmoze je zmanjšalo potrebe po dodatnih potrditvenih testih, testih za sledenje okužbe, analize amnijske tekočine s PCR, ter zaskrbljenost nosečnic zaradi toksoplazemske okužbe (Remington in sod., 2004).

V študiji, ki so jo izvedli v Sloveniji so poskušali ovrednotiti test avidnosti Toxo-IgG pri diagnozi primarne okužbe v nosečnosti. Raziskava je vključevala 165 serumov nosečnic, ki so sodelovale v presejalnem testiranju na toksoplazmozo. Pri njih so naredili še test avidnosti protiteles IgG. Glede na njihov imunski status so jih razdelili v 4 skupine. Imunski status nosečnic so določili s predhodnim serološkim testiranjem na protitelesa IgG, IgM in IgA in primerjavo spremembe vrednosti protiteles. Prva skupina je vključevala nosečnice, ki so se okužile med nosečnostjo; druga nosečnice, ki so se verjetno okužile med nosečnostjo; tretja skupina nosečnice z verjetno okužbo v preteklosti in četrta skupina nosečnice z latentno okužbo. Avidnost so ugotavljali z encimsko imunskim testom Italijanskega proizvajalca Bouty. Za merjenje optične gostote so uporabljali mikrotitrski čitalec Anthos ht II Labtec Instruments (Avstrija), ki je rezultate testov avtomatično preračunal in naredil primerjavo z dvema kontrolnima in šestimi standardnimi serumi vključenimi v diagnostičnem kompletu.

Preglednica 2. 4: Vrednosti toxo-IgG avidnosti pri nosečnicah z različnim imunskim statusom (Logar in sod., 1999).

Toxo-IgG avidnost	Primarna okužba (n=25)	Verjetna primarna okužba (n=93)	Verjetna stara okužba (n=27)	Latentna okužba (n=20)
Nizka IgG avidnost	25 (100 %)	3 (3,2 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Siva cona (mejna IgG avidnost)	0 (0 %)	21 (22,6 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Visoka IgG avidnost	0 (0 %)	69 (74,2 %)	27 (100 %)	20 (100 %)

Rezultati IgG avidnosti so pri skupini žensk s svežo okužbo pridobljeno med nosečnostjo potrdili rezultate ocenjene na osnovi presejalnega testiranja. Tudi pri skupini nosečnic z

verjetno staro okužbo in skupini z latentno okužbo je test IgG avidnosti izključil možnost sveže okužbe in tako potrdil staro oz. latentno okužbo. V skupini 93 nosečnic z možno svežo okužbo se je na podlagi testa avidnosti IgG samo 24 (25,8 %) nosečnic morda okužilo med nosečnostjo, ostale 69 (74,2 %) so se okužile že pred nosečnostjo. To potrjuje rezultate študije (Jenum in sod., 1997), v kateri so ugotovili, da z testom avidnosti lahko iz nadaljnjega testiranja izključimo tri četrtine nosečnic, pri katerih je obstajal sum na primarno okužbo.

Na podlagi rezultatov te študije, so test avidnosti protiteles IgG, uspešno vključili v Slovenski program presejalnega testiranja na toksoplazmozo (Logar in sod., 1999).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 Vzorci

Presejalno testiranje nosečnic na okužbo s toksoplazmo za Ljubljansko regijo izvajajo na Oddelku za parazitologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Serume nosečnic in novorojenčkov, ki so potencialno ogroženi, presejalno testirajo z ugotavljanjem protiteles IgG in IgM proti *T. gondii* z aparatom cobas e 411 (Roche, Basel, Švica). Aparat je avtomatiziran, z njim izvajamo imunske teste, ki temeljijo na elektrokemiluminescenci (vrsta oddajanja svetlobe, ki je posledica elektrokemičnih reakcij v raztopinah). S tem aparatom smo določili serume, za nadaljnje testiranje na IgG avidnost. Serume smo zbirali od septembra 2007 do januarja 2008. Testirali smo vzorce vseh nosečnic, ne glede na trajanje nosečnosti, v prvem, drugem ali tretjem trimesečju. Izbrali smo serume, ki so bili pozitivni na protitelesa IgG in IgM z obema metodama. Dodatno smo zbrali tudi serume, ki so bili pozitivni ali mejni na IgM z eno od metod, ter IgG pozitivni z obema metodama. Pri nosečnicah s takim serološkim statusom je obstajala možnost akutne okužbe. Serume smo hranili pri 2-8 °C, pri kasnejšem testiranju smo jih shranili na - 20 °C do - 70 °C. Izogibali smo se tudi večkratnemu zamrzovanju in odtajevanju serumov. Zbrali smo dvainosemdeset serumov nosečnic in jih pregledali z sistemom Liaison in BEIA Toxo IgG avidity, dvema različnima testoma za določanje avidnosti protiteles IgG.

3.2 Metode

V diplomski nalogi smo primerjali dve diagnostični metodi za merjenje avidnosti protiteles IgG. Pri obeh metodah smo upoštevali navodila in postopke, ki jih določa proizvajalec. Vzorce, kjer je prišlo do neujemanj smo testirali še s tretjo metodo (*recomLine* imunoblot metoda).

3.2.1 BEIA Toxo IgG avidity

BEIA Toxo IgG avidity (S.p.A. Italiana Laboratori Bouty, Milano, Italija) je kvantitativni encimsko imunski – ELISA test za ugotavljanje avidnosti protiteles IgG proti *T. gondii* v človeškem serumu ali plazmi. Test je v obliki komercialnega kompleta diagnostičnih reagentov. Postopek ni avtomatiziran, ampak ga izvajamo oz. izvajajo ročno. Na Oddelku za parazitologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani ga uporabljajo kot osnovni test za določanje avidnosti protiteles IgG proti *T. gondii*. Velik pomen ima predvsem pri določanju avidnosti protiteles IgG pri nosečnicah, ki so pri presejalnem testiranju pozitivna na protitelesa IgG in IgM.

3.2.1.1 Princip metode

Vdolbinice mikrotiterskih ploščic so prekrte s specifičnim inaktiviranim antigenom toksoplazme. Vsak vzorec delamo v paralelnih ponovitvah (»A« in »B«). Vse vzorce (serum ali plazma) je pred izvedbo testa potrebno redčiti z raztopino za redčenje vzorca. Redčitve izvajamo po naslednji shemi:

Preglednica 3. 1: Redčitve vzorcev pri testu BEIA Toxo IgG Avidity.

IgG anti-Toxoplasma (IU/ml)	Redčitev
< 50	1:50
50 ÷ 100	1:100
100 ÷ 200	1:200
> 250	1:500 do 1:2000

V primeru, da so protitelesa IgG proti toksoplazmi prisotna v vzorcu, se ta med prvo inkubacijo vežejo na antigen vezan v vdolbinicah mikrotiterskih plošč in tvorijo kompleks antigen – protitelo. Po inkubaciji vdolbinice spiramo s spiralnim pufrom in tako odstranimo vse nereaktivne komponente seruma. V luknjice »A« dodamo spiralni puf, v luknjice »B« pa posebno raztopino, ki iz vdolbinic odstrani protitelesa IgG z nizko avidnostjo. Po inkubaciji in spiranju dodamo v vse luknjice protitelesa proti humanim protitelesom IgG z vezanim encimom hrenovo peroksidazo (HRP) - konjugat, ki se specifično vežejo na kompleks antigen - protitelo. Po spiranju nevezanega konjugata dodamo v vse luknjice substrat, ki se v primeru, da je v luknjicah prisotna hrenova peroksidaza obarva modro. Reakcijo ustavimo z dodatkom »stop« raztopine (1N H₂SO₄),

ta povzroči spremembo barve iz modre v rumeno. Intenziteto barve merimo z mikrotitrskim čitalcem s filtri valovne dolžine 450 in 620 nm. Optična gostota je proporcionalna količini specifičnih protiteles IgG vezanih v luknjicah.

V kompletu so vključeni kalibratorji, in sicer 25, 100, 200, 600 in 1200 mU/mL, na osnovi katerih izdelamo kalibracijsko krivuljo, ter dva kontrolna seruma s specifičnimi protitelesi z nizko avidnostjo (L) in specifičnimi protitelesi z visoko avidnostjo (H). Koncentracijo protiteles IgG v luknjicah »A« in »B« čitalec avtomatično preračuna na osnovi kalibracijske krivulje in jo izrazi v mU/mL. Razmerje med koncentracijama protiteles IgG v »A« in »B« luknjicah je indeks avidnosti protiteles v vzorcu.

$$\text{Avidnost}(\%) = \frac{\text{ostala_IgG_luknjica" B"}}{\text{vsa_IgG_luknjica" A"}} \times 100$$

3.2.1.2 Vrednotenje rezultatov

- Nizka avidnost: če je avidnost, ki je izražena v odstotkih, manjša od 15 % to pomeni, da je do okužbe prišlo v zadnjih 3. mesecih
- Srednja avidnost: če je avidnost med 15-25 % to pomeni, da je do okužbe prišlo v zadnjih 6. mesecih
- Visoka avidnost: če je avidnost večja kot 25 % to izključuje primarno okužbo v zadnjih 3. mesecih

3.2.2 Diagnostični sistem Liaison

Diagnostični sistem Liaison (DiaSorin, Saluggia, Italija) je avtomatiziran sistem, ki nam omogoča serološko dokazovanje različnih okužb z metodo kemiluminiscence (CLIA). Serološke teste izvajamo z pomočjo »integralov« (plastičnih kontejnerjev, ki vsebujejo vse potrebne reagentne za izvedbo testa), ki so specifični za določen parameter merjenja, npr. za protitelesa IgG, IgM ter IgG avidnost. Sistem nam omogoča uporabo več integralov hkrati in tako lahko istočasno na istem vzorcu izvajamo merjenje različnih parametrov.

Za potrebe diplomske naloge nam je proizvajalec DiaSorin podaril potrebno količino reagentov za izvedbo preiskav avidnosti protiteles IgG proti *T. gondii*. Z enim integralom smo lahko določili avidnost 25 serumom.

Liaison Toxo IgG Avidity II

Gre za indirektni kemiluminescenčni imunski test (chemiluminescence immunoassay - CLIA) za ugotavljanje avidnosti protiteles IgG proti *Toxoplasma gondii* v človeškem serumu ali plazmi.

3.2.2.1 Princip metode

Pri testu se uporabljajo magnetni delci, ki so obdani z antigeni *T. gondii* (trdna faza), in mišja monoklonska protitelesa proti človeškim protitelesom IgG, ki so povezana z derivatom izoluminola (konjugat izoluminol-protitelo). Jakost vezi med protitelesi IgG in antigeni *T. gondii* (IgG avidnost) v IgG pozitivnem vzorcu dobimo s primerjavo signala referenčnega vzorca (ki ni bil obdelan z ureo) in signala istega vzorca, ki je bil obdelan z ureo, ki prekine šibke vezi med protitelesi IgG in antigeni *T. gondii*. Med prvo inkubacijo se proti *T. gondii* specifična protitelesa, ki so prisotna v kalibratorjih, vzorcih ali kontrolah, vežejo na trdno fazo. Med drugo inkubacijo disociativni reagent deluje na vezi v kompleksu antigen-protitelo. Samo visoko avidna protitelesa IgG ostanejo vezana na trdno fazo, medtem ko se nizko avidna protitelesa odstranijo. Med zadnjo inkubacijo konjugat izoluminol-protitelo reagira s protitelesi IgG, ki so ostala vezana na trdno fazo. Po vsaki inkubaciji so nevezani reagenti odstranjeni s spiranjem. Na koncu so dodani starterski reagenti, ki povzročijo hitro kemiluminiscenčno reakcijo. Jakost svetlobnega signala, katerega moč je odvisna od količine konjugata izoluminol-protitelo, je izmerjena s fotopomnoževalnikom in izražena v relativnih svetlobnih enotah (RLU). Te so sorazmerne s koncentracijo *T. gondii* protiteles IgG v kalibratorjih, vzorcih ali kontrolah. Indeks IgG avidnosti dobimo z izračunom razmerja med vzorci obdelanimi z ureo in referenčnimi, neobdelanimi vzorci.

Če vzorec vsebuje več protiteles IgG proti *T. gondii* kot je merilno območje aparata, se vzorec razredči s funkcijo »Dilute« z redčitvenim faktorjem 1:10 (v primeru, da tudi ta redčitev ne zadošča se vzorec redči v razmerju 1:20), preden se izvede Toxo IgG avidnostni test. Če je vzorec nad merilnim območjem aparata se pojavi opozorilo »Invalid

Combi Partner displayed«. Vrednosti se avtomatično pomnožijo s faktorjem redčitve in na podlagi novih vrednosti se izračuna indeks avidnosti.

3.2.2.2 Vrednotenje rezultatov

Aparat meri vrednosti IgG avidnosti v območju med 0 in 1,00. Rezultate, ki jih dobimo interpretiramo na naslednji način:

- Nizka avidnost: vrednost indeksa IgG avidnosti je pod 0,30
- Mejna avidnost: vrednost indeksa IgG avidnosti je med 0,30 in 0,35
- Visoka avidnost: vrednosti indeksa avidnosti presegajo vrednost 0,35

V primeru da je vrednost indeksa avidnosti nad 0,950 moramo vzorec ponovno testirati. Če tudi pri drugem merjenju dobimo isti rezultat, lahko zaključimo, da gre za visoko avidna protitelesa.

3.3 *recomLine Toxoplasma IgG avidity*

Po testiranju vzorcev z obema metodama, smo se odločili, da neujemajoče rezultate testiramo še s tretjo metodo, ki temelji na metodi imunoblot. Odločili smo se za imunoblot test *recomLine Toxoplasma IgG Avidity* (Mikrogen, Neuried, Nemčija). Test smo izbrali zato, ker nam za razliko od ELISA testa, zaradi posamezno nanesenih antigenov, omogoča bolj zanesljiv dokaz specifičnih protiteles proti *T. gondii*. Rekombinantni antigeni, ki se uporabljajo v testu se izražajo v različnih fazah okužbe in že na podlagi analize le-teh, lahko pogosto opredelimo v kateri fazi je okužba oz. ali gre za akutno ali latentno okužbo. Metoda nam omogoča tudi inkubacijo diagnostičnih trakov z disociativnim reagentom in s tem možnost ugotavljanja jakosti vezave specifičnih protiteles IgG proti točno določenim antigenom parazita *T. gondii* oz. avidnosti. Pri metodi dobimo natančnejši imunološki profil kot pri ostalih metodah, s katerim lažje določimo čas v katerem je do okužbe prišlo. Z *recomLine* testom lahko ugotavljamo protitelesa IgG, IgM, IgA proti toksoplazmi, za vsak tip protiteles pa uporabljamo drug diagnostični komplet. Za določanje avidnosti IgG, uporabimo komplet za določanje protiteles IgG in dodatno raztopino za določanje avidnosti.

Pet rekombinantnih antigenov (ROP1, MAG1, SAG1, GRA7 in GRA8) parazita *Toxoplasma gondii* pridobijo s kloniranjem ustreznih genov v bakteriji *Escherichia coli*. Antigene nanesejo na nitrocelulozno membrano, ki jo nato razrežejo na trakove. Z analizo protiteles IgG z uporabo rekombinantnih antigenov lahko ločujemo med akutno in kronično okužbo, saj se značilna vzorca reakcij protiteles (akutne in kronične okužbe) bistveno razlikujeta. Specifična protitelesa IgG proti antigenom GRA7 in GRA8 so značilna za zelo svežo okužbo. Protitelesa proti SAG1 in MAG1 se pojavijo nekoliko kasneje. Test IgG avidnosti potrjuje te rezultate, saj protitelesa proti zgodaj prepoznanim antigenom dozori prej, kot protitelesa proti antigenom, ki se pojavijo v kasnejših fazah okužbe. Za interpretacijo avidnosti so pomembna samo protitelesa proti rekombinantnim antigenom MAG1, rSAG1 in GRA7 (Pfrepper, 2005).

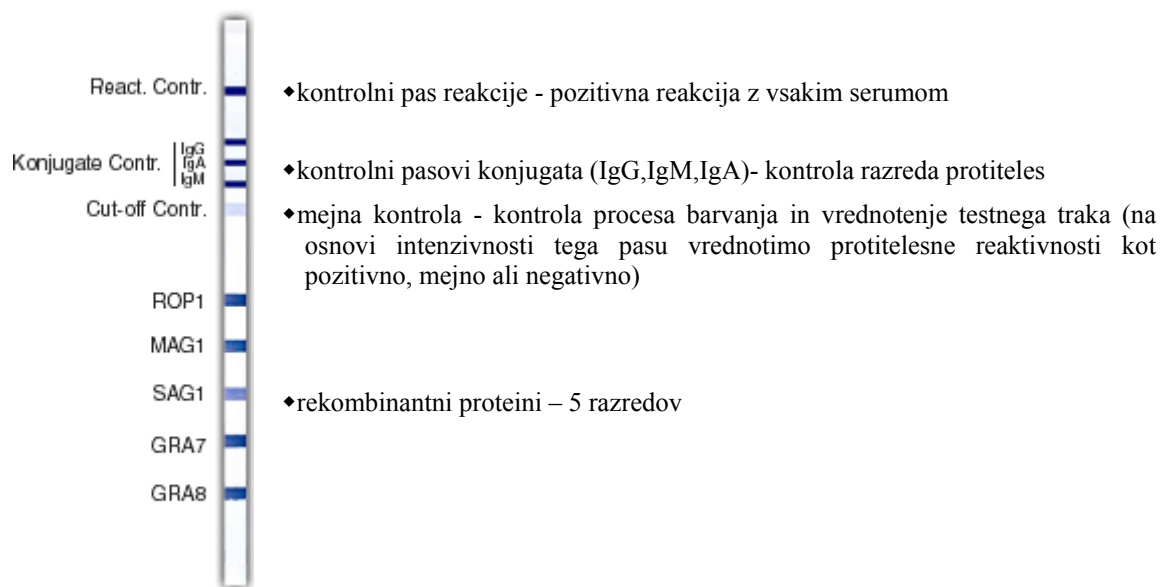
Preglednica 3. 2: Rekombinantni antigeni uporabljeni pri testu *recomLine* Toksoplazma.

Antigen	Oblika parazita, kjer je antigen prisoten	Lastnosti
ROP1 (p66) Antigen roptrijev	Tahiozoid Bradizoit	protitelesa IgG z nizko avidnostjo so pogosta v latentni fazi (ni več protiteles IgA in IgM, le še protitelesa IgG). Če je bila okužba v preteklosti, protiteles IgG za ta antigen ni.
MAG1 (p65) Matrični antigen	Bradizoit	protiteles IgG za ta antigen (nizka avidnost) ni na začetku faze I (prvi trije meseci okužbe)
rSAG1 (p30) Površinski antigen	Tahiozoid	protiteles IgG z nizko avidnostjo za ta protein ni do faze II (3. do 6. mesec okužbe). V latentni fazi ni protiteles IgG z nizko avidnostjo. Pozitivne vrednosti koncentracije protiteles IgG za ta antigen pogosto vztrajajo celo življenje.
GRA7 (p29) Granularni antigen	Tahiozoid Bradizoit	protitelesa IgG z nizko avidnostjo so prisotna že v zgodnji fazi I. Do konca faze I se protitelesom IgG zviša avidnost. Protitelesa IgG usmerjena proti antigenu GRA7 običajno lahko dokažemo vse življenje.
GRA8 (p35) Granularni antigen	Tahiozoid Bradizoit	protitelesa IgG z nizko avidnostjo so ponavadi prisotna že v zgodnji akutni fazi, pogosto pa tudi v subakutni in latentni fazi okužbe. Specifičnih protiteles proti tem antigenom nikoli ne moremo dokazati pri okužbi v daljni preteklosti.

3.3.1 Princip metode

Test za IgG avidnost izvajamo v dvojniku. V vse testne komore dodamo spiralni pufer, nato testne trakove z nanesenimi rekombinantnimi antigeni in nazadnje serum. Za hitrejše zaznavanje na toksoplazmo specifičnih protiteles moramo trakove inkubirati z redčenim serumskim ali plazemskim vzorcem. Med tem časom se protitelesa vežejo na antigene na testnih trakovih. Nevezana protitelesa speremo in nato v prve komore (paralelnih ponovitev) dodamo raztopino za določanje avidnosti v druge pa spiralni pufer. Sledi spiranje nevezanih protiteles oz. protiteles, ki so se odstranili iz kompleksa antigen-protitelo po obdelavi z raztopino za določanje avidnosti. Trakove inkubiramo z anti-humanimi IgG, ki imajo nase vezano hrenovo peroksidazo. Specifično vezana protitelesa zaznamo kot posledico barvne reakcije, ki jo katalizira peroksidaza. V primeru, da je potekla reakcija antigen-protitelo, se na ustreznem položaju na testnem traku pojavi temen pas.

3.3.2 Vrednotenje in interpretacija rezultatov



Slika 2: Testni trak *recomLine Toxoplasma IgG, IgM, IgA*.

Testne trakove po izvedenem testu nalepimo na liste, ki jih je pripravil proizvajalec za pomoč pri vrednotenju rezultatov in so priloženi zraven testa. Rezultate dobimo z pomočjo točkovnega sistema, ki ovrednoti ali je test pozitiven, negativen ali mejen. Točke dobijo samo tisti pasovi, ki so obarvani vsaj toliko kot mejni pas ali intenzivneje. Avidnost protiteles IgG ugotavljamo naknadno, s primerjavo jakosti posameznih pasov rekombinantnih antigenov MAG1, rSAG1 in GRA7 med paralelnimi vzorci.

3.3.2.1 Vrednotenje rezultatov protiteles IgG

Preglednica 3. 3: Vrednotenje točk *T. gondii* antigenov za protitelesa IgG pri testu *recomLine*.

Antigen	Točke
ROP1	1
MAG1	2
rSAG1	4
GRA7	4
GRA8	4

Vsakemu rekombinantnemu antigenu v primeru pozitivne reakcije dodelimo ustrezno število točk (tabela 3.3). Točke seštejemo in na podlagi točkovnih vrednosti (tabela 3.4) dobimo rezultate. Vrednosti rezultatov protiteles IgG proti *T. gondii* so lahko: negativna, mejna ali pozitivna.

Preglednica 3. 4: Vrednotenje testa za protitelesa IgG pri testu *recomLine*.

Vsota točk	Vrednotenje
≤ 3	Negativno
4 - 5	Mejno
≥ 6	Pozitivno

Če seštevek točk znaša manj kot 3, test ovrednotimo za negativen, v primeru, da je vsota med vrednostma 4 in 5, potem je vrednost protiteles IgG pri takem testu mejna. Vrednost testa 6 ali več pomeni, da je test pozitiven in takrat je smiselna izvedba dodatnega testa avidnosti.

3.3.2.2 Vrednotenje rezultatov avidnosti

Primerjamo samo jakost pasov antigenov MAG1, rSAG1 in GRA7.

- Nizka avidnost: jakost pasov se je zmanjšala za več kot 50 %, pri vzorcih obdelanih z raztopino za določanje avidnosti (v primerjavi z neobdelanimi vzorci)
- Mejna avidnost: jakost pasov se je zmanjšala za približno 50 %, pri vzorcih obdelanih z raztopino za določanje avidnosti
- Visoka avidnost: jakost pasov je enaka ali višja od 50 %, kot pri vzorcih, ki niso bili obdelani z raztopino za določanje avidnosti.

3.3.2.3 Interpretacija rezultatov

Pri interpretaciji rezultatov protiteles IgG in avidnosti si pomagamo s priloženo shemo (tabela 3.5).

Določene faze oz. stopnje okužbe s toksoplazmo odgovarjajo določenim časovnim obdobjem v katerih naj bi do okužbe prišlo:

- Faza I: ~ 0-3 mesece (sum na akutno okužbo)
- Faza II: ~ 3-6 mesecev (sum na akutno okužbo)
- Faza III: ~ 6-12 mesecev (sum na subakutno okužbo z vztrajajočimi IgM protitelesi)
- Faza IV: > 12 mesecev (latentna okužba)

Preglednica 3. 5: Običajni rezultati testa *recomLine* pri ugotavljanju avidnosti; (+)- pogosto reaktivno, ((+))- redko reaktivno, n - nizka avidnost, m – mejna avidnost, v – visoka avidnost.

Faza okužbe (I-IV)		ROP1	MAG1	rSAG1	GRA7	GRA8
Faza I	IgG	/	/	/	/	/
	IgG avidnost	/	/	/	/	/
	IgM	+	/	/	((+))	(+)
Faza I	IgG	+	(+)	((+))	+	+
	IgG avidnost	/	n⇒m	/	n⇒m⇒v	/
	IgM	+	/	/	((+))	(+)
Faza II	IgG	+	+	+	+	+
	IgG avidnost	/	m⇒v	n⇒m	v	/
	IgM	+	/	/	/	(+)
Faza III	IgG	+	+	+	+	+
	IgG avidnost	/	v	v	v	/
	IgM	+	/	/	/	((+))
Faza IV	IgG	(+)	+	+	+	(+)
	IgG avidnost	/	v	v	v	/
	IgM	/	/	/	/	/

3.4 Izračun občutljivosti in specifičnosti testov

Testa BEIA Toxo IgG avidity in Liaison smo ovrednotili glede občutljivosti in specifičnosti, izraženi v odstotkih. Občutljivost je sposobnost testa, da za pozitivni vzorec poda pozitivni rezultat. Specifičnost testa je sposobnost testa, da za negativni vzorec poda negativni rezultat. Občutljivost in specifičnost smo izračunali na naslednji način:

$$\text{Občutljivost (\%)} = \frac{\text{resnično pozitivni}}{\text{resnično pozitivni} + \text{lažno negativni}} \times 100 \%$$

$$\text{Specifičnost (\%)} = \frac{\text{resnično negativni}}{\text{resnično negativni} + \text{lažno pozitivni}} \times 100 \%$$

4 REZULTATI

V diplomski nalogi smo primerjali dve metodi (BEIA Toxo IgG Avidity, Liaison metoda) za ugotavljanje nedavne toksoplazemske okužbe. Z metodama smo pregledali 82 nosečnic s sumom na akutno toksoplazmozo. Od 82 vzorcev smo s diagnostičnim kompletom BEIA Toxo IgG Avidity določili 53 (64,7 %) vzorcev z visoko avidnostjo, 12 (14,6 %) vzorcev z mejno avidnostjo in 17 (20,7 %) vzorcev z nizko avidnostjo. Pri sistemu Liaison smo dobili 49 (59,8 %) vzorcev z visoko avidnostjo, 6 (7,3 %) z mejno avidnostjo in 27 (32,9 %) vzorcev z nizko avidnostjo.

Preglednica 4. 1: Primerjava vrednosti oz. deležev avidnosti testa BEIA Toxo IgG Avidity in sistema Liaison.

	Avidnost		
	visoka	mejna	nizka
BEIA Toxo IgG Avidity	53 (64,7 %)	12 (14,6 %)	17(20,7 %)
Liaison	49 (59,8 %)	6 (7,3 %)	27 (32,9 %)

Iz rezultatov lahko razberemo, da je testiranje z obema metodama pokazalo, da je večina testiranih vzorcev visoko avidnih, kar pomeni, da gre za latentno okužbo. Odstopanje med metodama se je pokazalo pri številu vzorcev z mejno in nizko avidnostjo. Z metodo BEIA Toxo IgG Avidity diagnostičnim kompletom smo odkrili več vzorcev z mejno avidnostjo 14,6 %, kot s sistemom Liaison 7,3 %. S sistemom Liaison smo določili več nizko avidnih vzorcev 32,9 %, v primerjavi z BEIA Toxo IgG Avidity 20,7 %.

Preglednica 4. 2: Ujemanje rezultatov avidnosti testa BEIA Toxo IgG Avidity in sistema Liaison.

	Število oz. delež vzorcev				Število oz. delež ujemajočih vzorcev
	Testirano z obema metodama	Visoka avidnost z obema metodama	Mejna avidnost z obema metodama	Nizka avidnost z obema metodama	
IgG avidnost	82 (100 %)	43(52,4 %)	2 (2,5 %)	17 (20,7 %)	62(75,6 %)

Ugotovili smo, da se pri meritvah avidnosti protiteles IgG z obema metodama ujema 62 vzorcev oz. 75,6 %. Rezultat avidnosti se je torej razlikoval pri 20 (24,4 %) vzorcih.

Vzorci pri katerih se je pokazalo odstopanje smo izločili na podlagi križne tabele in poskušali ugotoviti s katero metodo smo dobili pravilne rezultate.

Preglednica 4. 3: Križna tabela – primerjava rezultatov BEIA Toxo IgG Avidity in sistema Liaison.

		LIAISON				
		Avidnost (n=82)				
BEIA Toxo IgG Avidity	Avidnost (n=82)		Visoka	Mejna	Nizka	Vsota
		Visoka	43	4	6	53
		Mejna	6	2	4	12
		Nizka	0	0	17	17
	Vsota	49	6	27	82	

Rezultati dvojnega testiranja so se ujemale pri 62 vzorcih (75,6 %). Z obema metodama smo visoko avidnost ugotovili pri 43 vzorcih (52,4 %), nizko avidnost smo ugotovili pri 17 (20,7 %) vzorcih, 2 (2,5 %) vzorca pa sta obe metodi določili za mejno avidna.

Iz tabele je razvidno, da se neujemanja avidnosti pojavljajo pri vzorcih, ki so bili z metodo BEIA Toxo IgG Avidity mejni, s sistemom Liaison pa visoko ali nizko avidni. Neujemanja so tudi pri vzorcih, ki so bili z BEIA Toxo IgG Avidity testom nizko avidni z Liaisonom pa so pokazali visoko ali mejno avidnost. Vse vzorce, ki smo jih s testom BEIA Toxo IgG Avidity ugotovili kot nizko avidne, je tudi sistem Liaison opredelil kot nizko avidne.

Vsi vzorci, ki so bili nizko avidni z metodo BEIA Toxo IgG Avidity so bili nizko avidni tudi s sistemom Liaison.

4.1 Tolmačenje rezultatov z metodo *recomLine*

Vzorci kjer je prišlo do največjih odstopanj smo pregledali s tretjo metodo, *recomLine* imunoblot. Metoda temelji na dokazovanju petih rekombinantnih antigenov na podlagi katerih lahko z večjo zanesljivostjo določimo fazo okužbe oz. čas v katerem je do okužbe prišlo.

S tem testom smo testirali 6 vzorcev, ki so bili s testom BEIA Toxo IgG Avidity določeni kot visoko avidni, z metodo Liaison pa nizko avidni.

Preglednica 4. 4: Vrednosti protiteles IgG, IgM in avidnosti pri katerih je prišlo do neujmanja metode BEIA Toxo IgG Avidity (visoka avidnost) in metode Liaison (nizka avidnost); NT – ni bilo testirano.

VZOREC	Št.	IgG		IgM		Avidnost			
		cobas	liaison	cobas	liaison	BEIA Toxo IgG Avidity	BEIA Toxo IgG Avidity	liaison	liaison
10324	91	+	+	-	+	37,4 %	V	0,283	N
10442	99	+	+	+	+	30,0 %	V	0,164	N
10989	126	+	+	-	+/-	29,5 %	V	0,268	N
11148	130	+	+	-	+/-	28,0 %	V	0,101	N
11883	167	+	+	+	+	48,2 %	V	0,166	N
12386	178	+	NT	+	NT	29,8 %	V	0,218	N

Pri dveh vzorcih smo z imunoblot testom ugotovili staro okužbo. Zaradi prisotnosti protiteles IgM pri enem od vzorcev menimo, da je šlo za subakutno okužbo z vztrajajočimi protitelesi IgM. Glede na serološki profil seruma (glede na tabelo 9) smo ugotovili, da gre za okužbo v fazi III, torej okužbo staro več kot pol leta.

Rezultati dveh vzorcev ki smo jih dobili z *recomLine* metodo, so kazali na okužbo v fazi II, torej na akutno okužbo do katere je prišlo pred 3 – 6 meseci.

Pri enem vzorcu smo z imunoblot metodo dobili rezultate, ki kažejo na možnost akutne okužbe (faza I). Ta rezultat nakazuje na prisotnost protiteles IgG z nizko avidnostjo. Vendar na podlagi analize rekombinantnih antigenov (serološkega profila) vzorca, tega nismo mogli z gotovostjo trditi in bi bilo potrebno nadaljnje sledenje in odvzem parnega seruma, da bi rezultate lahko potrdili. Rezultate moramo v tem primeru razlagati s previdnostjo (v nadaljnjem tolmačenju rezultatov ta rezultat obravnavamo kot nizko aviden).

Z *recomLine* testom smo v primeru enega seruma dobili negativen rezultat protiteles IgG, kar kaže na možnost, da smo z obema avtomatiziranimi sistemoma določevanja koncentracije protiteles IgG dobili lažno pozitivne rezultate ali da z imunoblot metodo zaradi njene nizke občutljivosti, nismo zaznali protiteles IgG v začetni fazi okužbe.

Preglednica 4. 5: Vrednosti IgG avidnosti neujemajočih vzorcev s tremi testi (testom BEIA Toxo IgG Avidity, sistemom Liaison in testom *recomLine*).

avidnost	BEIA Toxo IgG Avidity	Liaison	<i>recomLine</i>
visoka	6		2
mejna			
nizka		6	3
nedoločena			1

RecomLine metoda kaže odstopanja tako z metodo BEIA Toxo IgG Avidity, kot tudi s sistemom Liaison. Od šestih vzorcev smo lahko 3 dokazali kot nizko avidne, 2 pa kot visoko avidna. En vzorec je bil z imunoblot metodo negativen za protitelesa IgG zato je njegova interpretacija IgG avidnosti nemogoča. Ta vzorec je bil izključen iz nadaljnje interpretacije rezultatov.

Po testiranju nejasnih vzorcev s testom *recomLine* smo ugotovili, so bili pri testu BEIA Toxo IgG Avidity 3 vzorci (3,7 %) neskladni, test pa je pravilno določil avidnost pri 64 serumih (78,0 %).

RecomLine test je pri sistemu Liaison ugotovil 2 neujemajoča (2,4 %) vzorca. Avidnost je sistem Liaison pravilno določil pri 65 vzorcih (79,3 %).

Nepojasnjenih je ostalo 14 (17,1 %) vzorcev, ki so bili z eno metodo mejni z drugo pa visoko oz. nizko avidni.

Preglednica 4. 6: Primerjava rezultatov avidnosti IgG obeh metod (testa BEIA Toxo IgG Avidity in sistema Liaison) po testiranju z *recomLine* testom.

metoda	število oz. delež				
	Vsi testirani vzorci	Ujemajoči vzorci	Neujemajoči vzorci	Nepojasnjeni vzorci	Izključeni vzorci
BEIA Toxo IgG Avidity	82 (100 %)	64 (78,0 %)	3 (3,7 %)	14 (17,1 %)	1 (1,2 %)
Liaison	82 (100 %)	65 (79,3 %)	2 (2,4 %)	14 (17,1 %)	1 (1,2 %)

4.2 Izračun občutljivosti in specifičnosti testov

Na podlagi rezultatov smo izračunali tudi občutljivost in specifičnost obeh testov.

Rezultate, ki so bili lažno visoko avidni (metoda *recomLine* je kazala na akutno okužbo) smo pri izračunu obravnavali kot lažno negativne rezultate.

Lažno nizko avidne rezultate (metoda *recomLine* je kazala na staro oz. latentno okužbo) smo pri izračunu obravnavali kot lažno pozitivne rezultate.

$$\begin{array}{l} \text{Občutljivost (\%)} \\ \text{(BEIA Toxo IgG} \\ \text{Avidity)} \end{array} = \frac{17}{17 + 3} \times 100 \% = 85 \%$$

$$\begin{array}{l} \text{Občutljivost (\%)} \\ \text{(Liaison)} \end{array} = \frac{20}{20 + 0} \times 100 \% = 100 \%$$

Z diagnostičnim kompletom BEIA Toxo IgG Avidity smo ugotovili 17 rezultatov z nizko avidnostjo, pri testiranju pa je metoda glede na test *recomLine* zgrešila tri vzorce z nizko avidnostjo. Iz teh podatkov lahko izračunamo občutljivost metode BEIA Toxo IgG Avidity, ki je 85 %. Liaison je glede na test *recomLine* pravilno določil nizko avidnost pri vseh testiranih pozitivnih vzorcih, zato je občutljivost metode 100 %.

$$\begin{array}{l} \text{Specifičnost (\%)} \\ \text{(BEIA Toxo IgG} \\ \text{Avidity)} \end{array} = \frac{45}{45 + 0} \times 100 \% = 100 \%$$

$$\begin{array}{l} \text{Specifičnost (\%)} \\ \text{(Liaison)} \end{array} = \frac{43}{43 + 2} \times 100 \% = 95,5 \%$$

Z metodo BEIA Toxo IgG Avidity smo glede na test *recomLine* vse visoko avidne rezultate določili pravilno in nismo zgrešili nobenega negativnega vzorca, zato je specifičnost metode 100 %. Nižjo specifičnost ima sistem Liaison, saj smo od 45 visoko avidnih rezultatov, 2 vzorca določil kot nizko avidna, torej smo z metodo Liaison dobili dva lažna nizko avidna rezultata. Specifičnost sistema Liaison je zato 95,5 %.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Toksoplazmoza je bolezen, ki jo povzroča parazit *T. gondii* in je ena od najbolj pogostih parazitskih bolezní pri človeku. Medtem ko bolezen ne predstavlja posebne nevarnosti v normalni populaciji, pa lahko ima resne posledice pri imunsko oslabljenih osebah in predvsem pri nosečnicah, kjer lahko pride do okužbe ploda oziroma t.i. kongenitalne toksoplazmoze, ki lahko vodi do smrti ploda in splava, ali pa ima okuženi novorojenček resne posledice bolezní. Serološko testiranje (presejalno testiranje, določanje avidnosti protiteles IgG, določanje protiteles IgA) ima pomembno vlogo predvsem pri diagnostiki toksoplazmoze pri nosečnicah in manjšo vlogo pri imunsko oslabljenih osebah, saj zaradi nepravilnega delovanja imunskega sistema rezultati serološkega testiranja ne dajo ustreznega podatka o bolezní. Z določanjem avidnosti protiteles IgG ne moremo potrditi akutne okužbe, lahko pa ugotovimo ali je do okužbe prišlo v zadnjih 6 mesecih. Prednost metode je v tem, da lahko na podlagi analize enega vzorca izključimo možnost akutne okužbe. Z določanje protiteles IgG in IgM lahko akutno okužbo potrdimo oz. ovržemo šele z odvzemom parnih serumov in ugotavljanjem količine protiteles oz. naraščanjem koncentracij teh protiteles. Določanje avidnosti protiteles IgG nam tako služi kot pomembno orodje pri dopolnjevanju presejalnega testiranja in omogoči hitrejšo in bolj učinkovito diagnostiko kongenitalne toksoplazmoze.

V diplomski nalogi smo primerjali dve diagnostični metodi določanja avidnosti protiteles IgG. BEIA Toxo IgG Avidity je na tržišču dostopen v obliki diagnostičnega kompleta. Temelji na osnovi ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) testa. Test uporabljajo v rutinski diagnostiki kongenitalne toksoplazmoze. Test je namenjen ročni izvedbi, zato dopušča možnost napak, ki so posledica človeškega dejavnika. Ta test smo primerjali z avtomatiziranim sistemom Liaison. Sistem temelji na kemiluminiscenčni metodi (CLIA - chemiluminescence immunoassay). Z obema metodama smo testirali 82 vzorcev in na podlagi rezultatov poskušali ugotoviti katera metoda je učinkovitejša pri določanju avidnosti protiteles IgG. Ugotavljali smo tudi, če je sistem Liaison primerna zamenjava testnega kompleta BEIA Toxo IgG Avidity za določanje avidnosti IgG pri *T. gondii* v rutinski diagnostiki kongenitalne toksoplazmoze. Diagnostični sistem Liaison bi lahko

moderniziral in pospešil diagnostiko ugotavljanja avidnosti protiteles IgG, saj je popolnoma avtomatiziran.

Sistem Liaison je bil vključen v raziskavo laboratorijev iz cele Evrope, kjer so sistem ovrednotili in primerjali z drugimi diagnostičnimi sistemi oz. metodami za merjenje protiteles IgG, IgM in avidnosti. Avidnost so določali pri 103 serumskih vzorcih in rezultate primerjali z polavtomatskim sistemom VIDAS. Več vzorcev je kazalo nizko avidnost (lažen rezultat), kljub temu, da je od okužbe preteklo več kot 4 mesece, zato so za nadaljnjo analizo izbrali samo 32 vzorcev posameznic z akutno okužbo, ki niso bile noseče. Te osebe niso bile zdravljene, zato ni bilo vpliva zdravljenja na določanje avidnosti. Zdravljenje proti parazitu *T. gondii* lahko vpliva tudi na zorenje protiteles IgG in s tem avidnost. Primerjava rezultatov obeh sistemov je pokazala visok koeficient korelacije 0,81. V študiji se je pokazal problem vztrajajočih protiteles IgG proti *T. gondii* z nizko avidnostjo, ki ga ne moremo povezovati s samim principom metode (Petersen in sod., 2005).

Narejena je bila tudi raziskava kjer so ovrednotili sistem VIDAS za določanje avidnosti protiteles IgG. Rezultate sistema so ovrednotili s primerjavo toksoplazemskega serološkega profila (TSP), ki je vključeval testiranje protiteles IgG, IgM, IgA in IgE proti parazitu *T. gondii*. Testirali so 132 serumov nosečnic v prvih 16 tednih nosečnosti. S sistemom VIDAS so dobili 5 lažnih visoko avidnih rezultatov od 16 serumov z dokazano akutno boleznijo (na podlagi TSP) in 2 nizko avidna rezultata od 69 kroničnih primerov bolezni (Montoya in sod., 2002).

Preglednica 5. 1: Primerjava rezultatov VIDAS testa IgG avidnosti in TSP rezultatov za 132 serumov nosečnic (Montoya in sod., 2002).

Rezultat testa avidnost	Število (%) vzorcev na podlagi TSP profila		
	Akutna (n=16)	Mejna (n=47)	Kronična (n=69)
Nizka	8 (50)	7 (14,9)	2 (2,9)
Mejna	3 (18,7)	10 (21,3)	5 (7,2)
Visoka	5 (31,3)	30 (63,8)	62 (89,9)

Testni komplet proizvajalca Bounty (BEIA Toxo IgG Avidity) so ovrednotili v slovenski študiji, kjer so ocenjevali uporabnost metode določevanja avidnosti protiteles IgG proti parazitu *T. gondii* v rutinski diagnostiki toksoplazmoze. S testom so pravilno določili vseh 25 primerov akutne okužbe in 47 primerov stare okužbe od 165 testiranih vzorcev.

Rezultate testa so ovrednotili na podlagi kliničnih podatkov in imunskega statusa nosečnice (Logar in sod., 1999).

V vseh treh raziskavah so ugotovili, da je določanje IgG avidnosti proti *T. gondii* zelo uporabna diagnostična tehnika za izključitev možnosti nedavno pridobljene okužbe (okužba stara več kot 4 oz. 6 mesecev) v kombinaciji z drugimi serološkimi metodami (predvsem določanje IgM protiteles), ki je posebej koristna, če imamo za diagnosticiranje na voljo le en serum.

Na podlagi naših rezultatov smo ugotovili, da sta obe metodi primerljivi. S sistemom Liaison smo več rezultatov določili kot nizko avidnih 28 (32,9 %), kot s testom BEIA Toxo IgG Avidity 17 (20,7 %). Pomemben je tudi podatek, da smo od 82 testiranih vzorcev s sistemom Liaison samo pri 6 (7,3 %) testiranih vzorcih dobili višjo avidnost kot pri testu BEIA Toxo IgG Avidity. V ostalih primerih je bila vrednost avidnosti enaka oziroma pri neujemajočih vzorcih nižja kot pri testiranju s diagnostičnim kompletom BEIA Toxo IgG Avidity. To nakazuje na dejstvo, da je sistem Liaison bolj občutljiva metoda oziroma na to, da so meje pri določanju nizke in mejne avidnosti postavljene nižje kot pri kompletu BEIA Toxo IgG Avidity. Pri testu Liaison tako obstaja večja možnost lažnih nizko avidnih rezultatov. To nam potrjujejo tudi rezultati testiranja z dodatno metodo *recomLine*, saj smo od 6 neujemajočih serumov, ki so z eno metodo pokazali visoko z drugo pa nizko avidnost, ugotovili 2 lažno nizko avidna seruma. S sistemom Liaison nismo dobili lažnih rezultatov visoke avidnosti.

Z razliko od sistema Liaison smo s testom BEIA Toxo IgG Avidity od 82 testiranih vzorcev indetificirali samo 17 (20,7 %) nizko avidnih vzorcev, ki smo jih kot nizko avidne določili tudi s sistemom Liaison. S testom BEIA Toxo IgG Avidity smo pri neujemajočih vzorcih, dobili višjo avidnost pri 14 (14,1 %) vzorcih kot s sistemom Liaison. Naši rezultati kažejo, da je pri tem testu večja možnost lažno visoko avidnih rezultatov, kot pri sistemu Liaison. Tudi s testom imunoblot *recomLine* smo prepoznali 3 vzorce za lažno visoko avidne s testom BEIA Toxo IgG Avidity. S testom BEIA Toxo IgG Avidity nismo dobili lažno nizko avidnih rezultatov.

Na podlagi vseh testiranj smo določili tudi občutljivost in specifičnost obeh metod. Pri testu BEIA Toxo IgG Avidity je občutljivost metode 85 %, specifičnost pa 100 %. Pri sistemu Liaison je občutljivost metode 100 %, test pa ima slabšo specifičnost 95,5 % kot test BEIA Toxo IgG Avidity. Pri enem vzorcu nizka avidnost z imunoblot metodo ni bila

potrjena. Če upoštevamo, da je ta vzorec visoko aviden potem se občutljivost metode BEIA Toxo IgG Avidity zviša na 90 %, specifičnost metode Liaison pa zniža na 91,3 %.

Lažen rezultat nizke avidnosti ima pri ugotavljanju avidnosti protiteles IgG proti *T. gondii* manjše posledice kot lažen rezultat visoke avidnosti. Pri lažno nizko avidnem so potrebne dodatne diagnostične preiskave, ki lahko vključujejo tudi neposredne metode ugotavljanja okužbe. Dodatne preiskave imajo za posledico večje stroške diagnostike. Lažno visoko aviden rezultat izključuje možnost okužbe v zadnjih 6 mesecih in s tem tudi nevarnost za okužbo ploda. Nosečnico z lažno visoko avidnim rezultatom obravnavamo kot nosečnico, ki je okužbo prebolela v preteklosti in ne izvajamo dodatnih seroloških testov in testov sledenja. To ima lahko hude posledice za plod in nosečnico saj lahko vodi do splava, poškodbe in celo smrti ploda.

Pri testu BEIA Toxo IgG Avidity ne smemo zanemariti možnosti človeške napake pri izvedbi testa. Postopek je dobro opisan in standardiziran, testni komplet ima vključeno pozitivno in negativno kontrolo, vendar vseeno lahko pride do napake zaradi dela laboranta, ki test izvaja in sicer v različnih fazah izvedbe testa (redčenje serumov, spiranje, itd) Mikrotitirske ploščice bere avtomatski optični čitalec, tako da pri končnem branju rezultatov ni prisotne napake zaradi subjektivnega človeškega faktorja.

Pri sistemu Liaison je postopek določanja IgG avidnosti v celoti avtomatiziran. V sistem vstavimo ustrezen serum opremljen s črtno kodo (kar dodatno zmanjša možnost zamenjave serumov) nato poteče popolnoma avtomatiziran postopek, ki vključuje tudi redčenje serumov. Na koncu se rezultat avidnosti za določen serum lahko sam prenese v informacijski sistem.

Pomemben je tudi čas oz. hitrost izvedbe obeh testov. Izvedba BEIA Toxo IgG Avidity testa traja minimalno 1 uro in 45 minut, čas pa je odvisen tudi od izkušenosti laboranta, ki test izvaja in števila vzorcev, ki so vključeni v testiranje. V nasprotju s testom BEIA Toxo IgG Avidity, je test Liaison avtomatiziran, kar pomeni, da za izvedbo ne potrebujemo izkušenega laboranta, ampak vzorec enostavno vstavimo v sistem. Testiranje vzorca s sistemom Liaison traja 50 minut in omogoča istočasno analizo 30 vzorcev. Sistem lahko pregleda 30 vzorcev v 1 uri.

Ugotovili smo, da sta obe metodi primerni za diagnostiko določanja avidnosti protiteles IgG. Test BEIA Toxo IgG Avidity je preizkušena metoda, saj jo že več let uporabljajo v rutinski diagnostiki določanja IgG avidnosti pri kongenitalni toksoplazmozi na Oddelku za

parazitologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Tudi s sistemom Liaison smo dobili dobre rezultate, vendar menimo, da bi bilo koristno pred uvedbo v rutinsko diagnostiko potrebno še dodatno testiranje vključno z uporabo imunoblot testa.

5.1 Sklepi

- V diplomski nalogi primerjali dve diagnostični metodi, BEIA Toxo IgG avidity in sistem Liaison, za določevanje avidnosti protiteles IgG proti parazitu *Toxoplasma gondii*. Rezultate obeh testov smo med seboj primerjali in ovrednotili.
- Pregledali smo 82 serumov nosečnic s pozitivnimi vrednostmi protiteles IgG in IgM, pri katerih je obstajal sum za akutno toksoplazemsko okužbo.
- Rezultati avidnosti protiteles IgG so se z obema metodama ujemali pri 62 (75,6 %) serumih, razlikovali pa pri 20 (24,4 %) serumih.
- Test BEIA Toxo IgG avidity je določil višjo ali enako avidnost pri 76 (92,7 %) serumih v primerjavi s sistemom Liaison, nižjo pa je pri 6 (7,3 %) serumih.
- Pri sistemu Liaison smo ugotovili 100% občutljivost, pri testu BEIA Toxo IgG avidity pa 85 % občutljivost. Test BEIA Toxo IgG avidity je imel višjo specifičnost (100 %), v primerjavi s sistemom Liaison (95,5 %).
- Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da je diagnostični sistem Liaison je bolj občutljiv, kot test BEIA Toxo IgG avidity. Test BEIA Toxo IgG avidity pa bolj specifičen kot test Liaison.
- Izvedba testa BEIA Toxo IgG avidity je bolj zahtevna (izvedba zahteva izkušenega laboratorijskega delavca), dolgotrajnejša in z večjo možnostjo napak. Zato bi v bodoče

avtomatiziran sistem Liaison morda lahko predstavlja primerno zamenjavo diagnostičnega kompleta BEIA Toxo IgG avidity.

- Menimo, da sta obe metodi primerni za določanje avidnosti protiteles IgG proti *Toxoplasma gondii* v rutinski diagnostiki toksoplazmoze.

6 POVZETEK

Okužba s *Toxoplasma gondii* je ena od najbolj razširjenih parazitskih boleznih na svetu. Bolezen je navadno asimptomatska. Okužba s parazitom je nevarna pri imunsko oslabljenih osebah in pri nosečnicah, kjer lahko paraziti preko placentе okužijo plod in povzročajo t.i. kongenitalno toksoplazmozo. Človek se s parazitom lahko okuži z zaužitjem premalo termično obdelanega mesa, ki vsebuje tkivne ciste parazita, ali z zaužitjem hrane oz. vode okužene z mačjimi iztrebki, v katerih je prisotna oocista. Mačka je končni gostitelj parazita.

Presejalno testiranje na kongenitalno toksoplazmozo so v Sloveniji uvedli leta 1995. Nosečnice pregledujejo v prvem, drugem in tretjem trimesečju nosečnosti. Serume pregledujejo na protitelesa IgG in IgM proti *T. gondii*. V primeru da sta oba testa pozitivna, to kaže na svežo primarno okužbo, ki je nevarna za plod. V takem primeru je potrebno narediti še test avidnosti protiteles IgG proti *T. gondii*. S tem testom ugotavljamo moč vezave protiteles na toksoplazemski antigen. Moč vezi v kompleksu protitelo-antigen s časom narašča. Na podlagi tega testa lahko ločimo svežo okužbo in okužbo staro več kot 6 mesecev. S testom avidnosti lahko izključimo tri četrtine nosečnic, pri katerih je obstajal sum na primarno okužbo.

V diplomski nalogi smo naredili primerjavo dveh diagnostičnih metod za določanje avidnosti protiteles IgG proti *T. gondii*. Primerjali smo test BEIA Toxo IgG avidity (S.p.A. Italiana Laboratori Bouty, Milano, Italija), ki ga izvajamo ročno, z avtomatiziranim sistemom Liaison (DiaSorin, Sallugia, Italija). Testirali smo 82 serumov nosečnic, pri katerih smo ugotovili prisotnost IgG in IgM proti parazitu. Metodi sta se ujemale pri 62 (75,6 %) vzorcih, razlikovali pa pri 20 (24,4 %) vzorcih. Odstopanj pri mejnih avidnostih (14 vzorcev; 17,1 %), nismo dodatno analizirali. Osredotočili smo se na 6 (7,3 %) vzorcev, ki so s testom BEIA Toxo IgG avidity pokazali visoko avidnost, s sistemom Liaison pa nizko avidnost. Te vzorce smo dodatno testirali z *recomLine* imunoblot testom (Mikrogen, Neuried, Nemčija). Z rezultati tega testa smo ugotovili, da smo s sistemom Liaison dobili 2 lažna rezultata nizke avidnosti in s testom BEIA Toxo IgG avidity 3 lažne rezultate visoke avidnosti (pri 1 nismo dokončno uspeli dokazati akutne okužbe, vendar smo ga vseeno obravnavali kot lažno negativnega). Rezultati imunoblot testa so pri enem določili

negativno vrednost protiteles IgG zato smo ga izključili iz nadaljnje analize. Izračunali smo 85 % občutljivost za test BEIA Toxo IgG avidity in 100 % občutljivost za metodo Liaison. Za test BEIA Toxo IgG avidity smo ugotovili 100 % specifičnost, za Liaison pa 95,5 % specifičnost.

Menimo, da sta obe metodi (ob predhodnem testiranju serumov na protitelesa IgG in IgM) primerni za določanje avidnosti protiteles IgG proti *Toxoplasma gondii* v rutinski diagnostiki toksoplazmoze.

7 VIRI

- Barker K. F., Holliman R. E. 1992. Laboratory techniques in the investigation of toxoplasmosis. *Genitourinary Medicine*, 68: 55-59
- Bastien P. 2002. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96, Suppl 1: S 205 – S 215
- Bhopale G. M. 2003. Pathogenesis of toxoplasmosis. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 26: 213-222
- Bhopale G. M. 2003. Development of a vaccine for toxoplasmosis: Current status. *Microbes and Infection*, 5: 457-462
- Dubey J. P. 2008. The history of *Toxoplasma gondii*—the first 100 years. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55, 6: 467-475
- Dubey J. P., Lindsay D. S., Speer C. A. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 2: 267-299
- Dubey J. P. 1998. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 28: 1019-1024
- Elizabeth A. I. 1997. Toxoplasmosis: Comparative species susceptibility and host immune response. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 20, 2: 131-138
- Fleck J. 1989. Annotation: Diagnosis of toxoplasmosis. *Journal of Clinical Pathology*, 42: 191-193

- Gagne S. S. 2001. Toxoplasmosis. Primary Care Update for Ob/Gyns, 8, 3: 122-126
- Ho-Yen D. O. 1990. Toxoplasmosis in humans: Discussion paper. Journal of the Royal Society of Medicine, 83: 571-573
- Holliman R. E. 1995. Congenital toxoplasmosis: Prevention, screening and treatment. Journal of Hospital Infection, 30: 179-190
- Jenum P. A., Stray-Pedersen B., Gundersen A. G. 1997. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. Journal of Clinical Microbiology, 35: 1972-1977
- Jones J. L., Lopez A., Wilson M., Schulkin J., Gibbs R. 2001. Congenital toxoplasmosis: A review. Obstetrical and Gynecological Survey, 56, 5:296-305
- Kim K., Weiss L. M. 2004. *Toxoplasma gondii*: The model apicomplexan. International Journal of Parasitology, 34: 423-432
- Kim K., Weiss L. M. 2008. *Toxoplasma*: The next 100 years. Microbes and Infection, 10: 978-984
- Kravetz J. D., Federman D. G. 2005. Toxoplasmosis in pregnancy. American Journal of Medicine, 118, 3: 212-216
- Lappalainen M., Hedman K. 2004. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. Annali dell'Instituto Superiore di Sanita, 40, 1: 81-88
- Logar J. 1999. Parazitologija v medicini. 1. izd. Ljubljana, DZS: 64-74
- Logar J., Novak-Antolič Ž., Zore A. 1999. Specific IgG avidity – A supplementary assay in serological screening for toxoplasmosis in pregnancy. Journal of Infection, 38: 61-63

- Logar J., Petrovec M., Novak-Antolič Ž., Premru-Sršen T., Čižman M., Arnež M., Kraut A. 2002. Prevention of congenital toxoplasmosis in Slovenia by serological screening of pregnant women. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 34: 201-204
- Logar J., Žohar-Čretnik T., Štorman A., Premru-Sršen T., Novak-Antolič Ž., Arnež M., Kraut A., Stirn-Kranjc B. 2006. Presejalno testiranje na okužbo s *Toxoplasma gondii* v nosečnosti. *Medicinski razgledi*, 45, S 3: 17-20
- Montoya J. G., Liesenfeld O. 2004. Toxoplasmosis. *Lancet*, 363: 1965-1976
- Montoya J., Liesenfeld O., Kinney S., Press C., Remington J. 2002. VIDAS test for avidity of toxoplasma-specific immunoglobulin G for confirmatory testing of pregnant women. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 2504-2508
- Mehlhorn H., Frenkel J. K., Raether W., Walldorf V., Harder A. 2008. *Toxoplasma gondii*. V : *Encyclopedia of parasitology*. Mehlhorn H. (ed.). 3rd ed. Berlin, Springer-Verlag: 1422-1433
- Petersen E., Borobio M. V., Guy E., Liesenfeld O., Meroni V., Naessens A., Spranzi E., Thulliez P. 2005. European multicenter study of the LIAISON automated diagnostic system for determination of *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM and the IgG avidity index. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 4: 1570-1574
- Pfreppe K. I., Enders G., Gohl M., Krczal D., Hlobil H., Wassenberg D., Soutschek E. 2005. Seroreactivity to and avidity for recombinant antigens in toxoplasmosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12, 8: 977-982
- Remington J. S., Thulliez P., Montoya J. G. 2004. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3: 941-945
- Wikerhauser T., Brglez J. 1996. Atlas parazitov povzročiteljev zoonoz na Hrvaškem in v Sloveniji. Zagreb, Školska knjiga: 11-13

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorju doc. dr. Miroslavu Petrovcu, ki me je s svojim spodbudnim in sproščenim pristopom vodil skozi izdelavo diplomske naloge.

Somentorju prof. dr. Jerneju Logarju se zahvaljujem za nasvete in pomoč pri pisanju diplome.

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Tatjani Avšič Županc za prijaznost in hiter pregled diplome.

Osebu Laboratorija za diagnostiko virusnih infekcij in Laboratorija za parazitologijo se zahvaljujem za prijaznost in pomoč pri praktičnem delu.

Zahvaljujem se tudi domačim, ki so mi ves čas stali ob strani in mi želeli najboljše.

PRILOGE

Priloga A: Seznam vzorcev in rezultatov vzorcev, ki smo jih testirali z metodami BEIA Toxo IgG avidity ELISA, Liaison Toxo IgG Avidity II CLIA in Mikrogen *recomLine* Toxoplasma IgG Avidity na avidnost protiteteles IgG proti *T. gondii*.

VZOREC	Št.	cobas IgG	liaison IgG	cobas IgM	liaison IgM	BEIA avi	BEIA avi	liaison avi	liaison avi	<i>recomLine</i> avi
8815	1	+	+	+	+	15.5%, 15.4%	M	0.494	V	
8943	2	+	+	+	+	26.6%	V	0.427	V	
9008	3	+	+	+	+	4.3%	N	0.099	N	
9126	7	+	+	+	-	35.8%, 38.5%	V	0.521	V	
9156	8	+	+	+	+	31.0%	V	0.483	V	
9369	12	+	+	+	+	48.0%	V	0.439	V	
9429	18	+	+	+	+	8.9%	N	0.112	N	
9479	21	+	+	-	+/-	51.2%	V	0.442	V	
9548	22	+	+	+	-	37.9%	V	0.385	V	
9645	23	+	+	+	+	18.9%	M	0.387	V	
8879	24	+	+	-	+	10.3%	N	0.270	N	
9582	29	+	+	+	+	5.7%	N	0.073	N	
8985	39	+	+	-	-	33% 36%	V	0.608	V	
9061	40	+	+	+	-	92.0%	V	0.683	V	
9085	41	+	+	+/-	+	17.6%	M	0.454	V	
9145	43	+	+	+/-	-	49.0%	V	0.813	V	
9164	44	+	+	+	+/-	45.0%	V	0.544	V	
9543	45	+	+	+	+	3.7%	N	0.134	N	
9652	46	+	+	+	-	33.0%	V	0.495	V	
9655	47	+	+	+/-	-	50.0%	V	0.461	V	
9689	48	+	+	-	-	40.0%	V	0.659	V	
9802	50	+	+	+	-	32.0%	V	0.650	V	
9825	53	+	+	-	-	51%,49%,45%	V	> 0.950	V	
9903	59	+	+	-	-	73%,47%	V	0.615	V	
9917	61	+	+	-	-	49.0%	V	0.732	V	
9959	65	+	+	+	+	17.2%,21.8%	M	0.264	N	
10020	67	+	+	+	+	4.6%	N	0.14	N	
10093	69	+	+	-	-	43%,42%	V	0.691	V	
10125	70	+	+	+	-	33.0%	V	0.304	M	
8612 K	76	+	+	+	+	6.7%	N	0.130	N	
8614 K	78	+	+	+	+	6.7%	N	0.102	N	
8983	80	+	+	-	-	42.0%	V	0.493	V	
10157	84	+	+	-	-	78.0%	V	> 0.950	V	
10232	86	+	+	+	-	40.7%	V	0.758	V	
10270	87	+	+	-	+	17.5%	M	0.364	V	
10276	88	+	+	-	+/-	29.2%	V	0.347	M	
10281	89	+	+	-	+/-	21.8%	M	0.560	V	
10288	90	+	+	-	-	50.3%	V	> 0.950	V	

Nadaljevanje priloge A: Seznam vzorcev in rezultatov vzorcev, ki smo jih testirali z metodami BEIA Toxo IgG avidity ELISA, Liaison Toxo IgG Avidity II CLIA in Mikrogen *recomLine Toxoplasma IgG Avidity* na avidnost protiteles IgG proti *T. gondii*.

VZOREC	Št.	cobas IgG	liaison IgG	cobas IgM	liaison IgM	BEIA avi	BEIA avi	liaison avi	liaison avi	<i>recomLine</i> avi
10324	91	+	+	-	+	37.4%	V	0.283	N	(Faza I)
10388	95	+	+	+	-	44.0%	V	0.609	V	
10395	96	+	+	+	+	17.9%	M	0.130	N	
10431	97	+	+	+	-	45.0%	V	0.601	V	
10442	99	+	+	+	+	30.0%	V	0.164	N	Faza II
10545	101	+	+	+	+	11.3%	N	0.172	N	
10599	103	+	+	+	-	18.5%	M	0.339	M	
10600	104	+	+	+	+	56.0%	V	0.393	V	
10616	105	+	+	+	-	70.0%	V	0.625	V	
10593	106	+	+	-	+	20.0%	M	0.330	M	
10639	107	+	+	-	+/-	46.0%	V	0.487	V	
10685	110	+	+	+/-	+/-	40.0%	V	0.512	V	
10692	111	+	+	+	+/-	23.3%	M	0.414	V	
10747	112	+	+	+	-	32.0%	V	0.428	V	
10756	113	+	+	+	-	29.0%	V	0.360	V	
10761	114	+	+	+	+	< 0.01%	N	0.131	N	
10824	119	+	+	-	-	85.0%	V	0.520	V	
10922	123	+	+	+/-	-	71.0%	V	0.604	V	
10928	124	+	+	+	+	71.0%	V	0.535	V	
10989	126	+	+	-	+/-	29.5%	V	0.268	N	Faza II
11148	130	+	+	-	+/-	28.0%	V	0.101	N	nedoločljivo
11210	133	+	+	+	-	47.0%	V	0.607	V	
11301	135	+	+	+	+/-	39%,40%	V	0.454	V	
11310	136	+	+	+	+	37.0%	V	0.440	V	
11095	137	+	+	+/-	+/-	7.2%	N	0.104	N	
11160	138	+	+	+	-	14.2%, 14,4%	N	0.171	N	
11395	143	+	+	+	-	50.0%	V	0.370	V	
11452	148	+	+	+	-	79%, 60%	V	0.319	M	
11573	152	+	-	+	-	44.4%	V	0.339	M	
11609	155	+	-	-	-	51.8%	V	0.603	V	
11696	160	+	+	+	+	4.0%	N	0.045	N	
11736	161	+	+	+/-	+	8.4%	N	0.124	N	
11743	163	+	+	+	-	39.0%	V	0.835	V	
11776	164	+	+	-	+/-	43.0%	V	0.396	V	
11883	167	+	+	+	+	48.2%	V	0.166	N	Faza III
11886	168	+	+	+/-	+	17.6%	M	0.196	N	
11899	169	+	+	+	+/-	56.5%	V	0.736	V	
12004	172	+	+	+	-	40.8%,24.62%	M	0.293	N	
12233	174	/	/	/	/	0.1%	N	0.097,0.035	N	
12139	175	/	/	/	/	54.2%	V	0.514	V	
12279	176	+	+	+	-	64.6%	V	0.48	V	

Nadaljevanje priloge A: Seznam vzorcev in rezultatov vzorcev, ki smo jih testirali z metodami BEIA Toxo IgG avidity ELISA, Liaison Toxo IgG Avidity II CLIA in Mikrogen *recomLine* Toxoplasma IgG Avidity na avidnost protiteles IgG proti *T. gondii*.

VZOREC	Št.	cobas IgG	liaison IgG	cobas IgM	liaison IgM	BEIA avi	BEIA avi	liaison avi	liaison avi	<i>recomLine</i> avi
12364	177	/	/	/	/	5.6%	N	< 0.010	N	
12386	178	/	/	/	/	29.8%	V	0.218	N	Faza IV
12391	179	/	/	/	/	0.07%	N	< 0.010	N	