

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Jasna BRDNIK

**POGOSTNOST AKUTNE TOKSOPLAZMOZE PRI NOSEČNICAH V
SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INCIDENCE OF ACUTE TOXOPLASMOSIS IN PREGNANT
WOMEN IN SLOVENIA**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo sem opravila v parazitološkem laboratoriju Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Jerneja Logarja in za recenzenta doc. dr. Miroslava Petrovca.

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

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

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok, univ. dipl. biol.
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Jernej Logar, univ. dipl. biol.
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: doc. dr. Miroslav Petrovec, dr. med.
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Jasna Brdnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 616.993-055.26(043)=163.6
KG zoonoze/toksoplazmoza/akutna toksoplazmoza/paraziti/*Toxoplasma gondii*/
nosečnice/Slovenija
AV BRDNIK, Jasna
SA LOGAR, Jernej (mentor)/PETROVEC, Miroslav (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
LI 2008
IN POGOSTNOST AKUTNE TOKSOPLAZMOZE PRI NOSEČNICAH V
SLOVENIJI
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP VIII, 44 str., 5 pregl., 6 sl., 30 vir
IJ sl
JI sl / an
AV Toksoplazmoza je zoonoza, ki jo povzroča zajedavec *Toxoplasma gondii*. Pomembna je predvsem kongenitalna toksoplazmoza, ki jo povzroči okužba nosečnice s tem parazitom. Prva toksoplazemska okužba v nosečnosti lahko vodi do nepopravljivih okvar na plodu ali pa do splava. Kongenitalno toksoplazmozo lahko preprečimo z ukrepi, kot so neuživanje surovega ali premalo kuhanega oziroma prepečenega mesa, preprečevanje stika z mačkami, osebna čistoča in presejalno testiranje na toksoplazmozo. V raziskavi nas je zanimalo, kako pogostna je akutna toksoplazmoza nosečnic in število s toksoplazmami okuženih novorojenčkov v osrednji Sloveniji. Iz računalniške baze podatkov smo v obdobju od leta 2000 do 2007 zbrali in analizirali toksoplazemske serološke rezultate 47048 nosečnic in število s toksoplazmami okuženih novorojenčkov. Nosečnice so bile testirane na toksoplazemska protitelesa IgG in IgM. Pri tistih nosečnicah, kjer smo ugotovili prisotnost protiteles IgG in IgM, smo naredili še test avidnosti protiteles IgG. Novorojenčki so bili testirani na toksoplazemska protitelesa IgM in IgA. Pri pregledu 47048 serumov nosečnic smo ugotovili, da je 11674 (24,8 odstotka) nosečnic na toksoplazmozo pozitivnih in 35374 (75,2 odstotka) nosečnic negativnih. Akutno toksoplazmozo v tem obdobju smo ugotovili pri 342 (0,97 odstotka) nosečnicah. Okužbo s toksoplazmo smo našli pri 36 novorojenčkih. V primerjavi s prejšnjimi študijami smo ugotovili, da se število oziroma odstotek akutnih okužb iz leta v leto povečuje. V primerjavi z obdobjem od leta 1996 do 1999 se je v letih od 2000 do 2007 odstotek akutnih toksoplazemskih okužb v nosečnosti v Sloveniji povečal za 0,03 odstotka. Menimo, da se zaradi pravočasnega odkritja akutne toksoplazmoze v nosečnosti in zaradi zdravljenja akutno okuženih nosečnic ter njihovih novorojenčkov, v obdobju od leta 2000 do 2007 nobeni nosečnici ni rodil zaradi toksoplazmoze poškodovan otrok. Te ugotovitve kažejo, da je presejalno testiranje za akutno toksoplazmozo v nosečnosti v Sloveniji učinkovito in smiselno.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn
DC UDC 616.993-055.26(043)=163.6
CX zoonosis/toxoplasmosis/acute toxoplasmosis/parasites/*Toxoplasma gondii*/pregnant women/Slovenia
AU BRDNIK, Jasna
AA LOGAR, Jernej (supervisor)/PETROVEC, Miroslav (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2008
TI INCIDENCE OF ACUTE TOXOPLASMOSIS IN PREGNANT WOMEN IN SLOVENIA
DT Graduation thesis (university studies)
NO VIII, 44 p., 5 tab., 6 fig., 30 ref.
LA sl
AL sl / en
AB Toxoplasmosis is a zoonosis, which is caused by the parasite *Toxoplasma gondii*. Most important is congenital toxoplasmosis, which causes infection of pregnant women with this parasite. Initial infection with toxoplasmosis in pregnancy can lead to irreparable damage to the embryo or even lead to miscarriage. We can prevent congenital toxoplasmosis with such steps as not eating raw or under-cooked or half-cooked meat, by preventing contact with cats, through personal hygiene and with serological screening for toxoplasmosis. In our research we wanted to find out the frequency of acute toxoplasmosis in pregnant women and the number of infected newborns with toxoplasmosis in central Slovenia. From computer databases of the period 2000 - 2007 we chose and analyzed the toxoplasmic serological results from 47048 pregnant women and the number of newborns infected with toxoplasmosis. Pregnant women were examined for the toxoplasmic IgG and IgM antibodies. Those pregnant women who were positive for the IgG and IgM antibodies were examined also for the IgG avidity test. Newborns were examined for the toxoplasmic IgM and IgA antibodies. Out of 47048 sera from pregnant women, 11674 (24,8 %) sera were positive for toxoplasmosis while 35374 (75,2 %) sera were negative. We found acute toxoplasmosis in 342 (0,97 %) of pregnant women in this period. We found infection with toxoplasmosis in 36 newborns. In comparison with previous studies we found that the number and the percentage of acute infections is rising each year. In comparison the period 1996 - 1999 to period 2000 - 2007 saw a rise of 0,03% in acute toxoplasmic infections among pregnant women in Slovenia. It is suggested because of timely discovery of acute toxoplasmosis in pregnant women and their newborns in 2000 - 2007, no woman gave birth to a child who had been damaged by toxoplasmosis. These results show that serological screening for toxoplasmosis in pregnancy in Slovenia is effective and sensible.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 POVZROČITELJ TOKSOPLAZMOZE	3
2.1.1 Splošne taksonomske značilnosti in življenjski krog povzročitelja toksoplazmoze	3
2.1.2 <i>Toxoplasma gondii</i>	5
2.1.2.1 Odkritje parazita <i>T. gondii</i>	5
2.1.2.2 Morfologija in biologija	5
2.1.3.4 Diagnoza	10
2.1.3.5 Zdravljenje	16
2.1.3.6 Epidemiologija in preprečevanje	17
3 MATERIALI IN METODE	22
3.1 MATERIAL	22
3.1.1 Serumi za dokazovanje protiteles proti <i>T. gondii</i>	22

3.2 METODE.....	23
3.2.1 Dokazovanje <i>T. gondii</i>	23
4 REZULTATI	34
5 RAZPRAVA.....	36
5.1 SKLEPI.....	39
6 POVZETEK.....	40
7 VIRI	42

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Redčenje vzorca za določanje avidnosti protiteles IgG	33
Preglednica 2:	Razlaga rezultatov avidnosti protiteles IgG	33
Preglednica 3:	Število pozitivnih in negativnih nosečnic na toksoplazmozo po posameznih letih	34
Preglednica 4:	Število akutno s toksoplazmami okuženih nosečnic in število okuženih otrok po letih	35
Preglednica 5:	Celokupni rezultati preiskav nosečnic na akutno toksoplazmozo v osrednji Sloveniji v letih 2000 - 2007	35

KAZALO SLIK

Slika 1: <i>T. gondii</i> , tahizoiti v eksudatu peritoneja miši (CDC, 2008 a)	6
Slika 2: <i>T. gondii</i> ; nesporulirana oocista (CDC, 2008 b)	7
Slika 3: <i>T. gondii</i> ; sporulirana oocista (CDC, 2008 c)	7
Slika 4: <i>T. gondii</i> ; cista v možganskem tkivu (CDC, 2008 d)	7
Slika 5: <i>T. gondii</i> ; življenjski krog (Logar, 1999)	9
Slika 6: Razmerje pozitivnih in negativnih nosečnic na toksoplazemska protitelesa IgG po posameznih letih	35

1 UVOD

Toksoplazmoza je po vsem svetu razširjena zoonoza, ki jo povzroča parazit *Toxoplasma gondii*. Je ena od najpogostejših parazitskih bolezni, ki jo parazit povzroča pri človeku in toplokrvnih živalih (ptice in sesalci).

T. gondii je razširjena po vsem svetu. Povzročitelj lahko pridobljeno (akvirirano) toksoplazmo; o tej obliki govorimo takrat, ko se človek okuži po rojstvu. Ta oblika je najpogostejša in je največkrat brez bolezenskih znakov. Okužba s toksoplazmami pa povzroča tudi prirojeno (kongenitalno) toksoplazmozo, ki je manj pogosta, vendar hujša bolezen. O tej bolezni govorimo, ko se ženska prvič okuži med nosečnostjo in pride do prenosa parazita preko posteljice in s tem do okužbe ploda. Posledica so lahko resne nevrološke poškodbe, slepota ali celo smrt ploda.

Človek se najpogosteje okuži z zaužitjem mesa, ki je okuženo s cistami parazita. Do okužbe lahko pride tudi pri zaužitju hrane ali vode, onesnažene z mačjimi iztrebki, ki vsebujejo oociste. Do prenosa lahko pride tudi pri transplantaciji okuženih organov ali pri transfuziji krvi. Če se nosečnica okuži s paraziti prvič v nosečnosti, se ti lahko prenesejo na plod, ki ga okužijo.

Na okuženost populacije vplivajo predvsem prehrabene navade, higiena in podnebne razmere. V nekaterih državah so za okužbo ljudi pomembnejše ciste v mesu, drugod pa oociste v mačjih iztrebkih.

Za preprečevanje okužbe je pomembno, da skrbimo za osebno higieno (skrbno umivanje rok pred jedjo) in da meso pred uživanjem dobro prekuhamo oziroma prepečemo. Še posebno za nosečnice je pomembno, da ne uživajo slabo predelanega mesa in da so čim manj v stiku z mačkami ali z zemljo oziroma vodo, onesnaženo z njihovimi iztrebki.

Kongenitalno toksoplazmozo lahko uspešno preprečujemo s pregledovanjem serumov nosečnic, s t.i. presejalnim testiranjem na prvo okužbo v nosečnosti in nato preventivnim zdravljenjem.

1.1 NAMEN DELA

V nalogi smo si zadali cilj, da za obdobje od leta 2000 do 2007 ugotovimo, koliko nosečnic se vsako leto prvič (akutno) okuži s toksoplazmami oziroma kako pogostna je akutna toksoplazmoza nosečnic v Sloveniji.

Z analizo rezultatov presejalnega testiranja na okužbo s toksoplazmo nosečnic v daljšem obdobju smo poskušali ugotoviti tudi, ali je število akutnih okužb iz leta v leto manjše, večje ali nespremenjeno. Ugotovljeno pogostnost akutne toksoplazmoze smo primerjali s pogostnostjo akutne toksoplazmoze nosečnic v drugih državah in tako poskušali ugotoviti, ali so naše nosečnice pred to okužbo ogrožene bolj ali manj kot nosečnice drugje v Evropi. Rezultate smo prikazali z intervalom zaupanja (confidence interval - CI).

2 PREGLED OBJAV

2.1 POVZROČITELJ TOKSOPLAZMOZE

2.1.1 Splošne taksonomske značilnosti in življenjski krog povzročitelja toksoplazmoze

T. gondii je obligaten znotrajceličen parazit, ki sodi v red *Coccidia*, razred trosovcev ali *Sporozoa* in deblo *Apicomplexa*.

Deblo *Apicomplexa* vsebuje praživali, ki imajo na sprednjem polu t.i. apikalni kompleks značilnih struktur: konoid s polarnim obročem, mikronemami, roptriji, podpelikularnimi tubuli in na površini telesca eno ali več mikropor. Te strukture jim služijo za oporo, gibanje, vdor v gostiteljsko celico, mikropora pa za sprejemanje hrane, ko pražival parazitira v gostiteljski celici. Imajo eno jedro in so brez bičkov ter migetalk. Pri praživalih tega debela se v razvojnem krogu izmenjavata nespolno razmnoževanje (shizogonija) s spolnim razmnoževanjem (gametogonija).

V razred trosovcev spadajo poleg *T. gondii* še *Sarcocystis*, ki parazitirata v različnih organih, rodova *Plasmodium* in *Babesia*, ki sta predvsem parazita krvi, ter *Cryptosporidium*, *Isospora* in *Cyclospora*, ki parazitirajo v prebavnem traktu.

Kokcidijski paraziti imajo zapleten življenjski krog, ki lahko poteka zunaj ali znotraj končnih gostiteljev. Predstavnike kokcidijskih parazitov uvrščajo v posamezno vrsto glede na strukturo sporulirane oociste. Oociste so zelo odporne proti vplivom okolja. Izločajo se z iztrebki gostitelja. Večina se jih izloči nesporuliranih; sporulirajo zunaj gostitelja in tako postanejo kužne. Pri nekaterih rodovih (npr. *Cryptosporidium*) oociste sporulirajo znotraj gostitelja.

Življenjski krog kokcidijskih parazitov ima šest glavnih faz:

- ekscistacija: proces, pri katerem se iz sporulirane oociste sprostijo sporozoiti;
- merogonija: nespolno razmnoževanje znotraj gostiteljskih celic;

- fertilizacija: združitev mikrogamet in makrogamet;
- nastajanje oociste z debelo steno, ki se izloča v fecesu gostiteljev in se s fecesom prenaša na druge osebe;
- sporogonija: proces razvoja infektivnih sporozoitov znotraj oociste.

2.1.2 *Toxoplasma gondii*

2.1.2.1 Odkritje parazita *T. gondii*

Leta 1908 sta Nicolle in Manceaux izolirala »nov« parazit iz severnoafriškega glodavca *Ctenodactylus gondii* in ga leto pozneje poimenovala *T. gondii*. Prvi primer kongenitalne toksoplazmoze je leta 1923 opisal Čeh Janku, ko je parazita odkril v mrežnici umrlega otroka. Wolf, Cowen in Paige pa so leta 1939 prvi poročali o toksoplazemskem encefalitisu kot posledici prirojene ali kongenitalne toksoplazmoze (Logar, 1999).

V Sloveniji so prvi primer toksoplazmoze pri otroku ugotovili leta 1953 (Stergar in sod., 1953).

2.1.2.2 Morfologija in biologija

T. gondii ima širok krog gostiteljev in veliko različnih gostiteljskih celic. Vmesni gostitelji so vse toplokrvne živali, vključno z ljudmi. Njeni končni gostitelji pa so mačke.

Pojavlja se v treh različnih oblikah: vegetativni ali trofozoitu, tkivni cisti in oocisti.

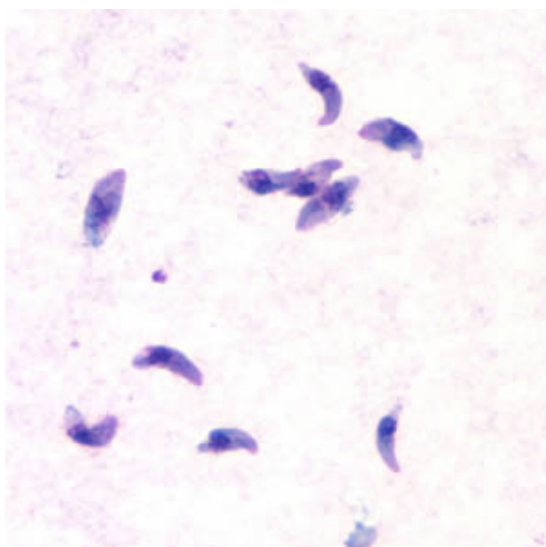
Trofozoit ima obliko polmeseца. Imenuje se tudi tahizoit, ki se hitro deli. Dolg je od 4 do 6 μm , širok od 2 do 3 μm . Spremaj je koničast, zadaj zaobljen. Jedro se navadno nahaja v sredini parazita.

V sprednjem delu ima splet fibril, za katere menijo, da imajo vlogo pri gibanju in pri vstopu parazita v gostiteljsko celico. V vmesnem gostitelju, človeku in različnih živalih, se v tkivih oziroma organih (najpogosteje v bezgavkah, možganih, očesu, skeletni miškulaturi, srcu in pljučih) razmnožuje nespolno z endodiogenijo. Ko zajedane in uničene gostiteljske celice propadejo (nekateri jih imenujejo tudi psevdociste), se sprostijo številne nove toksoplazme. Te nato napadajo nove gostiteljske celice (Logar, 1999).

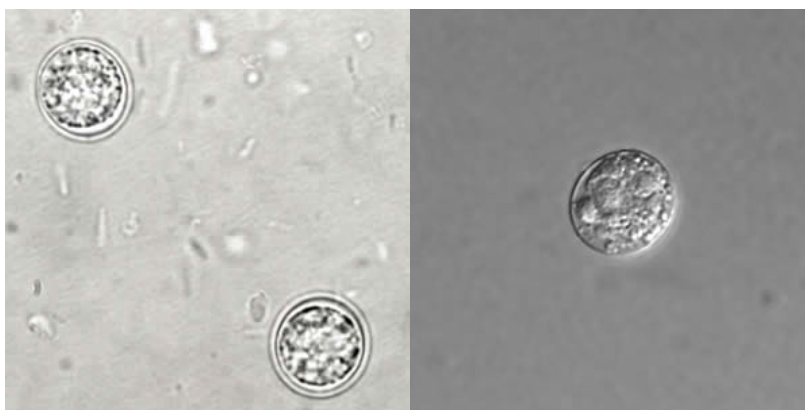
Neznani dejavniki (verjetno tudi imunski odziv gostitelja) povzročijo, da kjerkoli v telesu pride do tvorbe cist. Te so lahko velike okoli 100 μm , navadno pa okoli 50 μm in vsebujejo več sto t.i. bradizoitov (bradi = počasen), ki so tanjši, nekoliko manjši in se v cisti počasneje delijo kot tahizoiti. V takih cistah so lahko paraziti vse življenje, ne da bi delali

škodo. Če pa taka cista zaradi raznih dejavnikov (zmanjšane odpornosti zaradi drugih bolezni, obsevanja, zdravil itd.) počni, lahko sproščene toksoplazme povzročijo ponoven izbruh bolezni (Logar, 1999). Bradizoiti so bolj odporni na prebavne encime (npr. pepsin in tripsin) kot tahizoiti (Dubey, 2004).

Šele v 70. letih sta Hutchison s sodelavci v Evropi in Frenkel s sodelavci v Ameriki dokončno pojasnila življenjski krog tega parazita. Ugotovila sta, da toksoplazma za svoj popoln razvoj potrebuje mačko. Slednja se s toksoplazmo lahko okuži od okuženih malih glodavcev (npr. miši), ptic ali z neprekuhanim oziroma neprepečenim mesom, ki vsebuje ciste parazitov. Toksoplazme se v njenem črevesju razmnožujejo nespolno, in sicer z endodiogenijo in shizogonijo, ter spolno z gametogonijo. Pri nespolnem razmnoževanju nastajajo shizonti. Iz nekaterih shizontov nastanejo moške in ženske gamete. Po združitvi gamet nastane oocista. Nezrelo, nesporulirano oocisto mačka s fecesom izloči na prosto. Oocista v zunanjem okolju na primerni temperaturi in vlagi dozori oziroma sporulira navadno v treh do petih dneh. Oocista je elipsata, dolga 11 do 14 μm in široka 9 do 11 μm . Vsebuje dve sporociti, od katerih ima vsaka po štiri sporozoite. Kljub temu, da mačka izloča ogromno število oocist, ponavadi ni videti bolna (Logar, 1999; Dubey in Beattie, 1988).



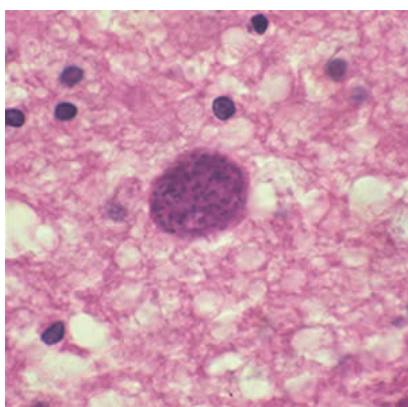
Slika 1: *T. gondii*, tahizoiti v eksudatu peritoneja miši (CDC, 2008 a).



Slika 2: *T. gondii*; nesporulirana oocista (CDC, 2008 b).



Slika 3: *T. gondii*; sporulirana oocista (CDC, 2008 c).



Slika 4: *T. gondii*; cista v možganskem tkivu (CDC, 2008 d).

2.1.3.3 Patogeneza in klinična slika

Človek se običajno okuži z zaužitjem premalo kuhanega, prepečenega ali surovega mesa (večinoma svinjina in ovčje meso), ki vsebuje tkivne ciste, ali z vodo ali pa s hrano kontaminirano z oocistami okuženih mačk. V prebavnem traktu se iz cist sprostijo bradizoiti, iz oocist pa sporozoiti. V črevesnih epiteljskih celicah, kamor vdrejo, se začnejo paraziti razmnoževati. Ko zajedane celice počijo, limfa in kri razneseta toksoplazme v organe. Klinična slika je tako odvisna od poškodbe zajedanega organa. Toksoplazma ne proizvaja toksina. Na potek okužbe vplivajo starost gostitelja, vrsta gostitelja, sev zajedavca *T. gondii*, število parazitov in način okužbe. Okužba pušča verjetno doživljenjsko imunost (Logar, 1999).

Do okužbe s toksoplazmami pri ljudeh pride najpogosteje po rojstvu. V tem primeru govorimo o pridobljeni ali akvirirani toksoplazmozi. Ta okužba največkrat ne povzroča očitne akutne bolezni in mine brez bolezenskih znakov. Le pri majhnem odstotku ljudi lahko po inkubaciji v trajanju od enega do treh tednov povzroča infekcijski mononukleozni podobno bolezen z vročino, glavobolom, bolečimi mišicami, povečanimi bezgavkami in močno utrujenostjo.

Daleč najbolj pogosta je limfadenopatija. Pogosto so prizadete globoke vratne bezgavke, kar nakazuje, da zajedavec vstopa v človeško telo skozi usta. Bolezen traja različno dolgo, od 3 do 18 mesecev ali več. Šele po več tednih otekline postopoma upadejo. Lahko pa pride do ponovnih povečanj. To obliko bolezni organizem sam omeji, posledic ni in zato tudi zdravljenje navadno ni potrebno (Logar in Marin, 1987). Toksoplazmoza bezgavk se včasih zaplete z okvarami drugih organov, kot so možgani, srce, jetra ali gibalno mišičje. V teh primerih prevladujejo bolezenski znaki, značilni za prizadete organe.

porodom menijo, da pride do prenosa toksoplazem na plod tudi v več kot 90 odstotkih. Resnost bolezni se kaže v obratnem vrstnem redu. Veliko hujša je namreč bolezen, če pride do okužbe ploda v prvem trimesečju nosečnosti. Če se je ženska s tem parazitom okužila že pred zanositvijo, to ne predstavlja nevarnosti za njen plod, saj je okužba v njenem organizmu že povzročila nastanek zaščitnih protiteles. Nevarnosti za plod prav tako ni, če je ženska pred tem že rodila otroka s kongenitalno toksoplazmozo. Izjemoma se kongenitalna toksoplazmoza lahko pojavi pri otroku matere s kronično oziroma latentno toksoplazmozo (Logar, 1999).

Posledice kongenitalne toksoplazmoze so lahko horioretinitis, hidrocefalija ali mikrocefalija, psihomotorične zapoznelosti in možganske zaapnitve. Pri novorojenčku se lahko pokažejo tudi hepatomegalija, splenomegalija, pljučnica, izpuščaji, anemija, zlatenica in krči. Pri približno 70 odstotkih se predvsem ženskam, ki se okužijo v zadnjem tromesečju nosečnosti, rodijo na videz zdravi otroci (asimptomatska oziroma subklinična toksoplazmoza). Pri takšnih otrocih se bolezenski znaki – največkrat horioretinitis – pokažejo šele pozneje. Za primere očesne toksoplazmoze večina avtorjev misli, da so večinoma kongenitalnega izvora. Cistične oblike parazitov pri takšnih bolnikih lahko mirujejo v mrežnici več let, morda tudi vse življenje, brez kliničnih znakov, lahko pa pride pri njih do ponavljanj očesne toksoplazmoze.

2.1.3.4 Diagnoza

Za ugotavljanje okužbe s tem parazitom poznamo več metod. Neposredno lahko parazita ugotovimo z mikroskopskim pregledom razmazov, narejenih iz tkiv organov, za katere sumimo, da so okuženi (možgani, kostni mozeg, koščki placent, bezgavk ipd.), ali pa iz telesnih tekočin (likvor, kri). Opravimo lahko tudi biološki poskus – sumljiv material homogeniziramo v tarilnici ter ga nato intraperitonealno vbrizgnemo laboratorijskim mišim (Logar, 1999).

Na voljo imamo tudi serološke preiskave in kožni test. Slednji je kvalitativni test, primeren

predvsem za epidemiološke raziskave. Uporabljajo naslednje serološke teste: Sabin-Feldmanov test ali dye test oziroma barvni test (SFT ali DT), neposredni in posredni imunofluorescenčni test (IFT), neposredni in posredni hemaglutinacijski test (IHA, ISAGA) in encimsko-immunski test (ELISA). ELISA test uporabljajo za ugotavljanje protiteles IgG, IgM, IgA, ELISA za določitev avidnosti protiteles IgG, cirkulirajočih ali krožečih toksoplazemskih antigenov in krožečih kompleksov razreda IgG in IgM. Za krožeče antigene nekateri menijo, da so membranske narave, drugi, da so somatske narave, in tretji, da so izločki parazitov. Ker so za krožeče antigene ali njihove komplekse ugotovili, da so po okužbi le malo časa v krvi bolnika, njihovo določanje oziroma ugotavljanje opuščajo.

Če s serološkimi testi ugotovimo prisotnost protiteles IgG to kaže samo na to, da je bila preiskana oseba okužena s toksoplazmami, ne pa tudi, da je trenutna bolezen povezana s to okužbo. Zato je potrebno po dveh do treh tednih serum bolnika ponovno pregledati in šele na osnovi ponovnega pregleda lahko sklepamo o stanju okužbe. Če pri ponovnem pregledu bolnikovega seruma ponovno ugotovimo nizke vrednosti protiteles iz prvega pregleda, potem gre za staro, nenevarno okužbo (vendar pri očesni toksoplazmozi in bolnikih z aidsom nizke vrednosti protiteles ne izključujejo akutne toksoplazmoze). Če ugotovimo, da so vrednosti protiteles pri ponovni preiskavi spremenjene, iz denimo prvotne negativne vrednosti v pozitivno (serokonverzija) ali pa so vrednosti protiteles IgG značilno povečane in da pri takem serumu ugotovimo tudi protitelesa IgM in/ali IgA, kaže to na svežo oziroma akutno toksoplazmozo, ki jo je treba predvsem pri nosečnicah takoj zdraviti (Knapen in Pangabeau, 1982; Logar, 1985).

Ker je okužba pri nosečnici največkrat klinično neopazna in ker je tudi večina kliničnih znakov pri novorojenčkih neopaznih, lahko problem prirojene toksoplazmoze rešimo samo z ugotovitvijo ogrožene nosečnosti in z zdravljenjem pred rojstvom. Postopek za pravočasno ugotavljanje s toksoplazmami ogrožene nosečnosti in nato prenatalno zdravljenje temeljita na dejstvih:

- da je samo prva okužba med nosečnostjo nevarna za plod;

- da okužba pred nosečnostjo zaščiti plod oziroma novorojenčka;
- da je samo ena nosečnost ogrožena, ponovljenih splavov zaradi toksoplazmoze ne poznamo;
- za ugotavljanje toksoplazemskih protiteles oziroma imunskega stanja poznamo številne teste;
- zaščita temelji predvsem na celični imunosti in ne toliko na humoralni imunosti, dinamika vrednosti protiteles omogoča sklepanje o začetku in poteku bolezni;
- okužba nerojenega otroka v primeru materine prve okužbe izhaja iz žarišč na posteljici;
- pri nekaterih ženskah s primarno okužbo se imunost razvije pred diaplacentno okužbo, pri drugih (okoli 50 odstotkov vseh okuženih nosečnic) pa se imunost razvije prepozno, in se plod okuži;
- zdravljenje nosečnic v kratkem času po okužbi uniči trofozoite parazitov in tako prepreči diaplacentno okužbo;
- nevarnost primarne okužbe pri nosečnici lahko znatno zmanjšamo s preprečevalnimi ukrepi, kot so neuživanje surovega oziroma premalo kuhanega ali pečenega mesa, preprečitev stika z mačkami in z osebno higieno.

V Franciji in Italiji je testiranje nosečnic na toksoplazmozo obvezno vsak mesec v nosečnosti. Samo v nekaterih predelih države pa testirajo nosečnice ponekod v Belgiji, na Češkem, Cipru, Finskem, Norveškem, v Nemčiji, Grčiji, Portugalski in Švici. Na Danskem sistematično testirajo novorojenčke. Slednje testirajo tudi ponekod na Poljskem in v Švici.

V Avstriji in Litvi sistematično pregledujejo vse nosečnice na toksoplazmozo trikrat v nosečnosti: v prvem, drugem in tretjem trimesečju nosečnosti.

Tudi pri nas nosečnice pregledajo trikrat v nosečnosti, in sicer z encimsko-immunskim testom (ELISA IgG in IgM). V Sloveniji je bilo obvezno testiranje na toksoplazmozo uvedeno konec leta 1995 (Zakon o nalezljivih boleznih, 1995).

Serume nosečnic je potrebno glede na toksoplazemska protitelesa pregledati čim prej v

poteku nosečnosti oziroma najpozneje v 10. do 12. tednu nosečnosti. Zgodnje odkrivanje je pomembno, saj lahko s takojšnjim zdravljenjem odkrite prve okužbe preprečimo prenos parazitov na plod. Če pri ženski z imunofluorescenčnim ali encimskim testom ugotovimo protitelesa proti toksoplazmam že pred nosečnostjo, potem med samo nosečnostjo preiskave niso potrebne. Če pa je nosečnica prvič pregledana v nosečnosti in z imunofluorescenčnim testom ugotovimo nizek titer protiteles ($\leq 1:256$) oziroma z encimskim testom ugotovimo nizke vrednosti protiteles (< 300 IU/ml), je potrebno serume nosečnic ponovno pregledati s serološkimi testi - najbolje po dveh do treh tednih po prvem pregledu. Če pri tem z imunofluorescenčnim testom ugotovimo enake titre protiteles oziroma z encimskim testom ugotovimo enake vrednosti protiteles IgG prve preiskave, potem to kaže na staro, torej za nosečnost oziroma plod nenevarno okužbo. Če pa se nasprotno pokaže povečanje omenjenih vrednosti (titra protiteles za štirikrat ali več oziroma IU/ml na več kot 300 enot), to kaže na svežo okužbo. Pri ženskah, ki pri prvi preiskavi v drugem oziroma tretjem mesecu nosečnosti nimajo toksoplazemskih protiteles in se med nadaljnjo nosečnostjo prvič okužijo, obstaja tveganje za kongenitalno toksoplazmozo. Zato jih pregledujemo še v drugem trimesečju in 4 do 6 tednov pred rojstvom otroka. Če kasneje (pri prvi ali drugi kontroli nosečnic) ugotovimo prisotnost protiteles (serokonverzija), to pomeni, da je do okužbe prišlo v nosečnosti. Serume nosečnic, pri katerih odkrijemo serokonverzijo, visoke titre ali porast titrov protiteles imunofluorescenčnega testa oziroma visoke vrednosti ali njihov porast encimsko-immunskega testa, potrdimo še z dodatnimi testi: ELISA IgM, ELISA IgA in ELISA test za ugotavljanje avidnosti protiteles IgG. Pri testiranju z encimsko-immunskim testom, ko pregledujemo serume nosečnic istočasno s testom ELISA IgG in IgM, potrdimo odkrito prvo okužbo še z ELISA IgA in ELISA testom za ugotavljanje avidnosti protiteles IgG. Vse nosečnice, pri katerih je ugotovljena prva okužba v nosečnosti, je treba zdraviti.

Toksoplazemska protitelesa IgG so z imunofluorescenčnim testom zaznavna v okoli dveh tednih po okužbi. Njihova koncentracija se hitro veča in doseže najvišjo vrednost približno v osmem tednu po okužbi. Tako visok titer ostane povprečno osem mesecev, nato pa se počasi zmanjšuje. Nizke in srednje titre protiteles (1:4 do 1:256) lahko zaznamo po sveži okužbi samo nekaj dni, medtem ko jih pri stari, latentni okužbi, zaznamo več let ali navadno vse življenje (Logar, 1999).

Po okužbi se najprej (po okoli petih dneh) pojavijo protitelesa IgM. Pri nekaterih bolnikih se pojavijo pozneje, medtem ko jih včasih pri nekaterih okuženih dojenčkih sploh ne dokažemo. Z encimsko-immunskim testom ugotovljena protitelesa IgM dosežejo maksimalne vrednosti po okoli enem mesecu po okužbi. Glede na to, kateri test uporabljamo, jih lahko zaznamo v serumu različno dolgo. Od nekaj mesecev po okužbi (navadno okoli šest mesecev), pri nekaterih pa tudi dalj časa.

Z encimsko-immunskim testom ugotovljena toksoplazemska protitelesa IgA se po okužbi pojavijo navadno dva do tri tedne za protitelesi IgM. V serumu so zaznavna okoli tri do štiri mesece po okužbi, izginejo pa dva do devet mesecev pred protitelesi IgM. Če pri pregledu ne ugotovimo protiteles IgA, to ne izključuje sveže, akutne okužbe, saj je bil serum osebe lahko pregledan ravno v času po okužbi, ko se protitelesa IgA še niso pojavila ali pa so po nedavni okužbi že povsem upadla oziroma izginila. Pri petih odstotkih ljudi raziskovalci med okužbo niso nikoli ugotovili protiteles IgA.

V prvem trimesečju nosečnosti večkrat kljub temu, da smo s serološkimi testi ugotovili visoke vrednosti protiteles IgG, IgM in IgA ne vemo, ali je do prve okužbe prišlo pred zanositvijo (nenevarna za plod) ali v nosečnosti (nevarna za plod). V takih primerih uporabimo še ELISA test za ugotavljanje avidnosti specifičnih protiteles IgG. S tem testom, ki ga je leta 1989 vpeljal Hedman s sodelavci, ugotavljamo moč vezave protiteles IgG na toksoplazemski antigen. Za specifično avidnost protiteles IgG (izražamo jo v odstotkih) so ugotovili, da je po prvi oziroma pri akutni okužbi nizka, in da šele čez čas naraste. To pomeni, da ugotovljena visoka avidnost protiteles IgG v prvi polovici nosečnosti izključuje prvo okužbo v nosečnosti. Pri taki nosečnici nadaljnje preiskave in zdravljenje niso potrebni (Logar, 1999).

Diagnoza okužbe pri plodu temelji na neposredni ali posredni preiskavi kužnine. Kužnino dobimo z amniocentezo ali kordocentezo. Pregledujemo lahko tudi tkivo posteljice in kri novorojenčka.

Ker protitelesa IgM in IgA ne prehajajo skozi posteljico, nam s serološkimi testi ugotovljena prisotnost omenjenih protiteles v novorojenčkovi krvi kaže na prirojeno okužbo. Ko so raziskovalci ugotovili, da so protitelesa IgA pri seroloških preiskavah

okuženih plodov ali novorojenčkov, starih manj kot dva meseca, bolj pogosta (v okoli 95 odstotkih) kot protitelesa IgM (v okoli 50 odstotkih), je test ELISA IgA v kombinaciji s testom ELISA IgM postal zelo pomemben za ugotavljanje kongenitalne toksoplazmoze novorojenčkov. Pri okuženih novorojenčkih so – nasprotno kot pri odraslih – ugotovili, da so specifična protitelesa IgA prisotna dalj časa kot protitelesa IgM. Iz matere na plod prenesena protitelesa IgG po rojstvu otroka navadno po desetih mesecih izginejo. Če je v nosečnosti prišlo do toksoplazemske okužbe ploda, protitelesa IgG pri novorojenčku ne izginejo tudi po 12 do 18 mesecih po rojstvu. Okužbo novorojenčka je možno ugotoviti tudi z izračunom razmerja med specifičnimi protitelesi IgG in skupnimi protitelesi IgG (t.i. specific antibody load). Pri neokuženem novorojenčku to razmerje upade v drugem ali tretjem mesecu, ko začne novorojenček sam tvoriti protitelesa IgG, ki ne vsebujejo toksoplazemskih protiteles. Če je novorojenček okužen, se to razmerje v tem času ne spremeni ali pa začne naraščati (Logar, 1999).

Od neposrednih preiskav se uporablja preiskava amnijske tekočine z verižno reakcijo polimeraze (PCR). Ta reakcija je pomembna za ugotavljanje okužbe ploda, saj je tako občutljiva in specifična, da je izjemno malo lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov. Z uvedbo te preiskave je možno zdraviti samo tiste nosečnice, pri katerih je poleg pozitivnih seroloških testov pozitivna tudi ta reakcija (Logar, 1999).

Za pregledovanje ploda lahko uporabljamo tudi preiskavo z ultrazvokom. Z večkratnim pregledovanjem v nosečnosti ugotavljamo pri plodu povečanje možganskih ventriklov ali poapnitve v njih, ascites, morebitno povečanje jeter ali povečano odebelitev posteljice.

Pri kongenitalni toksoplazmozi so lahko pomembne tudi nekatere nespecifične laboratorijske ugotovitve v novorojenčkovi krvi, npr. povečanje vseh protiteles IgM, majhno število trombocitov, povečanje števila levkocitov in eozinofilcev in povečanje jetrnih encimov, predvsem gamaglutamiltransferaze (γ -GT) in laktične dehidrogenaze (LDH) (Logar, 1999).

Kljub uporabi različnih testov se lahko zgodi, da ne odkrijemo kongenitalne toksoplazmoze pri novorojenčku matere, ki se je prvič okužila v nosečnosti. Zato je treba novorojenčka akutno okužene matere kljub negativnim rezultatom (npr. negativna preiskava posteljice, negativna protitelesa IgM, upad protiteles IgG prenesenih z matere)

pregledovati še najmanj do 12 oziroma 28 mesecev starosti, da izključimo morebitno kongenitalno toksoplazmozo. (Cook in sod., 1990; Logar, 1998).

Pri imunsko oslabljenih bolnikih s serološkimi testi težko postavimo diagnozo, saj včasih tudi nizke vrednosti protiteles ne izključujejo akutne toksoplazmoze. Kljub temu je treba bolnike z aidsom in sumom na toksoplazmozo ter dajalce in prejemnike organov pred transplantacijo kontrolirati s serološkimi testi, da take osebe preventivno zdravimo, če je to potrebno. Po presaditvi srca je včasih treba zdraviti tudi na toksoplazmozo negativnega prejemnika, če le-ta dobi srce dajalca, pozitivnega na toksoplazmozo (Logar, 1999).

Diagnoza pri omenjeni skupini bolnikov temelji predvsem na neposrednem ugotavljanju zajedavcev v kužnini (krvi, telesnih tekočinah ali različnem biopsijskem materialu). Uporabljamo mikroskopski pregled neobarvanih ali obarvanih preparatov, gojenje ali PCR-metode. Pri bolnikih z aidsom lahko pri sumu možganske toksoplazmoze uporabimo pregled z računalniško tomografijo (CT) ali magnetno resonanco (MR) (Blanco in sod., 1992; Logar, 1998).

2.1.3.5 Zdravljenje

Toksoplazmozo najuspešneje zdravijo s pirimetaminom (Daraprim), skupaj s sulfonamidi (npr. sulfadiazinom). Ker pirimetamin lahko deluje na kostni mozeg, je treba med zdravljenjem nadzorovati krvno sliko pacienta in mu dajati preparate s folno kislino, ki prepreči škodljivo delovanje pirimetamina. Slednjega ni priporočljivo dajati v prvem trimesečju nosečnosti. Za zdravljenje priporočajo tudi antibiotik spiramicin ali rovamicin (predvsem za zdravljenje toksoplazmoze v nosečnosti) in klindamicin, predvsem za zdravljenje očesne toksoplazmoze. Učinkovito naj bi deloval tudi artemeter, derivat artemisinina. Včasih predpisujejo tudi kortikosteroide zaradi njihovega protivnetnega delovanja.

Omenjena zdravila delujejo samo na proste oblike parazitov, ne pa na tkivne ciste. Vrednosti protiteles lahko pri zdravljenju ostanejo dalj časa nespremenjene oziroma se ne zmanjšajo takoj. Za uspeh zdravljenja je zato potrebno vedno upoštevati celotno klinično

sliko bolnika (Logar, 1999).

2.1.3.6 Epidemiologija in preprečevanje

Toksoplazmoza je razširjena po vsem svetu med rastlinojedimi in mesojedimi živalmi ter pri človeku. Z epidemiološkimi raziskavami v Srednji Evropi so pri populacijah ljudi, starih od 30 do 40 let, našli protitelesa v 50 do 60 odstotkih primerov. V Srednji Evropi so v podobnih odstotkih prekužene tudi ženske v rodni dobi. Večja je prekuženost v Franciji, manjša v severnih državah, npr. na Norveškem, Finskem, v Švedski in Veliki Britaniji. S preiskavami žensk v rodni dobi na toksoplazmozo so pri nas odkrili, da je bila prekuženost žensk v 80. letih 52-odstotna, v 90. letih pa se je zmanjšala na 37 odstotkov. Do zmanjšanja je verjetno prišlo zaradi večje osveščenosti žensk in boljših higienskih razmer. S tem se je povečalo število negativnih žensk »potencialno ogroženih«, to je takšnih, ki se lahko v nosečnosti prvič okužijo s toksoplazmami. V navedenih letih se je povečalo tudi število oziroma odstotek primarnih okužb v nosečnosti od 0,33 odstotka na 0,75 odstotka. Kot kaže, se bo to število povečevalo tako dolgo, kot se bosta povečevala število oziroma odstotek negativnih nosečnic (Feldman, 1982; Dubey in Beattie, 1988).

Človek se najpogosteje okuži z zaužitjem premalo kuhanega mesa, ki vsebuje ciste parazita. Ciste so navadno v prašičjem, ovčjem in kozjem mesu, redko pa v govejem in perutnini. Okužba z mlekom okuženih živali ali z jajci je malo verjetna. Do okužbe lahko pride tudi z zaužitjem hrane ali vode kontaminirane z oocistami iz mačjih iztrebkov. Prenašanje parazitov skozi poškodbe na koži je manj pomembno, razen pri laboratorijskem delu in avtopsijah.

Do prenosa parazitov lahko pride tudi pri transplantaciji okuženih organov ali pri transfuziji krvi (Mayes in sod., 1995). Če se nosečnica okuži s paraziti prvič v nosečnosti, se paraziti skozi posteljico s krvjo lahko prenesejo na plod.

Na prekuženost ljudi vplivajo predvsem različne prehrabene in higienske navade ter zemljepisni in podnebni dejavniki območja. V nekaterih okoljih so za okužbo

pomembnejše ciste v mesu, drugod pa oociste v mačjih iztrebkih. Na Kostariki, kjer ne uživajo surovega mesa, je pa veliko mačk, so oociste tiste, ki so glavni vir okužbe. V nekaterih državah, npr. Franciji, Avstriji, Nemčiji in tudi pri nas, kjer je manj mačk, oziroma so pod boljšo kontrolo, a ljudje uživajo več surovega ali pa ne dovolj prekuhanega mesa, so glavni vir okužbe ciste v mesu. Okužba je bolj pogosta v toplejših krajih, v nižinah in manj pogosta v suhih predelih (Logar, 1999).

Prekuženost ljudi in živali z zajedavcem *T. gondii* se spreminja v odvisnosti od zemljepisnega področja, včasih tudi znotraj istega področja. Menijo, da do razlik pride zaradi različne naseljenosti področja z mačkami in posledično različne gostote oocist na določenem področju. Raziskave so pokazale, da so nosečnice v ZDA prekužene z zajedavcem v nižjem odstotku kot nosečnice v deželah Srednje Evrope. Norveški avtorji poročajo, da je prekuženost nosečnic z zajedavcem v južnih (nižjih) predelih Norveške s toplejšim podnebjem pogostejša kot v severnih, višje ležečih in bolj mrzlih predelih države. Za Slovenijo pa so ugotovili, da področje z nizko nadmorsko višino in milim podnebjem ni povezano z večjo prekuženostjo nosečnic z zajedavcem. Zdi se, da večje število letnih padavin, vlažna poletja, povprečno višja nadmorska višina in sneg vplivajo na višji odstotek prekuženih nosečnic v celinskem predelu Slovenije. Na Finskem, Švedskem, Norveškem in v Veliki Britaniji so ugotovili, da večina žensk v rodni dobi ni prekužena s *T. gondii* in so zato dovzetne za okužbo med nosečnostjo (Logar in sod., 2006 a).

Podnebni pogoji v dveh zemljepisno različnih regijah Slovenije najbrž različno vplivajo na preživetje oocist zajedavca *T. gondii*. Omenjeni pogoji na teh področjih verjetno vplivajo na različno prekuženost živali in posledično ljudi, ki uživajo neustrezno pripravljeno meso okuženih živali (Logar in sod., 2006 a).

Vse tri oblike *T. gondii* (tahizoiti, ciste in oociste) lahko okužijo tako vmesne kot tudi končne gostitelje na enega od naslednjih načinov: (1) horizontalno z zaužitjem okuženih oocist iz okolja, (2) horizontalno z zaužitjem tkivnih cist iz surovega ali premalo kuhanega mesa ali (3) vertikalno s prenosom tahizoitov preko placente na plod. Pri večini gostiteljev se lahko tahizoiti prenesejo tudi z dojenjem.

T. gondii se torej lahko prenaša s končnih na vmesne gostitelje in z vmesnih na končne gostitelje, ki živijo na istem območju.

Okužba s tahizoiti

Pri vertikalnem prenosu igrajo glavno vlogo tahizoiti. So zelo občutljivi na razmere v okolju ter izven gostitelja ne preživijo dolgo. Zato na splošno velja, da horizontalni prenosi okužb s *T. gondii* preko tahizoitov epidemiološko niso pomembni oziroma pride do njih zelo redko.

Do okužbe lahko pride tudi pri transplantaciji organov (srce, ledvica, jetra, kostni mozeg). V teh primerih lahko okužbo povzročijo tahizoiti ali tkivne ciste. Do prenosa tahizoitov lahko pride tudi s transfuzijo krvi. Ker pa so tahizoiti v krvi prisotni le krajši čas, je tveganje za okužbo s *T. gondii* s transfuzijo majhno.

Tahizoite so našli v mleku številnih vmesnih gostiteljev (vključno z ovci, kozami in kravami), toda do prenosa na človeka lahko pride le z uživanjem nepasteriziranega kozjega mleka. Zato priporočajo, da se mleko (predvsem kozje) pred zaužitjem pasterizira ali prekuha. To je posebej pomembno v primeru otrok, ki imajo manjšo koncentracijo proteolitičnih encimov v prebavnem traktu in so bolj dovzetni za okužbo s toksoplazmo kot odrasli (Tenter in sod., 2000).

V splošnem naj bi večino okužb s horizontalnim prenosom povzročilo zaužitje tkivnih cist v okuženem mesu in oocist v hrani ali vodi, kontaminirani z mačjimi iztrebki.

Okužba s tkivnimi cistami

Tkivne ciste *T. gondii* v mesu živali predstavljajo pomemben vir okužb za človeka. Tkivne ciste se lahko razvijejo že v šestih do sedmih dneh po okužbi vmesnega gostitelja tako z oocistami kot tudi z tkivnimi cistami. Te v gostitelju najverjetneje ostanejo doživljenjsko. Število in lokacija tkivnih cist, ki se razvijejo v posameznem gostitelju, se razlikujeta glede na vrsto gostitelja. Pri živalih, katerih meso predstavlja vir hrane za človeka, tkivne ciste *T. gondii* najpogosteje najdemo v tkivih okuženih prašičev, koz in ovc, redkeje pa v okuženi perutnini, pri zajcih, psih in konjih. Izjemno redko jih najdemo v mesu goveda, čeprav protitelesa najdemo pri več kot 92 odstotkih krav ter do 20 odstotkih bikov. V Evropi in ZDA največji vir okužbe človeka s *T. gondii* sicer predstavlja svinjina (Tenter in sod., 2000).

V zadnjem desetletju se je pri prašičih na Nizozemskem, v Avstriji in Nemčiji prevalenca okužbe s *T. gondii* občutno zmanjšala na manj kot odstotek (Van Knapen, 1995). V številnih drugih državah (npr. Braziliji, Kanadi, Finski, Nemčiji, Italiji) pa se je zaradi

sprememb pri reji prašičev seroprevalenca zmanjšala na manj kot deset odstotkov (Tenter, 2000). Ti podatki kažejo, da je z intenzivnim upravljanjem farm ter ustreznimi higienskimi ukrepi in higieno možno občutno zmanjšati tveganje za okužbo živali s *T. gondii*. Med tovrstne ukrepe sodijo: (1) reja živali v zaprtih prostorih, (2) preprečevanje vstopa glodavcem, pticam in insektom v hleve, (3) hranjenje živali s toplotno obdelano hrano in (4) preprečevanje vstopa domačih živali v hlev (Tenter in sod., 2000).

Potencialni vir okužbe človeka s *T. gondii* predstavljajo tudi divje živali, kot so divji zajci, merjasci, kenguruji in medvedi. Pri tem so ogroženi tudi lovci in njihove družine, saj lahko pride do prenosa med razkosavanjem živali.

Okužba z oocistami

Oociste izločajo domače in številne divje mačke. Pri domačih mačkah lahko protitelesa proti *T. gondii* najdemo pri več kot 74 odstotkih mačk v odvisnosti od načina hranjenja in tega, ali mačke prebivajo v stanovanju ali zunaj. Seroprevalenca je ponavadi večja pri potepuških mačkah kot pri tistih, ki živijo v mestnih območjih (Tenter in sod., 2000).

Mačke se lahko okužijo z zaužitjem oocist, ki se nahajajo v okolju, ali z zaužitjem tkivnih cist v vmesnih gostiteljih.

Domača mačka je edina domača žival, ki je končni gostitelj za *T. gondii*, zato predstavlja ključno vlogo v epidemiologiji okužbe s tem parazitom. Po primarni okužbi lahko hišne mačke izločijo veliko število oocist, kar predstavlja tveganje za okužbo ljudi, ki si z mačko delijo življenjski prostor. Potepuške mačke in tiste, ki živijo na kmetijah, lahko izločijo oociste v okolje, s katerimi se nato okužijo domače živali.

Mačka po primarni okužbi s tkivnimi cistami ali oocistami izloči več kot 100 milijonov oocist v okolje. V primernem okolju (dovolj kisika, vlažnost, temperatura) oociste sporulirajo in v enem do pet dni postanejo kužne (Tenter in sod., 2000).

Sporulirane oociste so zelo odporne na razmere v okolju. Preživijo kratka obdobja mraza in dehidracije ter ostanejo kužne v vlažni zemlji ali pesku do 18 mesecev.

V okolju se prenašajo z vetrom, dežjem ali površinskimi vodami. Z mačjimi iztrebki kontaminirana slama, seno in žito lahko predstavljajo vir okužbe za živino. Oociste se lahko širijo tudi z deževniki, koprofagnimi nevretenčarji ali kompostom (Tenter in sod., 2000). Človek se lahko okuži s stikom s kontaminirano zemljo (na primer pri vrtnarjenju) in tudi z božanjem psa, ki se je valjal po okuženem mačjem iztrebku (Frenkel in sod.,

1995).

Da ne pride do okužbe, je treba meso za prehrano dobro predelati in paziti na osebno higieno. Že običajni gospodinjski postopki, kot so kuhanje, pečenje, soljenje, dimljenje itd., parazite uničijo. Ciste v mesu uniči tridnevno zamrzovanje okuženega mesa pri -15°C ali približno dvodnevno zamrzovanje pri -20°C . Pri temperaturi 4°C do 6°C preživijo v mesu več tednov, tudi do dva meseca (Logar, 1999).

Zato je za nosečnice priporočljivo, da ne uživajo slabo predelanega mesa. Čim manj naj prihajajo v stik z mačkami ali zemljo oziroma vodo, onesnaženo z njihovimi iztrebki. Oociste, ki z mačjim iztrebkom pridejo na prosto, so tako lahko v zemlji, vodi ali pa prahu. Ker mačka svoje iztrebke navadno zakoplje, lahko oociste na primerni vlagi in temperaturi preživijo več mesecev ali let. Odporne so tudi proti blagim kislinam in lugom ter proti običajnim laboratorijskim razkužilom. Hitro, v približno 30 minutah, jih ubije sušenje in temperatura 55°C . Pri zamrzovanju na -21°C oociste preživijo okoli 28 dni. Do okužbe pride, če ne pazimo na osebno higieno (skrbno umivanje rok pred jedjo) in si z umazanimi rokami, s kontaminirano hrano ali vodo vnesemo oociste ali ciste v usta. Okužba je možna tudi z vdihavanjem oocist (Logar, 1999).

Kongenitalno toksoplazmozo lahko uspešno preprečimo s serološkim presejalnim testiranjem na prvo okužbo v nosečnosti in nato preventivnim zdravljenjem teh nosečnic (Logar, 1999). S takšnim načinom pregledovanja in zdravljenja so v Avstriji in Franciji občutno zmanjšali pojavljanje kongenitalne toksoplazmoze. Pogostost kongenitalne toksoplazmoze je pri novorojenčkih v Avstriji padla z 0,7 odstotka na manj kot 0,1 odstotka. V Franciji poročajo, da so kongenitalno toksoplazmozo zmanjšali za več kot 60 odstotkov. Za Slovenijo je bilo ugotovljeno, da se prvič v nosečnosti okuži okoli šest do sedem na tisoč pregledanih nosečnic. Prva okužba v nosečnosti v okoli 40 do 50 odstotkih vodi do okužbe plodu oziroma do kongenitalne toksoplazmoze. Če nosečnic ne bi pregledovali na kongenitalno toksoplazmozo in zdravili, bi se v Sloveniji rodili trije do štiri novorojenčki s kongenitalno toksoplazmozo na tisoč rojstev. Zato je v Sloveniji od leta 1995 pregledovanje nosečnic na toksoplazmozo z zakonom obvezno.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Serumi za dokazovanje protiteles proti *T. gondii*

Iz računalniške baze podatkov smo za obdobje od 1. januarja 2000 do 31. decembra 2007 zbrali in analizirali rezultate 47048 serumov nosečnic, ki so bile v parazitološkem laboratoriju Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani s serološkimi testi pregledane na toksoplazemska protitelesa IgG, IgM. Ugotavljali smo tudi avidnost specifičnih protiteles IgG.

V raziskavo smo vključili predvsem nosečnice iz osrednjega dela Slovenije. Dobljene rezultate o prekuženosti in o številu akutnih okužb pri nosečnicah smo primerjali s toksoplazemskimi rezultati nosečnic v drugih evropskih državah.

Rezultate raziskave o pogostosti akutne toksoplazmoze pri nosečnicah smo statistično analizirali z intervalom zaupanja (confidence interval - CI).

3.2 METODE

3.2.1 Dokazovanje *T. gondii*

V parazitološkem laboratoriju Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani serume nosečnic s serološkimi testi pregledujejo v prvem trimesečju nosečnosti (najkasneje v 8. - 12. tednu nosečnosti) istočasno na prisotnost protiteles IgG in IgM proti *T. gondii*. Če pri prvem pregledu ugotovijo samo protitelesa IgG brez protiteles IgM, to pomeni, da se je nosečnica s paraziti okužila že pred enim letom ali še prej. Ta rezultat kaže na staro, za nosečnost oziroma za plod nenevarno okužbo. Nosečnica, ki je v prvem trimesečju negativna na protitelesa IgG in IgM, se lahko med nadaljnjo nosečnostjo prvič okuži in je torej potencialno ogrožena. Zato tako nosečnico ponovno serološko pregledajo v drugem trimesečju (v 20. - 24. tednu) in v tretjem trimesečju (v 24. - 36. tednu) nosečnosti, da odkrijejo morebitno prvo okužbo (oziroma t.i. serokonverzijo) v nosečnosti. Za pregledovanje so uporabljali encimsko-immunski test ELISA IgG, IgM Cobas Core, od februarja 2007 pa smo uporabljali ECLIA IgG, IgM, Cobas e 411 – Roche.

Po okužbi so protitelesa IgM zaznavna oziroma se pojavijo po okoli petih dneh, dosežejo svoj vrh po okoli enem mesecu in nato njihov nivo pade ter izgine po nekaj mesecih (v nizkih vrednostih so protitelesa IgM navadno prisotna šest mesecev, lahko pa tudi do dve leti ali celo več). Če pri serološkem pregledu poleg IgG ugotovijo tudi protitelesa IgM, leta kažejo na možnost primarne sveže okužbe ali pa na več tednov ali mesecev staro okužbo. Da potrdijo ali ovržejo svežo okužbo, tak serum testirajo še s Toxo-IgG testom avidnosti. Vrednosti Toxo-IgG testa avidnosti, manjše od 15 odstotkov, kažejo na svežo okužbo (do katere je verjetno prišlo v zadnjih treh mesecih), vrednosti od 15 do 25 odstotkov kažejo na okužbo, do katere je prišlo v zadnjih šestih mesecih, vrednosti, večje od 25 odstotkov, pa izključujejo okužbo v zadnjih treh mesecih oziroma kažejo na okužbo, do katere je prišlo pred več meseci.

Dokazovanje protiteles IgM z encimsko imunskim testom Toxo IgM EIA recomb (Cobas Core, Roche)

Test uporabljamo za kvalitativno diagnostiko protiteles IgM proti toksoplazmi v človeškem serumu ali plazmi. Rezultat testa pomaga pri ugotavljanju nedavne (sveže) okužbe s *T. gondii*. Uporabljamo reagente COBAS CORE Roche Diagnostics.

Ta test skupaj z encimskim testom Toxo IgG EIA Cobas Core omogoča odkrivanje serokonverzij, ki kažejo na »svežo« prvo okužbo s toksoplazmami v nosečnosti.

V prvem delu reakcije vzorec (serum) inkubiramo s polistirenskimi kroglicami, ki so prekrte z monoklonskimi antihumanimi protitelesi IgM. Če so v vzorcu prisotna protitelesa IgM, se le-ta vežejo na kroglice. Po spiranju, v drugem delu reakcije, protitelesa IgM proti *T. gondii* v vzorcu dokažemo tako, da kroglice inkubiramo s t.i. rekombinantnim antigenom *Toxoplasma* SAG1 (p30), označenim z encimom hrenovo peroksidaza (konjugat). Po drugem spiranju, vezan encim konjugata reagira s COBAS CORE substratom. Iz intenzitete barve aparat proporcionalno preračuna vsebnost protiteles IgM proti *T. gondii* v vzorcu.

Priprava serumov nosečnic

Protitelesa določamo v serumu ali plazmi. Za analizo zadošča 500 µl seruma in plazme oziroma en do dva ml krvi, ki je bila odvzeta brez sredstev proti strjevanju. Odvzeto kri je treba pred testiranjem centrifugirati in za test uporabiti tekoči del – serum ali plazmo. Vzorce hranimo do pet dni pri 2 do 8 °C; če test v navedenem času ni opravljen, jih je treba zamrzniti pri -20 °C.

Postopek dokazovanja protiteles IgM z encimsko imunskim testom Toxo IgM EIA (Cobas Core, Roche)

- Pol ure pred testom je treba diagnostični komplet in serume postaviti na sobno temperaturo (20 do 25 °C).

- Nato vključimo aparat (v računalniški program na začetku vnesemo zahtevane podatke za diagnostiko toksoplazmoze – ugotavljanje protiteles IgG in IgM) in vklopimo program za izpiranje vseh igel in poti oziroma cevk.
- Zgoraj omenjene reagentne je treba vložiti v posebno stojalo. V posebno plastično košarico v stojalu vložijo kroglice prekrite z antihumanimi protitelesi IgM. Na posebno mesto v aparatu vložimo substrat v posodici. Na prostor za epruvete vložimo stojalo s 15 epruvetami, ki vsebujejo serume preiskovancev.
- Na posebno mesto v aparatu vložimo stojalo s COBAS CORE reakcijskimi epruvetami.
- V posebnih posodah, ki sta povezani z aparatom, pripravimo tudi izpiralec za izpiranje nevezanega antigena ter destilirano vodo za izpiranje igel in cevk.
- Poženemo aparat.
- Postopek traja okoli štiri ure.
- Po končanem testu poženemo še program za izpiranje in čiščenje igel ter cevi.

Kontrolni postopki in njihova pogostnost:

Kontrolo postopka predstavljajo v vsak test vključeni negativni in pozitivni kalibratorji.

Pozitivno kontrolo predstavlja človeški serum z dokazanimi protitelesi proti *T. gondii*, razredčen v razmerju 1:2 (pozitivni kalibrator).

Negativno kontrolo predstavlja človeški serum brez protiteles proti *T. gondii* (negativni kalibrator).

Kalibracijo izvedemo enkrat na teden ob vsaki zamenjavi lota oziroma kadar vrednosti kontrol niso ustrezne.

Razlaga rezultatov

Rezultati so izraženi z absorpcijskimi enotami. S pomočjo kalibratorjev aparat samodejno izračuna mejno vrednost – cut off, in glede na to določi sivo območje »gray zone« (ta je med 90 – 100 % mejne vrednosti). Vse vrednosti, ki so večje od mejne vrednosti, kažejo na pozitiven rezultat; vrednosti, ki so nižje od 90 odstotkov mejne vrednosti, kažejo na negativen rezultat.

Negativna vrednost < 90 odstotkov mejne vrednosti

90 odstotkov mejne vrednosti \leq Sivo območje \geq mejna vrednost

Pozitivna vrednost $>$ mejna vrednost

Prisotnost specifičnih protiteles IgM kaže na nedavno okužbo s toksoplazmo, na reaktivacijo latentne kronične okužbe ali pa na prisotnost perzistentnih protiteles IgM. Ker prisotnost protiteles IgM ne pomeni vedno nedavne okužbe, je treba za potrditev akutne toksoplazmoze pri nosečnicah poleg ugotavljanja prisotnosti protiteles IgM izvesti še dodatne teste:

- ugotavljanje porasta nivoja specifičnih protiteles IgG v serijskih vzorcih istega preiskovanca, odvzetih v razmiku vsaj treh tednov,
- določanje avidnosti specifičnih protiteles IgG.

Dokazovanje protiteles IgG z encimsko-immunskim testom Toxo IgG EIA (Cobas Core, Roche)

S tem testom v serumih nosečnic ugotavljamo specifična protitelesa IgG proti antigenom parazita *T. gondii*. Metoda je kvalitativna in kvantitativna. Rezultat je pozitiven ali negativen. Pri pozitivnem rezultatu vpišemo še število internacionalnih enot na mililiter (IU/ml).

Diagnozo aktivne ali nedavne okužbe s toksoplazmo lahko potrdimo z določitvijo porasta protiteles IgG proti *T. gondii* po dveh do treh tednih. Takrat sočasno izvedemo še Toxo IgM-specifični test.

V prvem delu reakcije vzorce (serume) v aparatu inkubiramo s polistirenskimi kroglicami (nosilci), ki so prekrte s toksoplazemskim antigenom (antigen je pridobljen na celični kulturi). Če so v preiskovanem serumu protitelesa proti toksoplazmam, se ta vežejo na kroglice (nosilce). Nevezan material se s spiranjem odstrani. Vezanim protitelesom pa v drugem delu reakcije aparat doda konjugat; to so z encimom (peroksidazo) označena t.i. monoklonska antihumana protitelesa IgG (mišja). Po drugem spiranju vezani encim reagira z dodanim substratom za encim. Iz količine porabljenega substrata (odraža se v intenziteti

barve) aparat odčita količino specifičnih protiteles v serumu preiskovanca.

Priprava serumov

Protitelesa določamo v serumu ali plazmi. Za analizo zadošča 500 µl seruma in plazme oziroma en do dva ml krvi, ki je bila odvzeta brez sredstev proti strjevanju. Odvzeto kri je treba pred testiranjem centrifugirati in za test uporabiti tekoči del – serum ali plazmo. Vzorce hranimo do pet dni pri 2 – 8 °C; če test v navedenem času ni opravljen, jih je treba zamrzniti pri -20 °C.

Postopek dokazovanja protiteles IgG z encimsko imunskim testom Toxo IgG EIA (Cobas Core, Roche)

- Pol ure pred testom postavimo diagnostični komplet in serume, ki jih želimo testirati, na sobno temperaturo (20 do 25 °C).
- Vključimo aparat (v računalniški program na začetku vnesemo zahtevane podatke za diagnostiko toksoplazmoze) in vklopimo program za izpiranje vseh igel in poti oziroma cevk.
- Reagente – kontrola 1, kontrola 2, kalibrator, konjugat, pufer in razredčilo III vložimo v za to namenjeno stojalo. V posebno plastično košarico v stojalu vložimo kroglice z antigenom. Na posebno mesto v aparatu vložimo substrat v posodici. Na mesto za epruvete vložimo stojalo s 15 epruvetami, ki vsebujejo serume nosečnic.
- Na posebno mesto v aparatu vložimo stojalo s COBAS CORE reakcijskimi epruvetami.
- V posebni posodi, ki sta povezani z aparatom, pripravimo tudi izpiralec za izpiranje nevezanega antigena ter destilirano vodo za izpiranje igel in cevk.
- Vzorce oziroma serume vnesemo po zaporednih številkah v računalniški program.
- Poženemo aparat.
- Postopek traja okoli štiri ure.
- Po končanem testu poženemo še program za izpiranje in čiščenje igel ter cevi.

Kontrolni postopki in njihova pogostnost

Kontrolo postopka predstavljajo v vsak test vključeni kalibrator z znanim številom IU/ml, kontroli 1 in 2 ter serum predhodnega testa z znano vrednostjo IU/ml. Kalibracijo izvajamo vsakih 14 dni, kontrolo 1 in kontrolo 2 po vsaki zamenjavi novega lota, serum predhodnega testa pa kontroliramo pri vsakem novem testiranju.

Razlaga rezultatov

Rezultati so izraženi v mednarodnih enotah na mililiter (IU/ml). Vrednost toksoplazemskih protiteles IgG pod 6 IU/ml pomeni negativni test, nad ali enaka 6 IU/ml pa pozitivni test. Pri istočasnem pregledu seruma z IgG in IgM testom se upošteva mejna vrednost (+/- 1 od 6 IU/ml).

V kolikor sumimo, da je preiskovanec izpostavljen parazitu *T. gondii*, moramo že vrednosti protiteles IgG proti toksoplazmi med 2 in 6 IU/ml upoštevati kot znak možne zgodnje serokonverzije. V tem primeru je treba preiskovancu odvzeti drugi serumski vzorec dva do tri tedne po prvem odvzemu in ga moramo testirati skupaj s prvim serumskim vzorcem.

Dokazovanje protiteles IgM proti *T. gondii* z elektrokemiluminescenčnim imunskim testom Elecsys Toxo IgG (ECLIA), Cobas e 411 - Roche

Princip testa

- 1. inkubacija: 10 μ L vzorca se avtomatsko razredči v razmerju 1:20 z Elecsys univerzalnim razredčilom. Doda se rekombinantni antigen specifičen za *T. gondii*, označen z rutenijevim kompleksom. Če so v vzorcu prisotna protitelesa IgM proti *T. gondii*, reagirajo z rekombinantnim antigenom, označenim z rutenijem.
- 2. inkubacija: dodana so biotinizirana monoklonska specifična protitelesa IgM in s streptavidinom prekriti mikrodelci. Kompleks se veže na trdno fazo preko interakcije biotina in streptavidina.
- Reakcijska mešanica se vnese v merilno celico, kjer se mikrodelci magnetno ujamejo

na površino elektrode. Nevezane snovi se nato s spiranjem odstranijo. Napetost na elektrodi nato inducira kemiluminescentno sevanje, ki se izmeri s fotomultiplikatorjem.

- Rezultati se določijo avtomatsko s programsko opremo Elecsys, in sicer tako, da se primerja elektrokemiluminescentni signal pridobljen iz reakcijskega produkta vzorca ter signal mejne vrednosti (cut off), prej pridobljene s Toxo IgM kalibracijo.

Kontrolni postopki in njihova pogostost

Kontrolo postopka predstavljajo v vsak test vključen negativen in pozitiven kalibrator.

Pozitivno kontrolo predstavlja človeški serum z dokazanimi protitelesi IgM proti *T. gondii* (pozitiven kalibrator).

Negativno kontrolo predstavlja človeški serum brez protiteles IgM proti *T. gondii* (negativen kalibrator).

Kalibracijo izvedemo vsaj enkrat na 24 ur, ob vsaki zamenjavi lota oziroma kadar vrednosti kontrol niso ustrezne.

Razlaga rezultatov

Aparat avtomatično izračuna mejno vrednost - cut off na podlagi meritev pozitivne in negativne kontrole ter glede na to določi sivo območje »gray zone« (ta je med 80 - 100 odstotki mejne vrednosti). Rezultat je podan bodisi kot pozitiven bodisi kot negativen kot tudi v obliki indeksa mejne vrednosti (signal sample/cut off). Vse vrednosti, ki so večje od mejne, kažejo na pozitiven rezultat; vrednosti, ki so nižje kot 80 odstotkov mejne vrednosti, kažejo na negativen rezultat. Če so rezultati nahajajo v sivi coni, je treba vzorec znova analizirati, in v primeru, da je rezultat še vedno v sivi coni, testiranje ponoviti čez dva do tri tedne.

Negativen rezultat: $< 80 \%$ mejne vrednosti

80% mejne vrednosti \leq sivo območje \geq mejna vrednost

Pozitiven rezultat: \geq mejna vrednost

Negativen rezultat Toxo IgM testa – tudi v kombinaciji s pozitivnim rezultatom Toxo IgG

testa – ne izključuje nujno možnosti akutne okužbe s *T. gondii*.

Pri posameznikih v zgodnji fazi akutne okužbe je količina toksoplazemskih protiteles IgM morda premajhna, da bi jih lahko zaznali.

Pri nekaterih od njih je rezultat Toxo IgG testa v sivi coni ali nizko pozitiven in kaže na zgodnjo akutno okužbo. Potrebno je ponovno testiranje v roku dveh tednov. Če ugotovimo prisotnost toksoplazemskih protiteles IgM in/ali občutno povečanje titra toksoplazemskih protiteles IgG v drugem vzorcu to potrdi diagnozo akutne okužbe s *T. gondii*.

Pri nekaterih posameznikih lahko toksoplazemska protitelesa IgM upadejo pod mejo detekcije v nekaj tednih po okužbi s *T. gondii*.

Dokazovanje protiteles IgG proti *T. gondii* z elektrokemiluminescenčnim imunskim testom Elecsys Toxo IgG (ECLIA), Cobas e 411 - Roche

Princip testa

Sendvič princip:

- 1. inkubacija: 10 µL vzorca, *T. gondii* - specifični biotinizirani rekombinantni antigen in *T. gondii* - specifični rekombinantni antigen označen z rutenijevim kompleksom, tvorijo sendvič kompleks.
- 2. inkubacija: po dodatku s streptavidinom prekritih mikrodelcev se preko interakcije biotina in streptavidina kompleks veže na trdno fazo.
- Reakcijska mešanica se vnese v merilno celico, kjer se mikrodelci magnetno pritrdijo na površino elektrode. Nevezane snovi se nato s spiranjem odstranijo. Napetost na elektrodi nato inducira kemiluminescentno sevanje, ki ga izmeri fotomultiplikator.
- Rezultati se določijo s kalibracijsko krivuljo. Ta je generirana z dvotočkovno kalibracijo in glavno krivuljo, ki jo določa črna koda reagenta.

Kontrolni postopki in njihova pogostost

Kontrolo postopka predstavljajo v vsak test vključen negativen in pozitiven kalibrator.

Pozitivno kontrolo predstavlja človeški serum z dokazanimi protitelesi IgG proti *T. gondii* (pozitiven kalibrator).

Negativno kontrolo predstavlja človeški serum brez protiteles IgG proti *T. gondii* (negativen kalibrator).

Kalibracijo opravimo vsaj enkrat na 24 ur, ob vsaki zamenjavi lota oziroma kadar vrednosti kontrol niso ustrezne.

Vrednotenje rezultatov

Aparat avtomatično izračuna koncentracijo vsakega vzorca v IU/ml. Vzorci s koncentracijo < 1 IU/ml so negativni, vzorci s koncentracijo med 1 IU/ml in < 3 IU/ml pa so v sivi coni. Če se rezultati nahajajo v sivem območju, je treba vzorec znova analizirati, in v primeru, da je rezultat še vedno v sivem območju, testiranje ponoviti čez dva do tri tedne. Vzorci s koncentracijo ≥ 3 IU/ml so pozitivni na protitelesa IgG proti *T. gondii* in kažejo na akutno ali latentno okužbo. Akutna okužba se kaže z visokimi vrednostmi toksoplazemskih protiteles IgG in s prisotnostjo toksoplazemskih specifičnih protiteles IgM.

Negativen rezultat: < 1 IU/ml

1 IU/ml \leq sivo območje < 3 IU/ml

Pozitiven rezultat: ≥ 3 IU/ml

Ob negativnem rezultatu testa ne moremo popolnoma izključiti možnosti okužbe s *T. gondii*. Nekateri posamezniki namreč v začetni fazi okužbe ne kažejo zaznavnih protiteles IgG.

Če v posameznem vzorcu ugotovimo prisotnost toksoplazemskih protiteles IgG to kaže na izpostavitvev *T. gondii*, vendar to ni dovolj za razlikovanje med akutno in latentno okužbo (ne glede na vrednosti protiteles IgG).

Dokazovanje avidnosti protiteles IgG z encimsko imunskim testom Beia Toxo-IgG avidity (Bouty)

Ker s prej navedenimi testi ne moremo natančno določiti, kdaj je prišlo do okužbe s *T. gondii*, je za potrditev ali izključitev primarne okužbe v začetku nosečnosti posebno

uporaben test avidnosti, saj oceni čas okužbe s *T. gondii*. Protitelesa nastala v zgodnji fazi okužbe imajo nižjo avidnost, medtem ko visoka avidnost kaže, da gre za okužbo v preteklosti.

Za določanje avidnosti IgG uporabljamo encimski imunski test (EIA) Beia Toxo-IgG avidity (Bouty). V vdolbinici (vdolbinica „a“ in vdolbinica „b“) mikrotitrskе ploščice nanese razredčine testnih serumov in kontrolne vzorce. Na dnu vsake jamice so pritrjeni toksoplazemski antigeni, na katere se vežejo specifična protitelesa IgG proti toksoplazmam preiskovanega seruma. Druga protitelesa in serumske proteine z izpiranjem odstranimo. Nato v vdolbinici „a“ inkubiramo PBS raztopino (pufer), v vdolbinici „b“ pa t.i. „avidity solution“ (pufer in barvilo), ki odstrani protitelesa z nizko avidnostjo. Po izpiranju v obe vdolbinici dodamo še HRP-konjugat (hrenova peroksidaza konjugirana z mišjimi protitelesi proti humanimi IgG in rdeče barvilo), da se vežejo vsi IgG v vdolbinici „a“ in preostanek IgG v vdolbinici „b“. Zato je encimska aktivnost sorazmerna s koncentracijo protiteles IgG proti toksoplazmam v vzorcu. Nato dodamo še substrat in raztopino kromogena, s čimer izzovemo barvno reakcijo (obarvanje v modro). Encimsko reakcijo zaustavimo z dodatkom žveplene kisline, ki spremeni modro barvo v rumeno. S spektrometrom pri valovni dolžini 450 nm odčitamo optično gostoto vzorca. S pomočjo umeritvene krivulje pretvorimo optične gostote posameznih vzorcev iz vdolbinice „a“ in „b“ v mU/ml. Razmerje med količino IgG v vdolbinici „a“ in vdolbinici „b“ odraža avidnost vzorca, ki ga analiziramo.

Priprava serumov

Za analizo lahko uporabimo plazmo ali serum. Vzorec ne sme biti hemoliziran. Če vzorcev ne testiramo v 24 urah, jih za dan ali dva shranimo pri 2 °C - 8 °C. Za daljše shranjevanje je potrebno vzorce zamrzniti. Pred analizo moramo vzorce razredčiti, kot je prikazano v spodnji tabeli.

Preglednica 1: Redčenje vzorca za določanje avidnosti protiteles IgG

anti-Toxoplasma IgG (IU/ml)	Razredčeni vzorci
< 50	1:50
50 - 100	1:100
100 - 250	1:200
>250	1:500 in 1:2000

Kontrola

Kontrola H (high) vsebuje človeški serum z visoko avidnimi protitelesi IgG na toksoplazmo, razredčen s pufrom. Kontrola L (low) vsebuje človeški serum z nizko avidnimi protitelesi IgG na toksoplazmo, razredčen s pufrom.

Izračun rezultatov

- Treba je narisati umeritveno krivuljo. Na y os nanese optično gostoto, na x os pa standardno koncentracijo.
- Z interpolacijo grafa določimo IgG koncentracijo vzorcev ali kontrol.
- Avidnost vzorcev in kontrol določimo po naslednji formuli:

$$\text{Avidnost \%} = (\text{ostanek IgG}_{(\text{vdolbinica "b"})} / \text{skupen IgG}_{(\text{vdolbinica „a“})}) \times 100$$

Razlaga rezultatov

Preglednica 2: Razlaga rezultatov avidnosti protiteles IgG

Avidnost %	Razlaga
< 15	NIZKA AVIDNOST Primarna okužba, do katere je prišlo v zadnjih 3 mesecih
15 - 25	SREDNJA AVIDNOST Primarna okužba, do katere je prišlo v zadnjih 6 mesecih
> 25	VISOKA AVIDNOST Izključuje primarno okužbo v zadnjih 3 mesecih – kaže na okužbo, do katere je prišlo pred več meseci

4 REZULTATI

V parazitološkem laboratoriju Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani smo v računalniški bazi podatkov od leta 2000 do 2007 na toksoplazmozo pregledali 47048 rezultatov serumov nosečnic. Od teh smo pri 11674 nosečnicah (24,8 odstotka) s serološkimi testi ugotovili prisotnost protiteles proti toksoplazmi. Pri 35374 (75,2 odstotka) nosečnicah nismo ugotovili protiteles proti toksoplazmi. S testom avidnosti specifičnih protiteles IgG smo od leta 2000 do vključno 2007 akutno okužbo ugotovili pri 342 (0,97 odstotka) nosečnicah (95 % CI 0,87 – 1,07 %). Na leto smo odkrili od 32 do 57 nosečnic z akutno toksoplazmozo (z nizko avidnostjo, < 15 %), povprečno pri 42,8 nosečnic na leto. V letih od 2000 do 2007 se je akutno okuženim nosečnicam rodilo 36 okuženih otrok; povprečno 4,5 otroka na leto. Pri novorojenčkih smo ugotovili protitelesa IgM in/ali protitelesa IgA proti toksoplazmi. (preglednice 3, 4, 5).

Preglednica 3: Število pozitivnih in negativnih nosečnic na toksoplazmozo po posameznih letih

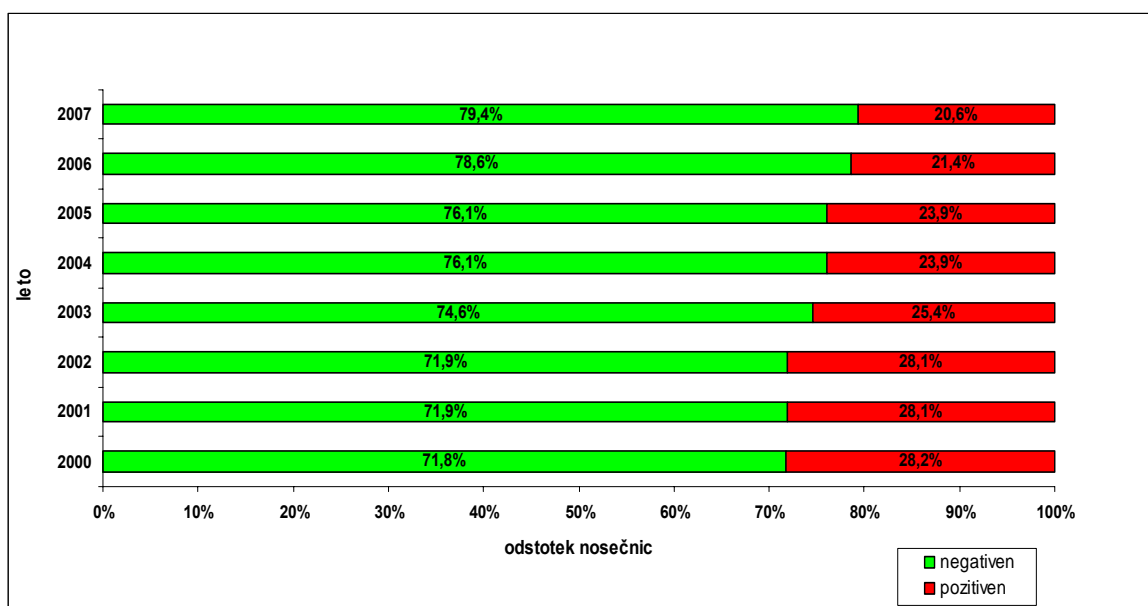
leto	število pregledanih nosečnic	število pozitivnih nosečnic	število negativnih nosečnic
2000	5224	1473 (28,2 %)	3751 (71,8 %)
2001	5718	1609 (28,1 %)	4109 (71,9 %)
2002	5708	1602 (28,1 %)	4106 (71,9 %)
2003	5518	1400 (25,4 %)	4118 (74,6 %)
2004	6082	1455 (23,9 %)	4627 (76,1 %)
2005	6240	1494 (23,9 %)	4746 (76,1 %)
2006	6070	1302 (21,4 %)	4768 (78,6 %)
2007	6488	1339 (20,6 %)	5149 (79,4 %)

Preglednica 4: Število akutno s toksoplazmami okuženih nosečnic in število okuženih otrok po letih

leto	število akutno okuženih nosečnic	število okuženih novorojenčkov
2000	59	4
2001	40	3
2002	43	5
2003	35	1
2004	37	3
2005	57	6
2006	39	10
2007	32	4
skupaj	342	36

Preglednica 5: Celokupni rezultati preiskav nosečnic na akutno toksoplazmozo v osrednji Sloveniji v letih 2000 - 2007

št. pregledanih nosečnic	št. prekuženih nosečnic	št. negativnih nosečnic	št. akutnih okužb	delež akutne toksoplazmoze	št. okuženih otrok
47048	11674 (24,8 %)	35374 (75,2 %)	342	0,97 %	36



Slika 6: Razmerje pozitivnih in negativnih nosečnic na toksoplazemska protitelesa IgG po posameznih letih

5 RAZPRAVA

Z raziskavo, ki so jo opravili na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, so ugotovili, da je odstotek prekuženih nosečnic v obdobju od leta 1996 do 1999 znašal 34 odstotkov (Logar in sod., 2002). V naši raziskavi, ko smo pregledali in analizirali serume nosečnic od leta 2000 do 2007, pa smo ugotovili, da se je odstotek prekuženih nosečnic v tem obdobju znižal na 24,8 odstotka.

Tudi v Evropi poročajo o različni prekuženosti nosečnic na toksoplazmozo. V začetku 90-ih je bila v Nemčiji prekuženost nosečnic 41,6-odstotna, v Italiji na področju Parme 46,8-odstotna, nižja pa v Angliji 22-33-odstotna in na Škotskem 13-17-odstotna, v Avstriji 47-odstotna ter v Franciji na področju Pariza 84-odstotna (Tonkić in sod., 2002).

V Franciji testirajo nosečnice na toksoplazmozo vsak mesec od leta 1978. Ugotovili so, da je prekuženost podobno kot pri nas padla iz 54 odstotkov (leta 1995) na 34 odstotkov (leta 2003) (Villena in sod., 2008). Na Finskem, Švedskem, Norveškem in v Angliji so ugotovili, da večina žensk v rodni dobi ni prekužena s *T. gondii* in so zato dovzetne oziroma v nevarnosti, da se prvič okužijo v nosečnosti.

Na prekuženost ljudi vplivajo predvsem različne prehrabene navade, različne higienske navade ter zemljepisni in podnebni dejavniki območja.

Najpogosteje pride do okužbe z zaužitjem premalo kuhanega oziroma prepečenega mesa, ki vsebuje tkivne ciste, ali z zaužitjem hrane ali pitjem vode, kontaminirane s toksoplazemskimi oocistami okuženih mačk. V mnogih raziskavah so potrdili uživanje surovega ali premalo kuhanega mesa kot visok dejavnik tveganja za okužbo s toksoplazmo. Ena od takih raziskav je evropska študija, ki je vključevala šest evropskih mest – Neapelj, Lusana, Kopenhagen, Oslo, Bruselj in Milano (Cook in sod., 2000). Uživanje surove svinjine in pokušanje surovega mesa med pripravo hrane so glavni faktorji tveganja na Poljskem (Tenter in sod., 2000). O teh faktorjih tveganja okužbe poročajo tudi v Franciji, v Združenih državah Amerike, Jugoslaviji (Baril in sod., 1999; Tenter in sod., 2000).

Čeprav so v mnogih raziskavah uživanje surovega in premalo kuhanega mesa potrdili kot

visok dejavnik tveganja okužbe, se njegova pomembnost razlikuje med različnimi državami. To je verjetno zaradi razlik v prehrabnih navadah ali različnih prevalencah okužbe pri živalih, ki jih vzrejajo za hrano (Tenter in sod., 2000). Vendar pa uživanje mesa ne pojasnjuje povsod visoke prekuženosti ljudi, saj so na primer pri vegetarijancih prav tako odkrili protitelesa proti toksoplazmam kar pri 42 - 47 odstotkih pregledanih (Tenter in sod., 2000).

V nekaterih državah je uživanje surovega ali premalo kuhanega mesa manj pomemben dejavnik tveganja za okužbo s toksoplazmo in so oociste tiste, ki predstavljajo glavni vir okužbe. Tako je na primer v Srednji in Južni Ameriki, kjer običajno uživajo dobro prekuhano meso in je zaužitje oocist iz okolja pomembnejši dejavnik (Meireles in sod., 2004).

V Mehiki in Braziliji predstavljajo visok dejavnik tveganja za okužbo mačke, hranjenje le-teh s surovo drobovino ali surovim mesom (Tenter in sod., 2000).

Do okužbe lahko pride še s pitjem kontaminirane vode, z uživanjem surove in neoprane zelenjave, sadja in zaradi stika oziroma zaužitja kontaminirane zemlje (Tenter in sod., 2000).

Zato je za nosečnice priporočljivo, da ne uživajo slabo predelanega mesa. Čim manj naj prihajajo v stik z mačkami ali zemljo oziroma vodo, onesnaženo z njihovimi iztrebki. Pomembno je še, da si umivajo roke, pribor in kuhinjske površine pri pripravi surovega mesa ter da sadje in zelenjavo dobro operejo ali skuhamo, saj je ta lahko kontaminirana z oocistami toksoplazem. Priporočljivo je tudi, da pri delu na vrtu nosijo rokavice.

Na prekuženost vplivajo tudi zemljepisni in podnebni dejavniki okolja. Infekcija je pogostejša v toplejših krajih in nižinah ter manj pogosta v suhih predelih (Logar, 1999). Prekuženost ljudi in živali z zajedavcem *T. gondii* se spreminja v odvisnosti od zemljepisnega območja, včasih tudi znotraj istega področja. Menijo, da do razlik pride zaradi različne naseljenosti območja z mačkami in posledično različne gostote oocist na določenem predelu. Kot smo že omenili, so raziskave pokazale, da so nosečnice v skandinavskih državah, Angliji in v ZDA prekužene z zajedavcem v nižjem odstotku kot nosečnice v deželah Srednje Evrope. Norveški avtorji poročajo, da je prekuženost nosečnic z zajedavcem v južnih (nižjih) predelih Norveške s toplejšim podnebjem pogostejša kot v

severnih, višje ležečih in bolj mrzlih predelih države. Za Slovenijo pa so ugotovili, da področje z nizko nadmorsko višino in milim podnebjem ni povezano z večjo prekuženostjo nosečnic z zajedavcem. Zdi se, da večje število letnih padavin, vlažna poletja, povprečno višja nadmorska višina in sneg vplivajo na višji odstotek prekuženih nosečnic v celinskem predelu Slovenije. Podnebni pogoji v dveh zemljepisno različnih regijah Slovenije najbrž različno vplivajo na preživetje oocist zajedavca *T. gondii*. Omenjeni pogoji na teh območjih verjetno vplivajo na različno prekuženost živali in posledično ljudi, ki uživajo neustrezno pripravljeno meso okuženih živali (Logar, 2006 a).

Akutno okužbo s toksoplazmozo smo pri nosečnicah v Sloveniji v obdobju od leta 2000 do 2007 ugotovili pri 342 (0, 97 odstotka) nosečnicah. V letih od 1996 do 1999 je akutno toksoplazmozo pri nosečnicah Logar s sod. ugotovil pri 0,94 odstotka nosečnic, kar pomeni da se je v času naše raziskave odstotek akutnih okužb v nosečnosti zvišal za 0,03 odstotka.

Naša raziskava kaže, da se kljub boljšim higienskimi razmeram in večji osveščenosti nosečnic o parazitu *T. gondii* in vedenju o načinih okužbe z njim, število akutnih okužb v nosečnosti iz leta v leto povečuje. Ta ugotovitev in število s toksoplazmami okuženih otrok – vendar brez bolezenskih znakov – kaže, da je testiranje nosečnic na kongenitalno toksoplazmozo v Sloveniji učinkovito in smiselno.

5.1 SKLEPI

- Pri ugotavljanju pogostosti akutne toksoplazmoze v Sloveniji smo na toksoplazmozo iz računalniške baze podatkov pregledali 47048 serumov nosečnic. Od teh je bilo 11674 (24,8 odstotka) serumov pozitivnih na toksoplazmozo, 35374 (75,2 odstotka) serumov pa negativnih. Akutno okužbo s toksoplazmo smo ugotovili pri 342 nosečnicah (0,97 odstotka).
- Ugotovili smo, da je v obdobju od leta 2000 do 2007 incidenca akutne toksoplazmoze pri nosečnicah iz osrednjega dela Slovenije 0,97 odstotka oziroma da je interval zaupanja pri nosečnicah z akutno toksoplazmozo 0,0087 – 0,0107.
- Prekuženost nosečnic je različna v različnih državah. V začetku 90-ih je bila v Nemčiji prekuženost nosečnic 41,6-odstotna, v Italiji na področju Parme 46,8-odstotna, nižja pa v Angliji 22 do 33-odstotna in na Škotskem 13 do 17-odstotna, v Avstriji 47-odstotna ter v Franciji na področju Pariza 84-odstotna. V Sloveniji je bilo v 80. letih 52 odstotkov prekuženih žensk, v 90. letih 37 odstotkov, v naši raziskavi pa smo ugotovili, da je prekuženost nosečnic v Sloveniji v letih od 2000 do 2007 padla na 24,8 odstotka.
- Menimo, da je do zmanjšanja toksoplazemske prekuženosti nosečnic v Sloveniji prišlo zaradi boljše osveščenosti žensk v rodni dobi in verjetno boljših higienskih razmer.
- Z analizo rezultatov presejalnega testiranja na okužbo s toksoplazmozo nosečnic v Sloveniji smo ugotovili, da se incidenca akutne toksoplazmoze pri nosečnicah stalno povečuje: iz 0,75 odstotka v obdobju od leta 1991 do 1994 se je povečala na 0,94 odstotka v obdobju od 1996 – 1999 in na 0,97 odstotka v obdobju od leta 2000 do 2007.
- Raziskava kaže, da se nosečnicam, pri katerih je akutna toksoplazmoza s presejalnim testiranjem pravočasno odkrita in so nato zdravljene, rodijo okuženi (z IgM in/ali IgA protitelesi) novorojenčki, vendar brez bolezenskih znakov.
- Te ugotovitve nakazujejo, da je presejalno testiranje na akutno toksoplazmozo v nosečnosti v Sloveniji učinkovito in smiselno.

6 POVZETEK

V raziskavi nas je zanimalo, kako pogosta je akutna toksoplazmoza nosečnic in kolikšno je število s toksoplazmami okuženih novorojenčkov v osrednji Sloveniji. Iz računalniške baze podatkov smo za obdobje od leta 2000 do 2007 zbrali in analizirali toksoplazemske serološke rezultate 47048 nosečnic in število s toksoplazmami okuženih novorojenčkov. Nosečnice so bile pregledane na toksoplazemska protitelesa IgG in IgM. Pri nosečnicah, ki so bile pozitivne na protitelesa IgG in IgM, je bil narejen še test avidnosti protiteles IgG. Novorojenčki so bili pregledani na toksoplazemska protitelesa IgM in IgA.

Pri pregledu 47048 serumov nosečnic smo ugotovili, da je 11674 (24,8 odstotka) nosečnic na toksoplazmozo pozitivnih in 35374 (75,2 odstotka) nosečnic negativnih. Akutno toksoplazmozo v tem obdobju smo ugotovili pri 342 (0,97 odstotka) nosečnicah. Okužbo s toksoplazmo smo našli pri 36 novorojenčkih.

Najpogosteje pride do okužbe zaradi zaužitja surovega ali premalo kuhanega mesa, ki vsebuje tkivne ciste, ali zaradi zaužitja hrane ali pitja vode, kontaminirane z oocistami okuženih mačk (Tenter in sod., 2000). Uživanje surovega ali premalo kuhanega mesa predstavlja velik dejavnik tveganja v različnih državah, vendar pa se njegova pomembnost in vrsta mesa, pri katerem je tveganje največje, od države do države razlikuje. V Franciji je večji dejavnik tveganja uživanje premalo kuhane govedine, v manjši meri pa tveganje predstavlja uživanje premalo kuhanega ovčjega mesa. Na Norveškem pa je premalo kuhano ovčje meso večji dejavnik tveganja kot premalo kuhana svinjina. To je verjetno zaradi razlik v prehrabnih navadah in različnih prevalenc okužbe pri živalih, ki se jih vzreja za hrano (Tenter in sod., 2000).

Na prekuženost vplivajo tudi zemljepisni in podnebni dejavniki okolja. Okužba je pogostejša v toplejših krajih in nižinah ter manj pogosta v suhih predelih (Logar in sod., 1999). Na Norveškem so ugotovili, da je prekuženost nosečnic z zajedavcem v južnih (nižjih) predelih s toplejšim podnebjem pogostejša kot v severnih, višje ležečih in bolj mrzlih predelih. V Sloveniji pa so ugotovili, da področje z nizko nadmorsko višino in milim podnebjem ni povezano z večjo prekuženostjo nosečnic z zajedavcem. Zdi se, da večje število letnih padavin, vlažna poletja, povprečno višja nadmorska višina in sneg

vplivajo na višji odstotek prekuženih nosečnic v celinskem predelu Slovenije. Podnebni pogoji verjetno različno vplivajo na preživetje oocist *T. gondii*. Ti pogoji verjetno vplivajo na različno prekuženost živali in posledično ljudi, ki uživajo neustrezno pripravljeno meso okuženih živali (Logar in sod., 2006).

V primerjavi s prejšnjimi študijami smo ugotovili, da se število oziroma odstotek akutnih okužb iz leta v leto povečuje. V primerjavi z obdobjem od leta 1996 do 1999 se je v letih od 2000 do 2007 odstotek akutnih toksoplazemskih okužb v nosečnosti v Sloveniji povečal za 0,03 odstotka. Zaradi pravočasnega odkritja akutne toksoplazmoze v nosečnosti in zdravljenja akutno okuženih nosečnic ter njihovih novorojenčkov se v obdobju od leta 2000 do 2007 nobeni nosečnici ni rodil zaradi toksoplazmoze poškodovan otrok. Te ugotovitve kažejo, da je presejalno testiranje na akutno oziroma kongenitalno toksoplazmozo v Sloveniji učinkovito in smiselno.

7 VIRI

Baril L., Ancelle T., Goulet V., Thulliez P., Tirard-Fleury V., Carme B. 1999. Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case-control study in France. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 31: 305-309

Blanco J.C., Angel S. O., Maero E., Pszeny V., Serpente P., Garberi J.C. 1992. Cloning of repetitive DNA sequences from *Toxoplasma gondii* and their usefulness for parasite detection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46: 350-357

CDC. 2008 a. Image of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, stained with Giemsa, from a smear of peritoneal fluid obtained from a laboratory-inoculated mouse. Atlanta, CDC – Center for Disease Control and Prevention.

<http://www.cdc.gov> (november 2008): 1 str.

CDC. 2008 b. Image of unsporulated *T. gondii* oocyst in an unstained wet mount. Atlanta, CDC – Center for Disease Control and Prevention.

<http://www.cdc.gov> (november 2008): 6 str.

CDC. 2008 c. Image of *Toxoplasma gondii* sporulated oocyst in an unstained wet mount. Atlanta, CDC – Center for Disease Control and Prevention.

<http://www.cdc.gov> (november 2008): 5 str.

CDC. 2008 d. Image of *Toxoplasma gondii* cyst in brain tissue stained with hematoxylin and eosin. Atlanta, CDC – Center for Disease Control and Prevention.

<http://www.cdc.gov> (november 2008): 3 str.

Cook A.J.C., Gilbert R.E., Buffolano W., Zufferey J., Petersen E., Jenzm P.A., Foulon W., Semprini A.E., Dunn D.T. 2000. Source of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *British Medical Journal*, 321: 142-147

Dubey J.P. 1998. Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradizoites to pepsin and trypsin digestion. *Parasitology*, 116: 43-50

Dubey J.P. 2004. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*, 126: 57-72

Dubey J.P., Beattie C.P. 1988. Toxoplasmosis of animals and man. 1st ed. New York, CRC Press: 120-120

Dubey J.P., Lindsay D.S., Speer C.A. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradisoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 267-299

Feldman H.A. 1982. Epidemiology of toxoplasma infections. *Epidemiology Reviews*, 4: 204-213

Frenkel J., Hassanein K.M., Hassanein R.S., Brown E., Thulliez P., Quintero-Nunez R. 1995. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama City, Panama: five-year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds, and soil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53: 458-68

Knapen F. van, Panggabean S.O. 1982. Detection of *Toxoplasma gondii* antigen in tissues by mean of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *American Journal of Pathology*, 77: 755-777

Knapen F. van, Kremers AF., Franchimont JH., Narucka U. 1995. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cattle and swine in the Netherlands: towards an integrated control of livestock production. *Veterinary Quarterly*, 17: 87-91

Logar J. 1985. Kongenitalna toksoplazmoza v Sloveniji. *Zdravstveni vestnik*, 54: 369-373

Logar J. 1998. Laboratorijska diagnostika toksoplazmoze. *Medicinski razgledi*, 37: Suppl 1: 87-93

Logar J. 1999. Parazitologija v medicini. 1.izd. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 64-74

Logar J., Marin J. 1987. Limfadenitis, pogosten pojav pri infekcijah s parazitom *Toxoplasma gondii* in virusom Epstein-Barr. *Zdravstveni vestnik*, 56, 3: 95-97

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., Šoba B., Berce I., Merljak – Skočir L., Drinovec B., Premru-Sršen T., Novak-Antolič Ž. 2006 a. Prekuženost nosečnic s *Toxoplasma gondii* v dveh zemljepisno in podnebno različnih področjih Slovenije. *Medicinski razgledi*, 45: 75-78

Logar J., Žohar-Čretnik T., Štorman A., Premru-Sršen T., Novak-Antolič Ž., Arnež M., Kraut A., Stirn-Kranjc B. 2006 b. Presejalno testiranje na okužbo s *Toxoplasma gondii* v nosečnosti. *Medicinski razgledi*, 45: S 3: 17-20

Mayes J., O'Connor B., Avery R., Castellani W., Carey W. 1995. Transmission of *Toxoplasma gondii* infection by liver transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, 21: 511-515

Meireles LR., Galisteo AJ., Pompeu E., Andrade HF. 2004. *Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. *Tropical Medicine & International Health*, 9: 876-881

Stergar S., Kocjančič K., Šilc M. 1953. Primer toksoplazmoze pri nas. *Zdravstveni vestnik*, 22, 2: 139-143

Tenter A.M., Heckeroth A.R., Weiss L.M. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to human. *International Journal for Parasitology*, 30: 1217-1258

Tonkić M., Punda-Polić V., Sardelić S., Čapkun V. 2002. Učestalost protutijela za toksoplazmu gondii u populaciji splitsko-dalmatinske županije. *Liječnički Vjestnik*, 124: 19-22

Villena I., King L., Ancelle T., Goulet V. Thulliez P., Wallon M. 2008. Surveillance system of congenital toxoplasmosis in France. V: *Toxoplasma centennial congress – from discovery to public health management*, Rio de Janeiro, Brazil, 20-24 september 2008. Rio de Janeiro, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro: 48-49

Zakon o nalezljivih boleznih. 1995. *Uradni list Republike Slovenije*, 5, 69:5291-5300

Spremembe navodila za izvajanje preventivnega zdravstvenega varstva na primarni ravni; shema presejalnega testiranja nosečnice na toksoplazmozo. 1998. *Uradni list Republike Slovenije*, 8, 47:3356-3356

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Jerneju Logarju za pomoč, nasvete in usmerjanje pri izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi recenzentu doc. dr. Miroslavu Petrovcu za pregled in mnenje ter gospodu Jožetu Kastelicu za pomoč pri zbiranju podatkov.

Osebna zahvala gre tudi vsem domačim, ki so mi stali ob strani in me spodbujali.