

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Maja LUNAR

**PRESKUS METODE WESTERN-BLOT ZA UGOTAVLJANJE
EHINOKOKOZE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EVALUATION OF WESTERN BLOT ASSAY FOR DIAGNOSIS OF
ECHINOCOCCOSIS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije.
Opravljeno je bilo v Parazitološkem laboratoriju Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo
Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof.
dr. Jerneja Logarja in za recenzentko prof. dr. Tatjano Avšič-Županc.

Mentor: prof. dr. Jernej Logar

Recenzentka: prof. dr. Tatjana Avšič-Županc

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK,

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Jernej LOGAR,

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

Član: prof. dr. Tatjana AVŠIČ-ŽUPANC,

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Maja Lunar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

| | |
|----|--|
| ŠD | Dn |
| DK | UDK 616.995-078+616.995-097 (043) = 163.6 |
| KG | zoooze/paraziti/ehinokokoza/ <i>Echinococcus granulosus/Echinococcus multilocularis</i> /serološki testi/Western blot/IHA/ELISA/Slovenija |
| AV | LUNAR, Maja |
| SA | LOGAR, Jernej (mentor)/AVŠIČ-ŽUPANC, Tatjana (recenzentka) |
| KZ | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101 |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije |
| LI | 2009 |
| IN | PRESKUS METODE WESTERN-BLOT ZA UGOTAVLJANJE EHINOKOKOZE |
| TD | Diplomsko delo (univerzitetni študij) |
| OP | X, 67 str., 11 pr., 7 sl., 85 vir. |
| IJ | sl |
| JI | sl/en |
| AI | Ehinokokoza pri ljudeh je bolezen, ki jo povzroča ličinka trakulje <i>Echinococcus granulosus</i> in <i>Echinococcus multilocularis</i> . V nalogi smo preskusili in ovrednotili zanesljivost testa Western blot (WB). Šestindevetdeset serumov bolnikov s sumom na ehinokokozo smo najprej pregledali s testom posredne hemaglutinacije (IHA) in encimsko imunskim testom (ELISA). Ko je eden od testov pokazal nejasen, mejen ali pozitiven rezultat, smo vzorce testirali še s testom WB. Ob primerjavi s testom WB smo ugotovili, da je test IHA specifičen v 38,9 % primerov, test ELISA pa v 87,2 % primerov. Za test IHA smo ugotovili 100 % občutljivost, saj ni zgrešil niti enega pozitivnega seruma, medtem ko je test ELISA pokazal le 63,9 % občutljivost (13 lažno negativnih serumov). Za test WB smo ugotovili 93 % občutljivost (3 serume je pokazal lažno negativno) in 92 % specifičnost (5 serumov je pokazal lažno pozitivno). S preskusom testa WB in s primerjavo vseh treh testov (IHA, ELISA, WB) smo ugotovili, da je za presejalno testiranje na ehinokokozo boljši test IHA (pokazal je veliko manj lažno negativnih rezultatov) in ne test ELISA. Za test WB pa smo ugotovili, da je odličen potrditveni test za potrditev rezultatov testa IHA kot tudi testa ELISA. |

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 616.995-078+616.995-097 (043) = 163.6
CX zoonosis/parasites/echinococcosis/*Echinococcus granulosus/Echinococcus multilocularis*/serologic tests/Western blot/IHA/ELISA/Slovenia
AU LUNAR, Maja
AA LOGAR, Jernej (supervisor)/AVŠIČ-ŽUPANC, Tatjana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2009
TI EVALUATION OF WESTERN BLOT ASSAY FOR DIAGNOSIS OF ECHINOCOCCOSIS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 67 p., 11 tab., 7 fig., 85 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Echinococcosis in humans is a disease caused by the larva of tapeworm *Echinococcus granulosus* or *Echinococcus multilocularis*. The aim of the study was to evaluate method Western blot (WB). We first tested 96 serum samples of patients suspicious of having echinococcosis using indirect hemagglutination assay (IHA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Positive, borderline or unclear sample results were retested with WB method. We determined specificity of IHA to be 38.9 % and of ELISA 87.2 %, using WB as a golden standard. Sensitivity of IHA was 100 %, missing not one WB positive serum sample, meanwhile sensitivity of ELISA was only 63.9 % (13 false negative serum samples). Sensitivity of WB was calculated to be 93 % (3 false negative samples) and specificity 92 % (5 false positive serum samples). We concluded that as screening method IHA is better than ELISA, for it gives less false negative results and that WB serves as a great confirmatory test for positive samples by IHA as well as ELISA test.

KAZALO VSEBINE

str.

| | |
|---|------------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)..... | III |
| KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD) | IV |
| KAZALO VSEBINE | V |
| KAZALO PREGLEDNIC..... | VII |
| KAZALO SLIK..... | IX |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI | X |

| | |
|--|-----------|
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 NAMEN NALOGE | 1 |
| 2 PREGLED OBJAV | 2 |
| 2.1 TERMINOLOGIJA | 2 |
| 2.2 MORFOLOGIJA | 2 |
| 2.2.1 Odrasla trakulja | 2 |
| 2.2.2 Jajčeca | 4 |
| 2.2.3 Metacestoda | 4 |
| 2.3 ŽIVLJENJSKI KROG | 4 |
| 2.3.1 <i>E. granulosus</i> | 6 |
| 2.3.2 <i>E. multilocularis</i> | 7 |
| 2.3.3 <i>E. vogeli</i> in <i>E. oligarthrus</i> | 8 |
| 2.4 GENETSKA RAZNOLIKOST | 10 |
| 2.5 KLINIČNA SLIKA | 12 |
| 2.5.1 Cistična ehinokokoza | 12 |
| 2.5.2 Alveolarna ehinokokoza | 14 |
| 2.5.3 Policistična ehinokokoza | 15 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 2.5.3.1 | Trakulja <i>E. vogeli</i> | 15 |
| 2.5.3.2 | Trakulja <i>E. oligarthrus</i> | 15 |
| 2.6 | DIAGNOZA | 16 |
| 2.6.1 | Tehnike slikanja | 16 |
| 2.6.2 | Serološki testi | 17 |
| 2.6.2.1 | Serološki testi za ugotavljanje cistične ehinokokoze | 17 |
| 2.6.2.2 | Serološki testi za ugotavljanje alveolarne ehinokokoze | 20 |
| 2.6.2.3 | Test <i>Echinococcus</i> Western Blot IgG (LDBIO Diagnostics, Lyon, France) | 21 |
| 2.7 | IMUNSKI ODZIV IN SPREMLJANJE POTEKA ZDRAVLJENJA | 23 |
| 2.8 | ZDRAVLJENJE | 25 |
| 2.8.1 | Zdravljenje cistične ehinokokoze | 25 |
| 2.8.2 | Zdravljenje alveolarne ehinokokoze | 26 |
| 2.9 | EPIDEMIOLOGIJA IN PREPREČEVANJE | 26 |
| 3 | MATERIAL IN METODE | 31 |
| 3.1 | MATERIAL | 31 |
| 3.2 | METODE | 31 |
| 3.2.1 | Encimsko imunski test-ELISA | 31 |
| 3.2.2 | Test posredne hemaglutinacije-IHA | 35 |
| 3.2.3 | Test Western blot-WB | 37 |
| 4 | REZULTATI | 43 |
| 5 | RAZPRAVA IN SKLEPI | 52 |
| 5.1 | RAZPRAVA | 52 |
| 5.2 | SKLEPI | 59 |
| 6 | POVZETEK | 61 |
| 7 | VIRI | 63 |

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

str.

| | |
|---|----|
| Preglednica 1: 96 serumov testiranih na ehinokokozo med 1. januarjem 2002 in 31. decembrom 2006 s tremi testi (WB, IHA, ELISA), število pozitivnih (+), negativnih (-) in nejasnih rezultatov (+/-), ter vse možne kombinacije rezultatov..... | 44 |
| Preglednica 2: Število in delež (%) pozitivnih, negativnih in mejnih rezultatov dobljenih s testom IHA, ELISA in WB za ugotavljanje ehinokokoze med 1. januarjem 2002 in 31. decembrom 2006..... | 45 |
| Preglednica 3: Število in delež (%) pozitivnih in negativnih rezultatov testa WB pri serumih, ki so pokazali pozitivne rezultate pri testiranju s testom IHA oz. ELISA za ugotavljanje ehinokokoze..... | 45 |
| Preglednica 4: Število in delež (%) pozitivnih in negativnih rezultatov testa WB pri serumih, ki so pokazali negativne rezultate pri testiranju s testom IHA oz. ELISA za ugotavljanje ehinokokoze..... | 46 |
| Preglednica 5: Število in delež (%) pozitivnih in negativnih rezultatov testa WB pri serumih, ki so pokazali mejne oz. nejasne rezultate pri testiranju s testom IHA oz. ELISA za ugotavljanje ehinokokoze..... | 46 |
| Preglednica 6: Število in delež (%) pozitivnih in negativnih rezultatov serumov testiranih na ehinokokozo s testom ELISA in WB, ter testom IHA in WB; mejne oz. nejasne vrednosti testa IHA in ELISA smo šteli za pozitivne in jih prišteli k pozitivnim serumom..... | 47 |
| Preglednica 7: Število in delež (%) rezultatov serumov testiranih na ehinokokozo, ki so pokazali različne rezultate testa IHA in ELISA v primerjavi s testom WB; mejne oz. nejasne vrednosti testa IHA in ELISA smo šteli za pozitivne in jih prišteli k pozitivnim serumom | 47 |

| | |
|--|----|
| Preglednica 8: Število in delež (%) serumov testiranih na ehnokokozo, ki so pokazali pozitiven ali negativen rezultat s testi WB, IHA in ELISA; mejne oz. nejasne vrednosti testa IHA in ELISA smo šteli za pozitivne vrednosti..... | 48 |
| Preglednica 9: Število in delež (%) serumov testiranih na ehnokokozo, ki so pokazali pozitiven ali negativen rezultat s testi WB, IHA in ELISA; mejne oz. nejasne vrednosti testa IHA in ELISA smo šteli za negativne vrednosti..... | 49 |
| Preglednica 10: Število in delež (%) serumov testiranih na ehnokokozo, ki so pokazali pozitiven ali negativen rezultat s testi WB, IHA in ELISA; mejne oz. nejasne vrednosti testa IHA in ELISA smo prišteli k negativnim oz. pozitivnim, glede na rezultat s testom WB..... | 49 |
| Preglednica 11: Občutljivost, specifičnost testa IHA, ELISA in WB za ugotavljanje ehnokokoze..... | 50 |

KAZALO SLIK

str.

| | |
|--|----|
| Slika 1: Odrasla trakulja <i>E. granulosus</i> (Thompson in McManus, 2001). | 3 |
| Slika 2: Življenjski krog ehinokoka (CDC, 2008). | 5 |
| Slika 3: Južno-ameriški glodavec paka (<i>Coelogenys Paca</i>) (Brehm, 1887). | 9 |
| Slika 4: Pet tipičnih vzorcev, ki jih dobimo s testom <i>Echinococcus</i> Western blot IgG. Pojav pasov kot je pri P1 in P2 kaže na okužbo z <i>E. granulosus</i> , P3 na <i>E. multilocularis</i> , P4 in P5 pa na <i>E. granulosus</i> ali <i>E. multilocularis</i> (Liance in sod., 2000). | 22 |
| Slika 5: Razširjenost <i>E. granulosus</i> v svetu, leta 2002 (Eckert in Deplazes, 2004). | 27 |
| Slika 6: Razširjenost <i>E. multilocularis</i> v svetu, leta 2002 (Eckert in Deplazes, 2004). | 28 |
| Slika 7: Geografska razširjenost okužbe z <i>E. multilocularis</i> v Srednji Evropi v letih 1990 in 1999 (Eckert in sod., 2000). | 30 |

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|----------|--|
| BCIP | 5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat (angl., 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) |
| CT | računalniška tomografija (angl., computed tomography) |
| DNK | deoksiribonukleinska kislina |
| ELISA | encimsko imunski test (angl., enzyme-linked immunosorbent assay) |
| IEP | imunoelektroforeza (angl., immunoelectrophoresis) |
| IFT | posredni imunofluorescenčni test (angl., indirect fluorescent antibody test) |
| IHA | test posredne hemaglutinacije (angl., indirect hemagglutination assay) |
| LAT | test lateksne aglutinacije (angl., latex agglutination test) |
| MRI | magnetna resonanca (angl., magnetic resonance imaging) |
| NBT | nitroblue tetrazolijev klorid (angl., nitro blue tetrazolium chloride) |
| mtDNK | mitohondrijska deoksiribonukleinska kislina |
| PAIR | metoda punkcije, aspiracije, vbrizganja, reaspiracije (angl., puncture, aspiration, injection, reaspiration) |
| PCR | verižna reakcija s polimerazo (angl., polymerase chain reaction) |
| RFLP | polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl., restriction fragment length polymorphism) |
| SDS-PAGE | poliakrilamidna elektroforeza (angl., sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) |
| TMB | tetrametilbenzidin (angl., tetramethyl benzidin) |
| WB | metoda prenosa po Westernu (angl., Western blot) |

1 UVOD

Ehinokokoza pri ljudeh je bolezen, ki jo povzroča ličinka pasje trakulje *Echinococcus granulosus* ali trakulje lisice *Echinococcus multilocularis*. Onkosfera trakulje predre steno tankega črevesja vmesnega gostitelja in ko doseže kapilaro ali črevesno mezgovnico, pasivno potuje do jeter. Največkrat se hidatidna (metacestodna) cista razvije v jetrih, lahko pa tudi v pljučih, ledvicah, vranici, mišicah ali možganih. Bolezen lahko poteka asimptomatsko ali kot huda bolezen, celo s smrtnim izidom.

Za dokaz okužbe, ki jo povzročata ti dve trakulji so na voljo različni serološki testi, katerih kvaliteta oz. zanesljivost je zelo različna.

1.1 NAMEN NALOGE

V nalogi smo si zadali cilj, da za ugotavljanje ehinokokoze preskusimo in ovrednotimo test Western blot (WB). Serume bolnikov s sumom na ehinokokozo smo najprej pregledali s testom posredne hemaglutinacije (IHA) in encimsko imunskim testom (ELISA). Serume z nejasnimi, mejnimi in pozitivnimi IHA in ELISA vrednostmi smo nato pregledali oz. ovrednotili še s testom WB. S primerjavo rezultatov testov smo skušali ovrednotiti zanesljivost testov, ter ugotoviti, če test WB res lahko služi kot zanesljiv potrditveni test nejasnih oz. mejnih vrednosti testa IHA in ELISA. Dobljene rezultate smo statistično preverili s χ^2 testom.

2 PREGLED OBJAV

2.1 TERMINOLOGIJA

Ehinokokoza je zoonoza, ki jo povzroča odrasla žival ali ličinka trakulje (*Cestodes*) iz rodu *Echinococcus* (družina *Taeniidae*). Paraziti za svoj obstoj potrebujejo mesojede živali, ki jim služijo kot končni gostitelji, kjer v črevesju odrasla trakulja producira jajčeca. Z zaužitjem teh jajčec se lahko okužijo živali ali ljudje, vmesni gostitelji. Okužba z ličinko (hidatidna bolezen, hidatidoza) se kaže kot dolgotrajna rast hidatidnih (metacestodnih) cist ali t.i. mehurnjakov v vmesnem gostitelju (Thompson in McManus, 2001).

Medicinsko pomembni vrsti sta *Echinococcus granulosus* in *Echinococcus multilocularis*, ki povzročata cistično in alveolarno ehinokokozo. Le-ti sta obe resni, življenje ogrožajoči bolezni, še posebno alveolarna ehinokokoza z visoko umrljivostjo in hudo prognozo, če okužbe ne zdravimo. Vrsti *Echinococcus vogeli* in *Echinococcus oligarthrus*, povzročata policistično ehinokokozo v Srednji in Južni Ameriki. Poročajo le o nekaj primerih te bolezni pri ljudeh, tako da pravi pomen policistične ehinokokoze ni znan (D'Alessandro, 1997; McManus in sod., 2003).

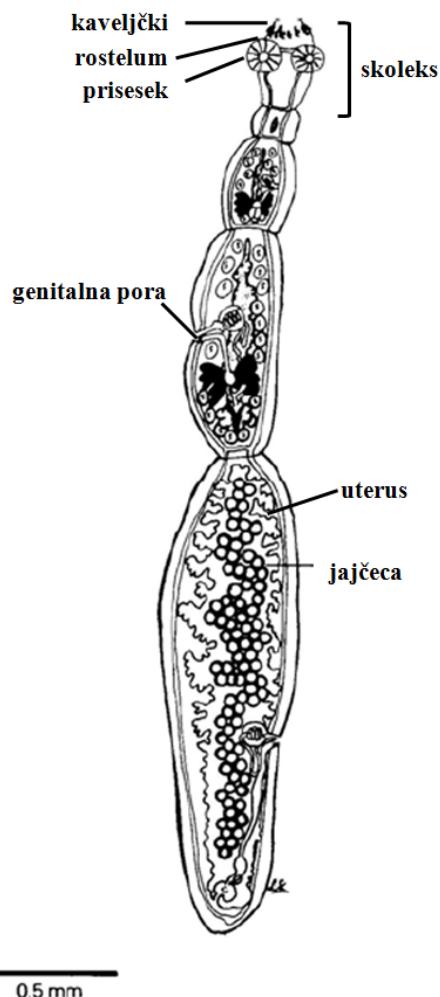
2.2 MORFOLOGIJA

Rod *Echinococcus* ima določene lastnosti, ki ga ločijo od ostalih rodov znotraj družine *Taeniidae*.

2.2.1 Odrasla trakulja

Odrasla žival meri v dolžino le nekaj milimetrov (redko več kot 7 mm). Navadno nima več kot 6 segmentov, za razliko od ostalih predstavnikov družine. Ti lahko zrastejo do nekaj metrov v dolžino in imajo nekaj tisoč segmentov. Kot vse trakulje, tudi ehinokoki nimajo črevesja. Vsi metabolni procesi potekajo preko sincicijske zunanje plasti, tegumenta.

Na sprednji strani ima odrasli parazit poseben organ za pritrjevanje, imenovan skoleks, na katerem so štirje mišičasti priseski in dva niza velikih in majhnih kaveljčkov na t.i. rostelumu. Telo ali strobila je segmentirano, sestavlja ga 2-6 reproduktivnih delov (proglotid). Trakulja je hermafrodit z reproduktivnimi kanali, ki se odpirajo skozi skupno stransko genitalno poro. Uterus se po oploditvi razširi in sčasoma, ko se jajčeca povsem razvijejo, zasede večino terminalne proglotide (slika 1).



Slika 1: Odrasla trakulja *E. granulosus* (Thompson in McManus, 2001).

2.2.2 Jajčeca

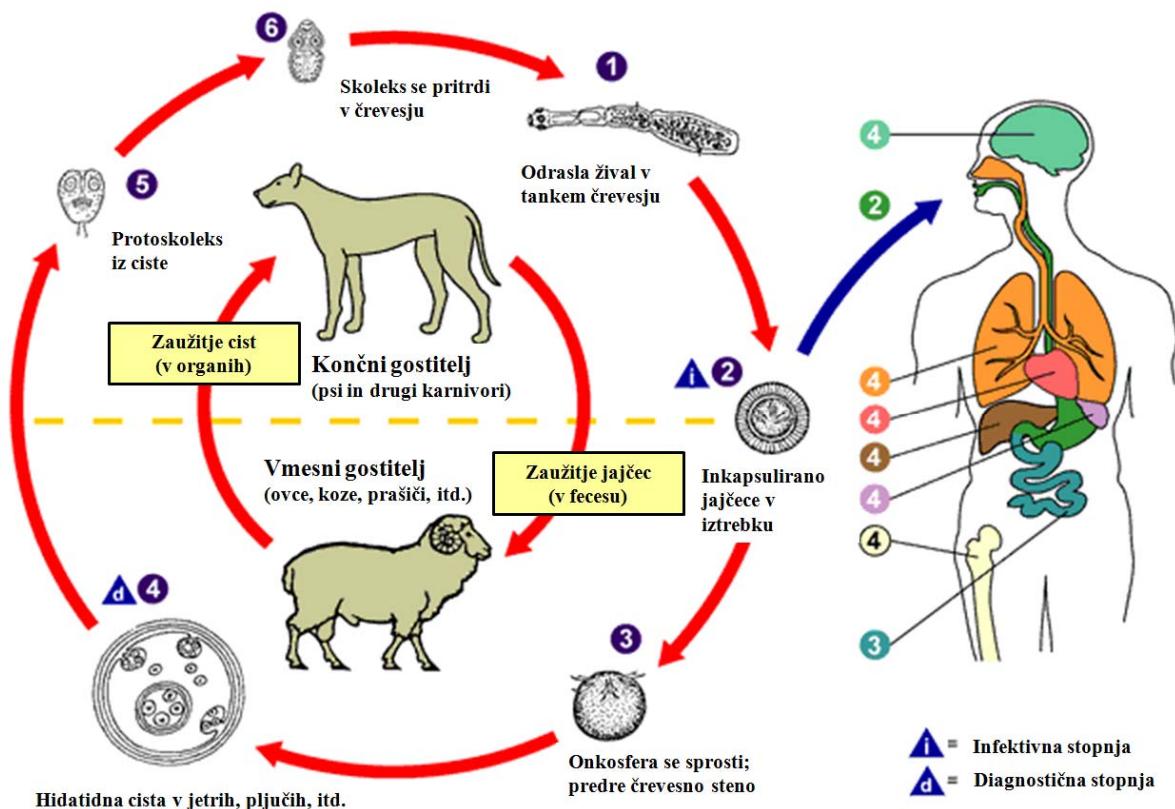
Jajčeca so premera 30-40 µm in vsebujejo zarodek, imenovan onkosfera (prva stopnja ličinke), ki ga obdaja več ovojnici. Ko jajčeca zapustijo gostitelja, zunanjega kapsula hitro izgine. Jajčec ehinokokov morfološko ne moremo razlikovati od jajčec trakulj znotraj rodu *Taenia*.

2.2.3 Metacestoda

Metacestodno cisto (drugo stopnjo ličinke) predstavlja mehur z zunanjoo-acelularno plastjo in notranjo-germinativno plastjo, iz katere lahko brstijo zarodne kapsule. Na notranji steni kapsul nastajajo protoskoleksi. Zgradba in razvoj hidatidne ciste se med vrstami *Echinococcus* razlikujeta.

2.3 ŽIVLJENJSKI KROG

Trakulje rodu *Echinococcus* v svojem življenjskem krogu potrebujejo dve vrsti sesalcev. Končni gostitelj, mesojed, z iztrebki v okolje sprosti proglotide polne jajčec (gravidne proglotide) ali prosta jajčeca trakulje. Jajčeca zaužije vmesni gostitelj, v katerem se razvije metacestodna ličinka in protoskoleksi. Kot vidimo na sliki 2 se krog zaključi takrat, ko takšnega vmesnega gostitelja požre ustrezna mesojeda žival (Thompson in McManus, 2001).



Slika 2: Življenjski krog ehinokoka (CDC, 2008).

Vmesni gostitelji so različni sesalci, ki se okužijo z zaužitjem jajčec. Po delovanju encimov v želodcu in tankem črevesju, se iz keratinske ovojnice sprosti onkosfera. Pri aktivaciji onkosfere sodeluje žolč. Onkosfera predre steno tankega črevesja s pomočjo kaveljčkov in verjetno lastnih izločkov. Ko doseže kapilaro ali črevesno mezgovnico, pasivno potuje do jeter. Največkrat se zadrži v jetrih, lahko pa potuje tudi do pljuč, ledvic, vranice, mišic ali možganov (Thompson, 1995).

Sesalce, pri katerih se po okužbi z jajčeci razvije metacestodna ličinka, imenujemo vmesni gostitelji. Z epidemiološkega vidika bi bilo smiselno razlikovati med vmesnimi gostitelji, ki so nujni za neprekinjen potek življenjskega kroga parazita, in naključnimi gostitelji, ki za parazita predstavljajo slepo ulico, saj ne sodelujejo pri prenosu bolezni. To je lahko zaradi dveh razlogov: ker cista ne postane plodna v teh gostiteljih, ali ker ti sesalci ne

sodelujejo v krogu prenosa. Ker je za zaključen življenjski krog parazita potrebna stopnja, pri kateri mesojeda žival požre okuženo rastlinojedo žival, predstavlja človek za trkuljo naključnega gostitelja. To pa ne drži vedno. Mnoge nomadske skupine v visoko endemskih predelih vzhodne Afrike (kot na primer regija Turkana na SZ Kenije) namreč ne zakopavajo umrlih. Psi in divji mesojedi se tako lahko prosto hranijo na njih in v teh izjemnih primerih lahko predstavlja človek za *E. granulosus* vmesnega gostitelja (Macpherson, 1983; Thompson in McManus, 2001).

Ko onkosfera doseže svojo končno lokacijo v telesu, se razvije v metacestodno stopnjo. Rast lahko poteka različno dolgo časa in do razvoja protoskoleksov (plodnih oblik ličinke) lahko preteče več mesecev. Znotraj ene ciste *E. granulosus* ali skupka veziklov *E. multilocularis* se lahko nahaja več tisoč protoskoleksov. Iz vsakega takšnega protoskoleksa se lahko razvije spolno zrela odrasla žival. Vendar vse metacestodne ciste ne ustvarjajo protoskoleksov (sterilna metacestoda). Ko protoskolekse zaužije ustrezen končni gostitelj, se po delovanju pepsina v želodcu, sprostijo iz ovojnice kot odgovor na spremembo v pH, izpostavljenosti žolču in povišani temperaturi. Približno 4-6 tednov po okužbi nato dozorijo v spolno zrele, odrasle trkulje. Ta čas je odvisen od vrste in seva trkulje ter od dovzetnosti gostitelja (Thompson in McManus, 2001).

2.3.1 *E. granulosus*

Hidatidne ciste *E. granulosus* se razvijejo v notranjih organih (večinoma v jetrih in pljučih) živali ali ljudi, vmesnih gostiteljev. Cista je v obliki mehurja brez prekatov (unilokularna), napolnjena s tekočino.

Končni gostitelji *E. granulosus* so mesojedi, kot so psi in volkovi. Okužijo se z zaužitjem drobove, ki vsebuje hidatidne ciste polne živih protoskoleksov. Te se sprostijo iz ovojnice, pritrdijo na črevesno sluznico živali in razvijejo v odrasle trkulje. Spolno dozorijo v 4-5 tednih in dosežejo velikost 3-6 mm. Jajčeca in gravidne proglotide se

sproščajo s fecesom. Ko človek ali rastlinojeda žival (ovca, koza, prašič, govedo, konj ali kamela) zaužije oz. požre jajčece, se iz njega sprosti ličinka, onkosfera. Predre v kapilare (lamina propria) in nato s krvjo ali limfo potuje do jeter, pljuč, ali drugih organov, kjer se onkosfera razvije v hidatidno cisto (metacestodna ličinka). Sestavljena je iz dveh plasti parazitskega izvora: notranje-germinativne membrane, in zunanje-acellularne plasti, ki jo obdaja fibrozna kapsula gostitelja. Iz germinativne membrane brstijo zarodne kapsule in protoskoleksi.

Od infektivnega seva *E. granulosus*, regionalnih ali lokalnih razlik v dostopnosti vrst vmesnih gostiteljev in drugih dejavnikov je odvisno, katere vmesne gostitelje trakulja parazitira. Ta vrsta ehinokoka lahko izbira znotraj široke skupine možnih vmesnih gostiteljev, ki vključuje domače in divje kopitarje iz osmih družin, še posebno votloroge (družina *Bovidae*), kot tudi primate, zajce in kunce (družina *Leporidae*) ter vrečarje (družina *Macropodidae*). Izvorno naj bi življenjski krog *E. granulosus* potekal v divjini med volkovi in jelenjadjo, kot so losi in jeleni, na severu Severne Amerike in v Evroaziji. Najpomembnejše vmesne gostitelje za ohranitev trakulje *E. granulosus* predstavljajo udomačeni kopitarji, med katerimi so prav vse vrste dovezetne za okužbo. Najpomembnejši je življenjski krog, ki vključuje domače pse in ovce. Pri prenosu sodelujejo tudi divje živali kot končni gostitelji (divji psi, šakali, hijene, levi, lisice, dingi, itd.), vendar je takšen prenos glede zoonoze manjšega pomena (Thompson, 1995; Thompson in McManus, 2001).

2.3.2 *E. multilocularis*

Odrasla žival je običajno dolga 1,2-4,5 mm in jo sestavlja 4-5 segmentov. Okužba z odraslo trakuljo *E. multilocularis* poteka v divjini, kjer divji mesojedi, predvsem rdeče lisice (*Vulpes vulpes*) in arktične lisice (*Alopex lagopus*), predstavljajo najpomembnejše končne gostitelje. Trakuljo lahko gostijo tudi domači psi in mačke in so tako udeleženi v sinantropični krog. Mali glodavci (poddružina *Arvicolineae*, ki vključuje voluharje, pižmovke, itd) jim služijo kot vmesni gostitelji (Thompson in McManus, 2001).

Metacestoda trkulje *E. multilocularis* je tumorju podobna, vdirajoča struktura, ki jo sestavlja mnogo majhnih veziklov, vsajenih v stromo sosednjih tkiv. Cista običajno vsebuje poltrden matriks in ne tekočino. Rast poteka endogeno in eksogeno, kar lahko pripisemo nediferenciranim celicam germinativne membrane. Odcepitev zarodnih celic od vdirajoče germinativne membrane in njihovo širjenje preko limfe ali krvi lahko vodi v nastanek oddaljenih metastaz (Ammann in Eckert, 1995; Eckert, 1998).

Za razliko od *E. granulosus*, kjer je rast počasna in raznolika, se *E. multilocularis* v naravnem vmesnem gostitelju razvije hitro, z nastankom protoskoleksov v 2-4 mesecih, kar je prilagoditev na kratko živiljenjsko dobo gostitelja, t.j. malega glodavca. (Rausch, 1975; Rausch, 1995). Tako je čas rasti veziklov krajši in skoraj ni nadaljnega povečanja velikosti ciste. Pri človeku pa je razvoj ličinke zelo drugačen. Rast je progresivna, a počasna, z nastankom le nekaj protoskoleksov (Rausch in Wilson, 1973; Ammann in Eckert, 1995; Eckert, 1998). Cista se na obrobju širi, sočasno pa znotraj prihaja do regresivnih sprememb. S tem nastaja vedno večja masa nekrotičnega tkiva z relativno tankim delom živega parazita. Ime alveolarna ehinokokoza se nanaša na alveolarno zgradbo metacestodnega tkiva, ki ga sestavlja skupek majhnih veziklov, velikih do približno 3 cm v premeru (Thompson in McManus, 2001).

Vir te okužbe za človeka so navadno divje živali, lahko pa tudi psi. Ni znano, ali so lahko vir okužbe tudi mačke. Kot pri *E. granulosus*, velja tudi za *E. multilocularis*, da je človek izpostavljen okužbi pri rokovovanju z okuženimi gostitelji, ali z zaužitjem hrane, ki je kontaminirana z jajčeci te trkulje. Pri prenosu lahko, kot mehanični vektorji prenosa jajčec obeh trkulj, sodelujejo koprofagne muhe (McManus in sod., 2003).

2.3.3 *E. vogeli* in *E. oligarthrus*

Trakulji *E. vogeli* in *E. oligarthrus* povzročata policistično ehinokokozo, zoonozo prisotno zgolj v ruralnih tropskih predelih Amerike. Edini končni gostitelj parazita *E. vogeli* je divji gozdni pes (*Speothos venaticus*), medtem ko je za trakuljo *E. oligarthrus* vsaj šest vrst divjih mačk (puma, jaguar, ameriški leopard...). Za glavnega vmesnega gostitelja veljajo pake in aguti (slika 3). *E. oligarthrus* lahko parazitira ljudi, a veliko redkeje kot to velja za *E. vogeli*. Enako razmerje velja med okužbami glodavcev. To razliko v prevalenci lahko pripisujemo mačji navadi zakopavanja lastnih iztrebkov.



Slika 3: Južno-ameriški glodavec paka (*Coelogenys Paca*) (Brehm, 1887).

Zgleda, da je ličinka *E. vogeli* manj specifična za določene organe in hitreje raste, kot ličinka *E. multilocularis*. Najdemo lahko namreč že napredovanbo bolezen kljub nizki starosti bolnika.

Diferencialna diagnoza med temi vrstama temelji na morfologiji kaveljčkov protoskoleksov. Odrasla trakulja *E. vogeli* je dolga 3,9-5,6 mm, navadno s tremi segmenti. Ima relativno dolgo, cevasto gravidno proglotido. *E. oligarthrus* trakulja je manjša, običajno meri v dolžino le 2,2-2,9 mm.

Razlikujejo se tudi metacestodne ličinke. Tako je pri *E. vogeli* debela zunanja in tanka germinativna ovojnica, pri *E. oligarthrus* pa obratno. Germinativna membrana in protoskoleksi *E. oligarthrus* imajo mnogo apnenčastih teles, ki so pri *E. vogeli* skoraj odsotna. Ciste *E. vogeli* so lahko različnih velikosti (2-80 mm) in se pojavljajo posamično,

v majhnih skupinah ali občasno v tesnih skupkih, kjer je vsaka cista posebej obdana z lastno ovojnico (adventicijo). Zaradi endogenega brstenja prihaja do pojava sekundarnih razdelkov znotraj primarnih veziklov, kjer brstijo zarodne kapsule in protoskoleksi. Tudi pri *E. oligarthrus* je ličinka policistična in napolnjena s tekočino, vendar je tu manj razdelitev v sekundarne razdelke.

K postavitvi diagnoze pomembno prispeva vedenje o geografskem poreklu bolnika. Če je oseba dolgo živela v ruralnih predelih tropske kontinentalne Amerike z veliko divjadi, je veliko večja možnost okužbe s to trakuljo, kot pri osebi, ki ni živela v takih predelih Amerike. Poznavanje pak, hranjenje njihovega mesa psom in dolgotrajen kontakt z domačimi psi ali mačkami tudi poveča možnost okužbe. Bolezen se običajno pojavlja zunaj endemskega področja razširjenosti *E. granulosus* (D'Alessandro, 1997; Thompson in McManus, 2001).

2.4 GENETSKA RAZNOLIKOST

Vrsta *E. granulosus* vsebuje več različic ali sevov, ki se bistveno razlikujejo med seboj glede genetskega materiala. Nasprotno pa se zdi, da je pri vrsti *E. multilocularis* genetska raznolikost zelo majhna. Za genetsko raznolikost trakulj *E. vogeli* in *E. oligarthrus* ni podatkov (Haag in sod., 1997; Thompson in McManus, 2001).

Genetska raznolikost znotraj vrste *E. granulosus* se kaže tudi v različnih življenjskih krogih, gostiteljski specifičnosti, hitrosti razvoja trakulje, antigenosti, dinamiki prenosa, občutljivosti na zdravila in patologiji (Thompson in McManus, 2001). Ta vedenja imajo pomemben vpliv na razvoj in izdelavo cepiv, diagnostičnih reagentov in zdravil. Tako na primer odrasla trakulja govejega seva prične s produkcijo jajčec v končnem gostitelju v 33-35 dneh, kar je skoraj teden dni prej kot trakulja ovčjega seva (Thompson, 1995). Ugotovitev, da se v končnem gostitelju različice *E. granulosus* razvijejo različno hitro, nakazuje potrebo po določitvi obdobja, ko je potrebno dati zdravilo, da le-to uniči parazite

še pred njihovo patogenostjo (Thompson in McManus, 2002). Ta lastnost trakulje otežkoča obvladovanje ehinokokoze, saj je zdravljenje bistveno za prekinitev življenjskega kroga parazita na stopnji končnega gostitelja (McManus in sod., 2003).

V zadnjem času so začeli zagovarjati ponovno opredelitev taksonomije *E. granulosus*. Pojem seva postaja vedno močnejši, zaradi vedno več zbranih dokazov o genetski raznolikosti med *E. granulosus* različnih vrst vmesnih gostiteljev. Z molekularnimi analizami predvsem zaporedja mitohondrijske DNK (mtDNK) so do danes identificirali 10 značilnih genetskih tipov (genotipi G1-10) znotraj vrste *E. granulosus*. Ta genetska raznolikost korelira s fenotipsko in tako je prišlo do osnovanja pojma »gostiteljsko-prilagojeni sevi *E. granulosus*«. Glede na različne biološke, epidemiološke, biokemijske in molekularno-genetske kriterije je razlogov za pridobitev statusa samostojne vrste za kar nekaj sevov zelo veliko (Thompson in McManus, 2002; McManus, 2002; Xiao in sod., 2005). To še posebej velja za seva konj-pes (genotip G4) in ovca-pes (genotip G1), za katera so ugotovili, po primerjavi celotnih mtDNK zaporedij teh dveh sevov in zaporedja vrste *E. multilocularis*, da se seva med seboj razlikujeta toliko kot od *E. multilocularis* (Le in sod., 2002). Molekularna karakterizacija je pokazala, da so genetske razlike med sevi vrste *E. granulosus* ohranjene in se dosledno pojavljajo v izolatih različnih vrst vmesnih gostiteljev povsod po svetu. Sedaj je na voljo dovolj morfoloških, bioloških in genetskih podatkov na podlagi katerih ločimo seve oz. genotipe *E. granulosus*, da bi lahko povečali število vrst rodu *Echinococcus* na šest vrst; za konjski (*E. equinus*) in goveji sev (*E. ortleppi*) (Thompson in McManus, 2002; Xiao in sod., 2005).

Poleg tega pa znotraj rodu *Echinococcus* odkrivajo nove in nove vrste. Tak primer je *Echinococcus shiquicus*, ki so ga odkrili pri tibetanskih lisicah (*Vulpes ferrilata*) in zajcih žvižgačih (*Ochotona curzoniae*) na Kitajskem. Od že znanih vrst ga ločijo morfološke in genetske značilnosti (Xiao in sod., 2005).

Tehnika PCR-RFLP prstni odtis in/ali določitev zaporedja gena CO1/ND1 preko PCR/direktnega sekvenciranja predstavlja najboljšo metodo za molekularno identifikacijo vrst in sevov *Echinococcus* (Thompson in McManus, 2001).

2.5 KLINIČNA SLIKA

Ehinokokoza pri ljudeh je bolezen, ki jo povzroča ličinka ehinokoka. Lahko poteka asimptomatsko ali kot huda bolezen, celo s smrtnim izidom. Ličinke vseh štirih poznanih vrst *Echinococcus* lahko okužijo človeka in, glede na izgled ličinke, povzročajo različne oblike ehinokokoze: cistično, alveolarno ali policistično ehinokokozo.

Glede na vir okužbe poznamo primarno in sekundarno ehinokokozo. Pri primarni okužbi se, po zaužitju jajčec in po sprostitvi onkosfer, razvijejo metacestodne ciste na različnih mestih v telesu. Pri sekundarni ehinokokozi pa se metacestodni material širi s primarnega mesta na sosedne ali oddaljene organe in se tam razmnožuje.

2.5.1 Cistična ehinokokoza

Povzročitelj cistične ehinokokoze je ličinka trakulje *E. granulosus*. Metacestoda, ki se razvije iz onkosfere, je cistične oblike in običajno napolnjena z bistro tekočino (hidatidno tekočino). Razvoj iz onkosfere traja 10-14 dni. V tem času se oblikuje mehur (meri 60-70 µm v premer) z germinativno membrano z jedri in tanko plastjo brez jeder. Večina cist raste počasi in postaja obdanih z gostiteljskim tkivom (pericisto). Notranja germinativna membrana metacestodne ciste (endociste) lahko tvori zarodne kapsule in protoskolekse. Čas potreben za nastanek le-teh pri človeku ni znan. Podatki na živalih kažejo, da se po okužbi protoskoleksi razvijajo 10 mesecev ali več. Pri istem bolniku so lahko hkrati prisotne zarodne kapsule (s protoskoleksi) in sterilne ciste (brez protoskoleksov). Pogosto se znotraj materinske ciste tvorijo manjše hčerinske ciste. Več majhnih samostojnih cist, ki

rastejo v medsebojni bližini, lahko tvori skupke. S tem dajejo policističen ali multivezikularen izgled, ki ga moramo ločiti od alveolarne in policistične ehinokokoze.

Ciste *E. granulosus* imajo zelo raznolik naraven potek razvoja in končno velikost. Običajno so velike 1 do 15 cm, vendar so našli tudi mnogo večje ciste, na primer z 48 l tekočine. Raznos živih protoskoleksov ali majhnih hčerinskih cist po predrtju ciste lahko vodi v t.i. sekundarno ehinokokozo (Ammann in Eckert, 1995; Pawlowski, 1997; Pawlowski in sod., 2001).

Začetna faza primarne okužbe je vedno asimptomatska. Tudi majhne (<5 cm), dobro inkapsulirane ciste v organih na mestih, kjer ne povzročajo večje patologije, so lahko brez simptomov več let ali vse življenje (Ammann in Eckert, 1996; Pawlowski, 1997).

Po inkubacijski dobi več mesecev ali let lahko okužba postane simptomatska, ko ciste pritiskajo na sosednje tkivo oz. organ in tako sprožijo druge bolezenske znake. Klinični znaki se lahko pojavijo nenadoma, zaradi spontanega ali povzročenega predrtja ciste. Možna je spontana ozdravitev, zaradi propada in razkroja cist, poapnitve cist ali predrtja cist v žolčevod ali bronhialno drevo z izločitvijo vsebine ciste. Po kirurški odstranitvi cist lahko pride do ponovnega pojava bolezni.

Klinični znaki lahko nastopijo pri ljudeh vseh starosti (pod enim letom starosti do več kot 75 let) in z enako pojavnostjo glede na spol.

Štirideset do 80 % bolnikov ima poškodovan le en organ z eno samo cisto. Najpogosteje so okvarjena jetra, ki skupaj s pljuči predstavljajo okoli 90 % ehinokoknih okužb.

Klinični znaki cistične ehinokokoze so raznoliki in odvisni predvsem od:

- a) vpletenega oz. poškodovanega organa/organov
- b) velikosti cist in njihove lokacije znotraj poškodovanega organa

- c) vpliva rastočih cist na strukture sosednjih organov
- d) zapletov v zvezi s predrtjem ciste, širitevjo protoskoleksov in možno bakterijsko okužbo (Pawlowski in sod., 2001).

Poleg tega lahko zasledimo tudi sistemski imunski odziv kot je koprivnica, astma, anafilaksa ali membranska nefropatija (Ammann in Eckert, 1996). Pogosta je asimptomatska jetrna cistična ehinokokoza, ki lahko ostane brez kliničnih znakov več kot 10 let (Frider in sod., 1999).

2.5.2 Alveolarna ehinokokoza

Povzroča jo ličinka *E. multilocularis* s tumorju podobno, vdirajočo in uničujočo rastjo, ki lahko povzroči resno bolezen z visoko umrljivostjo.

Po zaužitju jajčec se metacestoda razvije skoraj izključno le v jetrih. Lezije v jetrih so lahko le nekaj milimetrov velika žarišča ali pa veliki infiltrati, s premerom 15-20 cm. Od tu se ličinka navadno širi po mezgi ali krvi na sosednje ali oddaljene organe z vdiranjem oz. tvorbo metastaz.

Primere alveolarne ehinokokoze opisujejo kot kronično bolezen, ki sledi začetni asimptomatski inkubacijski dobi, ki traja 5 do 15 let. Smrtnost pri nezdravljenih ali neustrezno zdravljenih bolnikih je visoka. Podatki za 21 bolnikov z Aljaske, ki jih niso zdravili, kažejo, da so preživeli v povprečju 5,3 let od tedaj, ko so postavili diagnozo (Wilson in sod., 1992; Pawlowski in sod., 2001).

Ob delovanju obrambnega mehanizma gostitelja lahko ličinka propade, poapni in na koncu umre, tako da je spontana ozdravitev tudi mogoča. Starost bolnikov ob postavitvi diagnoze je znatno višja pri bolnikih z alveolarno ehinokokozo kot je pri bolnikih s cistično ehinokokozo (za Evropo 50-70 let) (Rausch in sod., 1987; Pawlowski in sod., 2001).

Klinični znaki alveolarne ehinokokoze so primarno holestatska zlatenica (približno pri tretjini primerov) in/ali bolečine v zgornjem delu trebuha (pri tretjini bolnikov). Pri preostali tretjini primerov alveolarno ehinokokozo odkrijejo naključno pri zdravniškem pregledu ob simptomih kot so utrujenost, izguba teže, hepatomegalija ali neobičajnih laboratorijskih izvidih (Ammann in Eckert, 1996; Vuitton in sod., 1996).

2.5.3 **Policistična ehinokokoza**

Do leta 1999 so v Srednji in Južni Ameriki pri ljudeh odkrili 96 primerov policistične ehinokokoze. Od tega je bilo 37 bolnikov okuženih z *E. vogeli*, 3 z *E. oligarthrus*, pri ostalih bolnikih pa vrste niso mogli določiti (Basset in sod., 1998; D'Alessandro, 1997).

2.5.3.1 Trakulja *E. vogeli*

Ličinka trakulje je policistične oblike in se razvije v notranjih organih, najpogosteje jetrih. Pri 78 % bolnikov so prizadeta jetra ali jetra skupaj z drugimi organi (vranico, trebušno slinavko, želodcem, omentumom, mezenterijo, pljuči, prepono, perikardijem, medrebrno mišico, itd.). Drugi najpogosteje prizadeti organ so pljuča (14 %) ali pljuča skupaj z jetri oz. drugimi organi. Klinično je okužba zelo podobna okužbi s cistami *E. granulosus*, tako da diferencialna diagnoza temelji na izolaciji protoskoleksov in morfološkem izgledu kaveljčkov (D'Alessandro, 1997). Možna je imunodiagnoza z uporabo očiščenega antigena *E. vogeli*, ki omogoča ločevanje policistične ehinokokoze od cistične. Ločevanje od alveolarne ehinokokoze pa ni vedno možno (Gottstein in sod., 1995).

2.5.3.2 Trakulja *E. oligarthrus*

Policistično ličinko pri naravnih gostiteljih, živalih, najpogosteje odkrijemo v mišičevju in koži, lahko pa tudi v notranjih organih. Znani so le trije primeri okužbe pri ljudeh; dva očesna primera in en primer z dvema cistama v srcu. Diagnozo so postavili na podlagi morfologije kaveljčkov protoskoleksov (D'Alessandro, 1997; Pawlowski in sod., 2001).

2.6 DIAGNOZA

Postopek diagnoze ehinokokoze pri bolnikih je sledeč:

- sum, ki temelji na kliničnih znakih, presejalnem testiranju ali epidemiološkem vedenju
- potrditev z različnimi tehnikami slikanja in identifikacijo značilnih ali sumljivih struktur cist tipičnih za cistično in morfoloških razred tipičnih za alveolarno ehinokokozo
- potrditev ehinokokoze z ugotovitvijo specifičnih protiteles z imunodiagnostičnimi testi (ELISA, IFT, IHA, imunoblot, itd.)
- pri dvomljivih primerih je možna diagnostična punkcija, če le-te ne odsvetujejo
- lahko pregledujemo material, pridobljen z biopsijo ali pri operaciji: hidatidno tekočino na *Echinococcus* protoskolekse ali kaveljčke; protoskolekse na DNK preko PCR; antigene iz sterilnih cist in material s stene cist na značilne strukture s histologijo.

2.6.1 Tehnike slikanja

V mnogo primerih cistične ehinokokoze se lahko diagnoza postavi z odkritjem značilnih struktur in velikosti cist *E. granulosus* s pomočjo različnih tehnik slikanja, vključno z

ultrazvokom (možna uporaba tudi na terenu), računalniško tomografijo (CT), običajnim rentgenskim pregledom (X-žarki) in magnetno resonanco (MRI). Pri večini bolnikov z alveolarno ehinokokozo pride do nastanka razjed v jetrih, katere lahko najlaže zasledimo z ultrazvokom ali z računalniško tomografijo, lahko pa tudi z drugimi oblikami slikanja. Za etiološko potrditev odkritja struktur navadno uporabljam imunodiagnostične teste za ugotavljanje specifičnih protiteles (Pawlowski in sod., 2001).

2.6.2 Serološki testi

2.6.2.1 Serološki testi za ugotavljanje cistične ehinokokoze

V klinični praksi so posebej pomembni pri diagnostiki cistične ehinokokoze testi, ki detektirajo specifična serumska protiteesa, medtem ko je zaznavanje krožecih antigenov manj ustrezno. Vendar tudi ob uporabi zelo občutljivih testov (kot je IgG ELISA), pri nekaterih bolnikih ni mogoče zaznati protiteles (lažno negativni rezultati). Pogosto ciste v možganih ali očesu in poapnele ciste sprožijo le slab imunski odziv, ali pa ga sploh ne. Ta je lahko slab tudi pri določenih skupinah ljudi in pri majhnih otrocih. Lahko pride tudi do pojava lažno pozitivnih rezultatov, posebno pri bolnikih z drugimi helminti (Pawlowski in sod., 2001).

Primarni serološki testi

Prvi korak pri ugotavljanju prisotnosti specifičnih protiteles so primarni serološki testi za detekcijo serumskih protiteles proti ehinokoku. Najpogosteje uporabljam encimsko imunski test za detekcijo protiteles IgG (IgG-ELISA), test posredne hemaglutinacije (IHA) in lateksno aglutinacijo (LAT). Redkeje uporabljam posredni imunofluorescenčni test (IFT), imunoelektroforezo (IEP) in druge. IgG-ELISA je verjetno najustreznejša izbira, vendar še vedno ni standardiziranega, visoko občutljivega in specifičnega serološkega testa za detekcijo protiteles cistične ehinokokoze. Potrebno je poudariti, da na rezultat

seroloških testov vpliva več dejavnikov: kvaliteta antigenov, metoda testiranja, okužen organ, število hidatidnih cist, raznolikost imunskih odgovorov bolnikov, itd. Z nekaterimi testi se lahko tudi pri več kot 40 % bolnikov ne zazna specifičnih protiteles. Zaradi različnih občutljivosti testov, mnogi laboratoriji v rutinski diagnostiki cistične ehinokokoze uporabljajo vsaj dva različna testa. To običajno izboljša občutljivost (Guisantes, 1997; Craig, 1997; Pawlowski in sod., 2001).

Večina rutinskih testnih sistemov oz. komercialnih testov temelji na uporabi neobdelanih ali pol-predelanih pripravkov antigenov *E. granulosus* (Pawlowski in sod., 2001). Glavna antigena tekočine hidatidnih cist, antigen 5 (termolabilen) in antigen B (termostabilen), skupaj s tekočino hidatidnih cist, najpogosteje uporabljamо kot antigen v testih za serološko diagnostiko cistične ehinokokoze (Zhang in sod., 2003). Sta lipoproteina, sestavljena iz podenot. Pri antigenu 5 so odkrili podenote velike 52-67 kDa pod nereducirajočimi pogoji in podenote 20-24 ter 38 kDa pod reducirajočimi pogoji na poliakrilamidni elektroforezi SDS-PAGE (angl., sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Antigen B sestavljajo 3 podenote velike 8-12, 16 in 24 kDa, odkrite pod reducirajočimi in nereducirajočimi pogoji (Di Felice in sod., 1986; Sheperd in McManus, 1987). Antigen B, prečiščen iz tekočine humanih hidatidnih cist, je s testom ELISA dosegel visoko občutljivost (94 %) in visoko specifičnost (izključujuč 60 % navzkrižnih reakcij v primerih alveolarne ehinokokoze) (Craig, 1997; Rogan in sod., 1991). Antigen B trenutno velja za bolj specifičnega za *E. granulosus* kot je antigen 5 (Siracusano in Vuitton, 1997).

Domnevajo, da je antigen B proteazni inhibitor. Verjetno ni v povezavi z anti-proteazno aktivnostjo, vendar je pomembna lastnost tega antigena tudi zmožnost zaviranja množenja nevtrofilcev. Ti funkciji lahko igrata pomembno vlogo pri preživetju parazita naproti imunskemu odzivu gostitelja (Shepherd in sod., 1991). Antigen 5 je soroden proteazam tripsinske družine. Ima manjšo podenoto, ki omogoča interakcije s površinami celic in ekstracelularnim matriksom, ter večjo podenoto z mnogimi značilnostmi, ki močno

spominjajo na katalitične domene tripsinske družine, vendar njena biološka funkcija še ni znana (Lorenzo in sod., 2003).

Testi, ki uporabljajo neobdelane antigene *E. granulosus* so primerno občutljivi, a njihova specifičnost ni vedno zadovoljiva. Testi dobro kažejo tisto specifičnost, ki pravilno spozna neokužene posamezni, medtem ko je specifičnost slabša v primeru ugotavljanja posameznikov, okuženih z drugimi vrstami parazitov, kot negativnih. Ta navzkrižna reaktivnost je še posebej pogosta v primerih alveolarne in policistične ehinokokoze, cisticerkoze, fascioloze, filarioze in drugih helmintskih okužb, medtem ko je pri okužbi s praživalmi običajno ni. Pozitivne serološke teste je zato potrebno potrditi s sekundarnim, bolj specifičnim testom, razen v primerih očitnih struktur cistične ehinokokoze, vidnih s kakšno od tehnik slikanja (Pawlowski in sod., 2001).

Sekundarni serološki testi

V zadnjih letih so v uporabi mnogi sekundarni testi, kot so detekcija linije precipitata označene kot arc 5, identifikacija podrazredov IgG in imunoblot, ki kaže reaktivnost serumskih protiteles s podenotami antigenov *E. granulosus*. Arc 5 precipitacijski test ima nizko občutljivost (50-60 %), a je specifičen za trakulje, vključno z navzkrižno reaktivnostjo v primerih alveolarne ehinokokoze in v približno 15-20 % primerov cisticerkoze. Detekcija IgG4 je bolj občutljiva, vendar slaba v asimptomatskih primerih cistične ehinokokoze. Do navzkrižne reaktivnosti lahko pride v primerih alveolarne ehinokokoze in v majhnem odstotku cisticerkoze. Visoko občutljivost in specifičnost nudi imunoblot, z detekcijo protiteles proti nekaterim podenotam antigenov *E. granulosus*, predvsem podenotam velikim 39 kDa, 16 kDa in 12 kDa. Tudi tu je možna navzkrižna reaktivnost predvsem z alveolarno ehinokokozo in cisticerkozo (Craig, 1997; Di Felice in sod., 1986; Ioppolo in sod., 1996; Leggatt in McManus, 1994; Leggatt in sod., 1992; Lighthowlers in Gottstein, 1995; Profumo in sod., 1994; Sheperd in McManus, 1987; Siracusano in Vuitton, 1997; Wen in Craig, 1994).

2.6.2.2 Serološki testi za ugotavljanje alveolarne ehinokokoze

Serološka diagnostika alveolarne ehinokokoze temelji na podobnih principih kot so precistični, le da so testi za ugotavljanje alveolarne ehinokokoze navadno bolj zanesljivi (Pawlowski in sod., 2001).

Primarni testi za detekcijo protiteles

Testi ELISA z neobdelanimi antigeni *E. multilocularis*, so lahko bolj občutljivi od testov s prečiščenimi ali rekombinantnimi antigeni, a je zato specifičnost v večini primerov slabša. Protiteesa proti antigenom *E. multilocularis* lahko, zaradi navzkrižne reaktivnosti, zaznamo tudi s pomočjo testov, ki uporabljajo antogene *E. granulosus*, kot so ELISA ali IHA (antigen hidatidne tekočine) ali IFT (antigen protoskoleksov) (Auer in sod., 1988; Lighthowlers in Gottstein, 1995).

Za detekcijo serumskih protiteles (IgG) v primerih alveolarne ehinokokoze je verjetno najboljša izbira ELISA, ki temelji na uporabi prečiščenih antigenov *E. multilocularis*, kot so Em2-antigen (Gottstein in sod., 1993), Em18-antigen (Ito in sod., 1999), Em-alkalni fosfatazni-antigen (Sarciron in sod., 1997), C-antigen (Sato in sod., 1996) ali rekombinantni antigeni II/3-10 (Gottstein in sod., 1993) in Em10 (Helbig in sod., 1993). Ti testi dosegajo občutljivosti od 90 % do 100 %.

Poznamo dve vrsti primarnih protitelesnih testov; testi tipa A: so visoko občutljivi in specifični testi, ki uporabljajo prečiščene antogene *E. multilocularis*; in testi tipa B, ki uporabljajo neobdelane antogene *E. granulosus* ali *E. multilocularis*. V praksi imajo kot primarni testi prednost testi tipa A.

Specifičnost testov je visoka pri populaciji zdravih oseb in oseb s parazitozami. Izjema je cistična ehinokokoza, s katero je pri nekaterih testih možna navzkrižna reaktivnost. Tako je v primeru testa ELISA, ki temelji na uporabi prečiščene fosfataze *E. multilocularis* kot antigena, izjemno visoka občutljivost skupaj z visoko specifičnostjo tudi za primere cistične ehinokokoze (Pawlowski in sod., 2001).

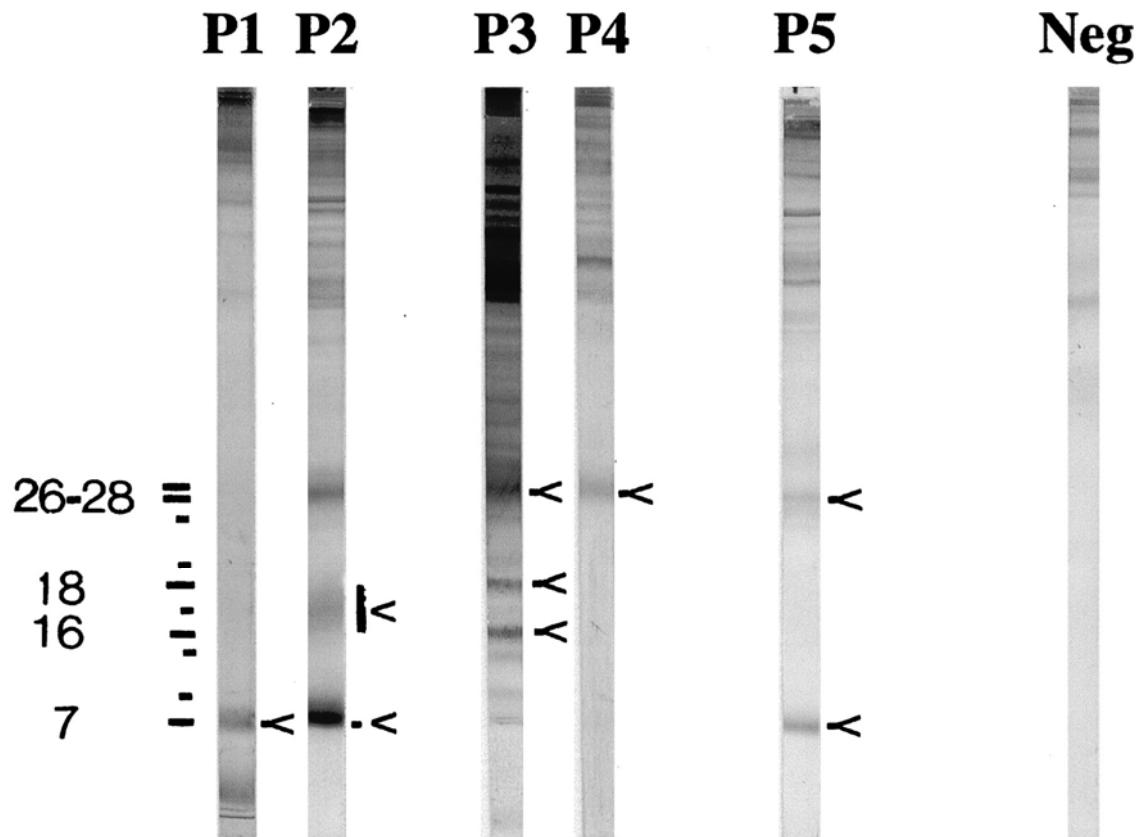
Sekundarni testi za detekcijo protiteles

Kot velja za cistično ehinokokozo, se tudi tu lahko za ocenitev rezultatov primarnih testov uporablajo sekundarni testi, še posebno kadar se za primarno presejalno testiranje uporablajo testi, ki temeljijo na antigenih *E. granulosus* ali neobdelanih antigenih *E. multilocularis*. Potrebni so tudi za izključevanje možnosti navzkrižne reaktivnosti pozitivnih serumov (Pawlowski in sod., 2001). V uporabi so različni testi, kot so Western blot analize (WB) (Ito in sod., 1993; Ito in sod., 1999; Nirmalan in Craig, 1997; Wen in sod., 1995), encimsko imunski test s protoskoleksnim antigenom *E. multilocularis* (Andersen in sod., 1997) in določanje IgG4 s testom ELISA (Dreweck in sod., 1997; Grimm in sod., 1998; Wen in Craig, 1994; Wen in sod., 1995). V uporabi je tudi komercialni test WB (*Echinococcus* WB IgG, LDBIO Diagnostics, Lyons, Francija), ki omogoča razlikovanje med alveolarno in cistično ehinokokozo z zanesljivostjo približno 76 % (Piarroux in sod., 2000).

2.6.2.3 Test *Echinococcus* Western Blot IgG (LDBIO Diagnostics, Lyon, France)

Test *Echinococcus* Western Blot IgG vsebuje kot antigen celoten izvleček ličinke *E. multilocularis*. Ehinokokozna protitelesa v serumih se specifično vežejo na antigene z molekulsko maso pod 30 kDa (slika 4). V primeru pojava enega pasu pri 7 kDa in/ali enega pri 26 do 28 kDa to nakazuje na prisotnost *Echinococcus*-specifičnih protiteles IgG v serumu. Pasovi pri 7, 12, 15, 24 in 26-28 kDa so skupni obema vrstama ehinokoka. V primeru cistične ehinokokoze se protitelesa specifično vežejo na membrano v višini 16 do

18 kDa kot megleen pas. Pri alveolarni ehinokokozi so rezultat specifične vezave ostri pasovi v višini 16, 17, 18 in 20 kDa. Tako je za cistično ehinokokozo specifičen pojavi samo 7 kDa pasu ali le-tega skupaj z 16 do 18 kDa pasom. V primeru nastanka vsaj enega pasu pri 26-28 kDa in dveh ostrih pasov pri 16 in 18 kDa ali pa le enega pasu pri 26-28 kDa, lahko rečemo da gre za alveolarno ehinokokozo. Pri pojavu pasov pri 7 kDa in 26-28 kDa, brez dodatnih vmesnih pasov, vrste ehinokoka ne moremo določiti.



Slika 4: Pet tipičnih vzorcev, ki jih dobimo s testom *Echinococcus* Western blot IgG. Pojav pasov kot je pri P1 in P2 kaže na okužbo z *E. granulosus*, P3 na *E. multilocularis*, P4 in P5 pa na *E. granulosus* ali *E. multilocularis* (Liance in sod., 2000).

Liance in sod. so ugotovili, da test omogoča detekcijo ehinokoknih IgG protiteles v serumu pri 97 % bolnikih okuženih z ehinokokom. Test je bolj občutljiv kot ostali testi za detekcijo obeh ehinokokoz. V 76 % primerov omogoča pravilno razločevanje med cistično in alveolarno ehinokokozo. Ne omogoča pa razločevanja med aktivno in neaktivno obliko ehinokokoze. Test *Echinococcus* Western blot IgG je prvi standardizirani test razvit iz izvlečka antiga le ene vrste, *E. multilocularis*, ki omogoča, ne le diagnoze obeh

ehinokokoz, temveč v večini primerov tudi razlikovanje med cistično in alveolarno ehinokokozo. Ta test priporočajo kot potrditveni test v primeru pozitivnih presejalnih testov ali kot prvo izbiro testa, kadar so znani klinični znaki ali rezultati tehnik slikanja, ki nakazujejo na ehinokokozo. Možna je navzkrižna reaktivnost z nevrocisticerkozo in shistosomozo (Liance in sod., 2000).

2.7 IMUNSKI ODZIV IN SPREMLJANJE POTEKA ZDRAVLJENJA

Za razvoj uspešnih presejalnih testov za diagnozo okužb z ehinokokom je potrebno upoštevati interakcije parazita z gostiteljem. Prvotno bo imunski odziv na okužbo z *E. granulosus* v vmesnem gostitelju usmerjen proti vdirajočim onkosferam. Kasneje naj bi se tak odziv razvil proti sestavinam nezrelih cist in na koncu proti delom plodnih metacestod in protoskoleksov (Lightowers in Gottstein, 1995). Imunski odziv je lahko humoralen, ki vodi v nastanek parazitsko-specifičnih serumskih protiteles, ali celično posredovan. Pri slednjem pride do pomnoževanja T-celic, ki proizvajajo citokine. Tako bi bilo za razvoj vsestranskega imunološkega testa potrebno uporabiti antigenske makromolekule z vseh stopenj razvoja okužbe (Barbieri in sod., 1998; Ibrahem in sod., 1996; Ito in sod., 1999; Leggatt in sod., 1992; Leggatt in McManus, 1994; Lightowers in sod., 1984; Lightowers in Gottstein, 1995; Maddison in sod., 1989; Moro in sod., 1997; Young in sod., 1984). Khabiri in sod. so ugotovili, da med sero-pozitivnimi primeri človeške hidatidne bolezni prevladujejo protitelesa IgG1, IgG4 in IgE, usmerjena proti antigenom tekočine cist. Vidne so razlike pri podrazredih IgG protiteles med asimptomatskimi primeri in bolniki po operaciji. Pri asimptomatskih primerih pride do indukcije predvsem protiteles podrazreda IgG1, medtem ko pri operativnih primerih pa do podrazreda IgG4 in IgE, kar nakazuje na preklop med protitelesi z napredovanjem bolezni (Sambesh in sod., 1997; Short in sod., 1990). Antigen 5 prepoznavajo predvsem protitelesa IgG1 in antigen B protitelesa IgG4 in/ali IgE (Khabiri in sod., 2006).

Po drugi strani pa so Lawn in sod. pri simptomatskih bolnikih odkrili, da so najobčutljivejša protitelesa IgG1, IgG2 in celokupna protitelesa. Ker je pri simptomatskih bolnikih opazen le nizek nivo protiteles IgG3 in IgG4, tako le-te izključuje kot ustrezne serološke markerje spremeljanja uspešnosti zdravljenja.

Razlike v ugotovitvah so na račun dejstva, da so kot antigen Lawn in sod. uporabili neobdelano tekočino hidatidne ciste *E. granulosus* in ne prečiščen antigen. Ker so v hidatidni tekočini prisotni različni antigeni, naj bi le-ti povečali detekcijo podrazredov protiteles z različno antigensko specifičnostjo. Kot najustreznejši pokazatelj poteka bolezni so se v tem primeru izkazala protitelesa podrazreda IgG2 (Lawn in sod., 2004).

Rezultate kirurškega posega ali kemoterapije cistične ehinokokoze težko ovrednotimo s testi za celokupna protitelesa IgG, saj so ta prisotna še dolgo po ozdravitvi. Kvalitativne spremembe v serumu bolje odražajo analize podrazredov IgG (Craig, 1997). Tako je najprimernejša metoda WB, pri kateri v primeru ozdravitve pride do izginjanja pasov, in v nasprotnem primeru (ponoven nastop bolezni) do ohranjanja starih oz. pojava novih pasov na membrani. Kot najboljši pokazatelj poteka zdravljenja po operaciji so se izkazala protitelesa proti beljakovinama p39 in p42. Ta v primerih ozdravljenih bolnikov izginejo v manj kot letu dni, medtem ko ostanejo zaznavna dokler so prisotne ciste (Doiz in sod., 2001).

Tudi pri ocenjevanju učinkovitosti zdravljenja alveolarne ehinokokoze serološki testi nimajo velikega pomena. Vendar pa so pri deležu zdravljenih bolnikov, predvsem tistih z ozdravljenim ali regresivno obliko alveolarne ehinokokoze, po dolgem obdobju (enega ali več let po terapiji) zaznali padec ravni protiteles s testi Em2-ELISA, Em2Plus-ELISA, Western blot, Ig-isotype-ELISA ali alkalni fosfatazni-antigen-ELISA (Dreweck in sod., 1997; Gottstein in sod., 1989; Ma in sod., 1997; Sarciron in sod., 1997).

2.8 ZDRAVLJENJE

2.8.1 Zdravljenje cistične ehinokokoze

Zdravijo samo bolnike s simptomatskimi cistami oz. cistami, ki prizadenejo vitalne dele telesa. Za velike ciste, površinske ciste, kjer je velika verjetnost, da bo prišlo do predrtja, okužene ciste in ciste v vitalnih delih telesa je glavna oblika zdravljenja kirurški poseg. Če so ciste v različnih organih ali ko ni ustreznega strokovnega znanja in opreme, pa kirurški poseg ni izvedljiv (McManus in sod., 2003). Do ponovne bolezni pride v 2 % do 25 %, navadno zaradi neustrezne odstranitve ciste ali predhodno neodkritih cist (Ammann in Eckert, 1996).

Pri bolnikih, pri katerih se po operativnem posegu bolezen ponovi in bolnikih, pri katerih kirurška odstranitev ni možna, se lahko izvede metoda PAIR (angl., puncture, aspiration, injection, reaspiration). Cisto se s pomočjo ultrazvoka predre, čim več tekočine ciste se izsesa, vbrizga se protoskolicid (na primer 95 % etanol) in po 15-20 min se vsebino ciste ponovno izsesa. PAIR je najuporabnejši v primerih jetrnih cist s 5 cm ali več v premeru, ki so anehoične, multiseptirane ali multiple. Postopek se ne izvaja za površinske ali nedosegljive ciste, za poapnele, trdne ciste, ali tiste s povezavo z žolčevodom (Anonimno, 1996, cit. po McManus in sod., 2003).

Z zdravili zdravimo bolnike s primarno jetrno ehinokokozo, pri katerih operacija ni možna in tiste z več cistami v dveh ali več organih. Kemoterapija je v uporabi tudi za preprečevanje sekundarne ehinokokoze in pred operacijo oz. PAIR (Pawlowski in sod., 2001). Kot kemoterapevtika pri zdravljenju cistične ehinokokoze uporabljamо benzimidazola: albendazol in mebendazol. Albendazol (10-15 mg/kg telesne teže na dan v dveh odmerkih) povzroči izginotje 48 % cist in znatno zmanjšanje pri še 24 % primerov. Zdravljenje naj bi po navodilih proizvajalca potekalo v 14 dnevnih intervalih 3-6 mesecev, a se je neprekinjeno zdravljenje 3-6 mesecev ali več izkazalo kot bolj učinkovito in brez

hujših stranskih učinkov (Franchi in sod., 1999; Liu, 1997). Mebendazol (40-50 mg/kg telesne teže na dan v treh odmerkih) je manj učinkovit (Horton, 1997). Hkrati z benzimidazoli se lahko daje tudi prazikvantel, ki naj bi dvignil nivo albendazolnih metabolitov (sulfoksida) v plazmi za 4,5-krat, kar pa lahko poveča stopnjo stranskih učinkov (Zentel, 1999). Stranski učinki zdravljenja z benzimidazoli se kažejo v obliki neutropenije, proteinurije, šibke hepatotoksičnosti, prebavnih motenj in prehodne alopecije, možna je tudi embriotoksičnost in teratogenost (Pawlowski in sod., 2001).

2.8.2 Zdravljenje alveolarne ehinokokoze

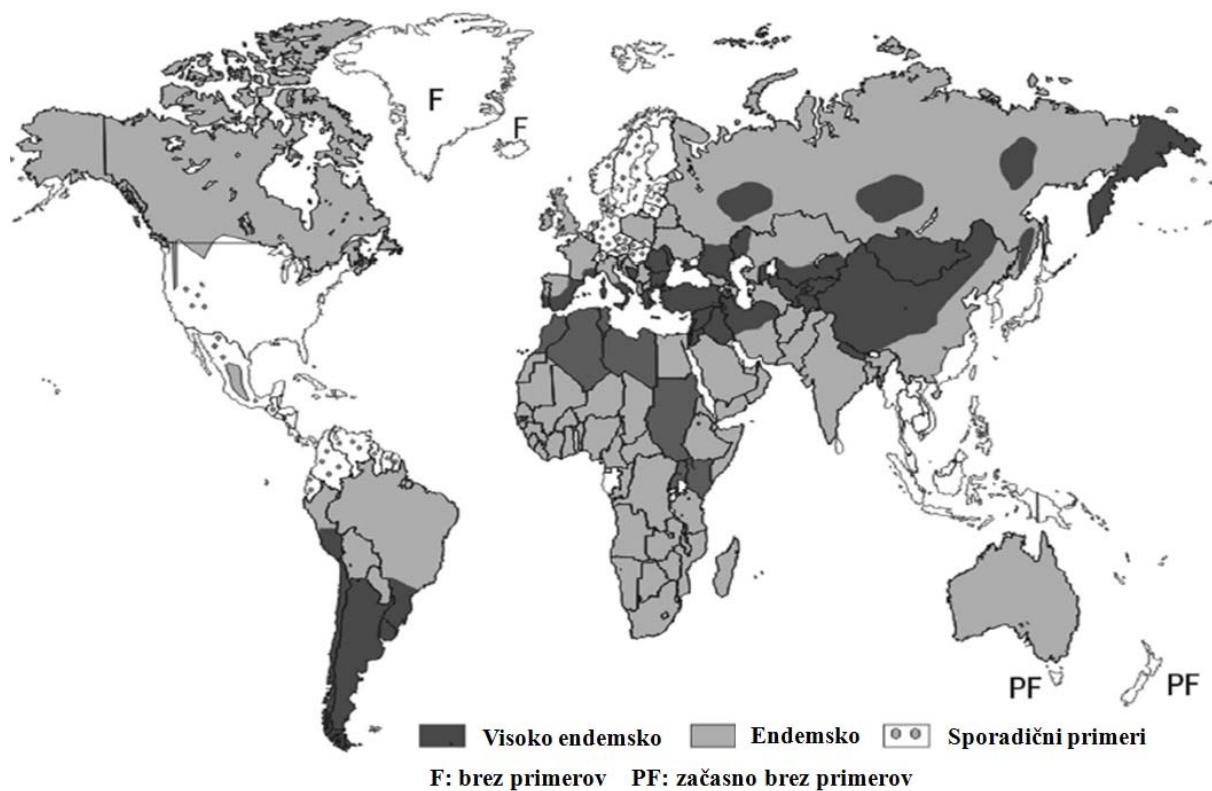
Zdravljenje alveolarne ehinokokoze temelji na radikalni kirurški odstranitvi celotne ciste iz jeter ali drugega organa. Po radikalni odstranitvi je potrebna kratkotrajna kemoterapija (vsaj 2 leti). V primeru nepopolne odstranitve ciste, ali v primeru ko operacija ni mogoča in po presaditvi jeter, je potrebno dolgotrajno zdravljenje. Uporablajo se benzimidazoli, kot pri cistični ehinokokozi. V tem primeru delujejo navadno le parazitostatsko (Pawlowski in sod., 2001). Pri alveolarni ehinokokozi je lahko potrebna presaditev jeter. Ker je za transplantacijo potrebna terapevtska imunosupresija, lahko zaradi te nato pride do rasti preostale metacestode ali prej neopažnih cist v drugih organih (posebno v možganih) (Bresson-Hadni in sod., 2000; Mboti in sod., 1996). Zgodnje odkritje bolezni izboljša možnost popolne ozdravitve (Sato in sod., 1997).

2.9 EPIDEMIOLOGIJA IN PREPREČEVANJE

Echinococcus granulosus najdemo na vseh kontinentih. Najvišja prevalenca parazita je v nekaterih delih Evroazije (na primer v Sredozemlju, Rusiji in njenih sosedah, Kitajski), Afrike (območja na severu in vzhodu), Avstralije in Južne Amerike. V nekaterih evropskih državah je stopnja letne incidence hospitaliziranih primerov humane cistične ehinokokoze med <1,0 in >8,0 na 100.000 prebivalcev. Na nekaterih otokih je *E. granulosus* izkoreninjen (Islandija, Grenlandija), ali se vsaj začasno ne pojavlja (Nova Zelandija,

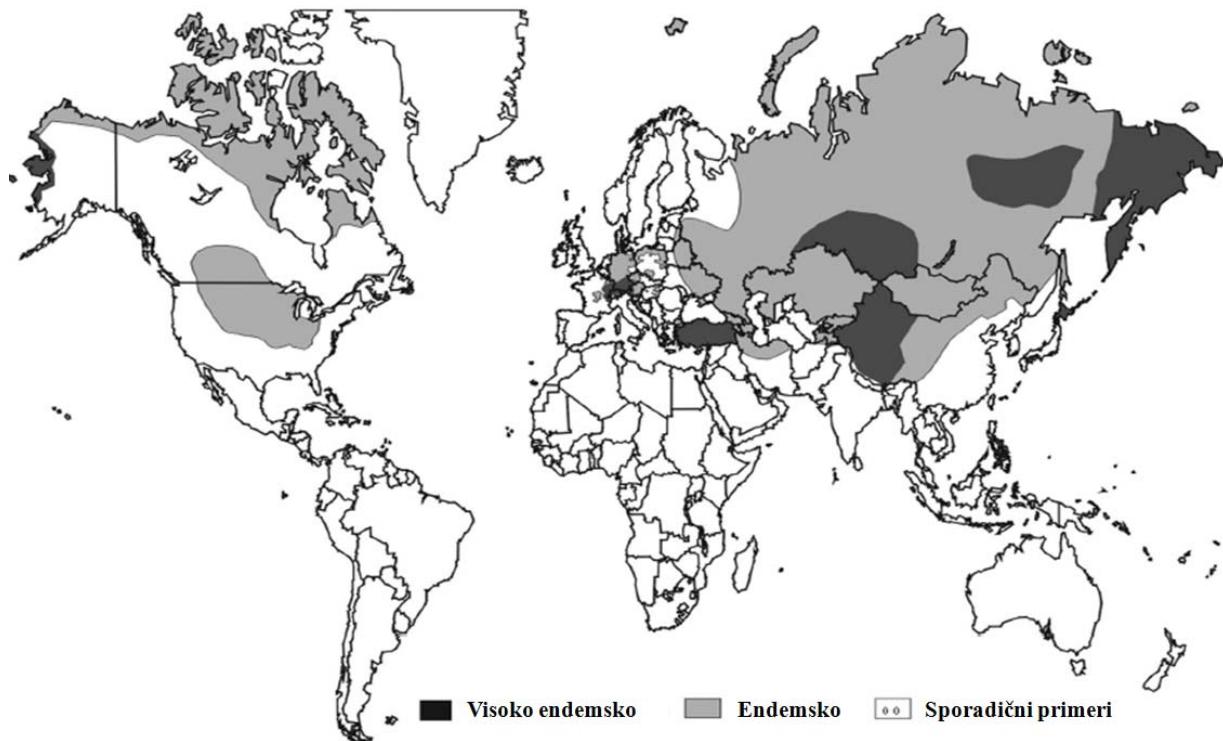
Tasmanija, severni Ciper). V preostalih delih sveta je pojavnost parazita *E. granulosus* sporadična ali ni zabeležena (slika 5).

Kot vir okužbe za ljudi po vsem svetu prevladuje življenjski krog parazita, ki vključuje udomačene pse kot končne gostitelje in ovce ter živino kot vmesne gostitelje.



Slika 5: Razširjenost *E. granulosus* v svetu, leta 2002 (Eckert in Deplazes, 2004).

Echinococcus multilocularis je razširjen na severni polobli, vključno z endemičnimi predeli osrednje Evrope, večino severne in srednje Evroazije, predeli Severne Amerike in verjetno osamljenim žariščem v severni Afriki (Tunizija) (slika 6). V državah srednje Evrope se prevalenca parazita med rdečimi lisicami giblje med <1 % in >60 %. Novejše raziskave kažejo, da je lokalna prevalenca humane alveolarne ehinokokoze v endemičnih predelih Evrope med 11 in 40 primerov na 100.000 prebivalcev.



Slika 6: Razširjenost *E. multilocularis* v svetu, leta 2002 (Eckert in Deplazes, 2004).

Echinococcus vogeli in *Echinococcus oligarthrus* sta endemična v državah Srednje in Južne Amerike. Do danes je bilo odkritih le okoli 100 primerov policistične ehinokokoze pri ljudeh, vendar predvidevajo, da celoten obseg bolezni še ni znan (Eckert in sod., 2001).

Preventivni ukrepi za kontrolo ehinokokoze vključujejo izogibanje kontakta s fecesom psov ali lisic, umivanje rok, izboljšanje sanitarnih razmer, krčenje populacije psov ali lisic, zdravljenje psov z arekolin hidrobromidom ali prazikvantelom ali uporaba vab, impregniranih z prazikvantelom, sežiganje okuženih organov živali in izobraževanje. Cenejši način za zagotovitev svetovne kontrole bi lahko predstavljalo cepljenje živine in s tem prekinitev življenskega kroga na tem nivoju, skupaj z drugimi ukrepi.

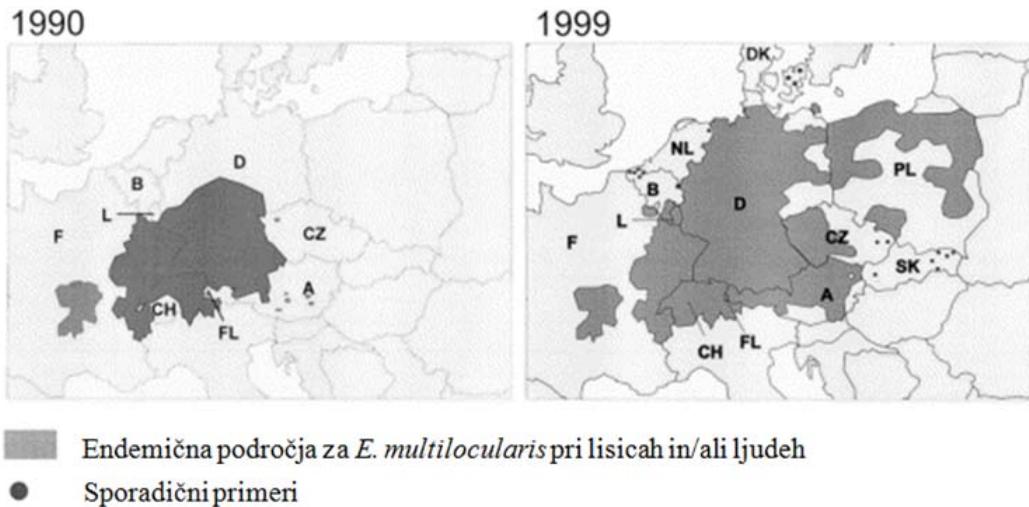
Kontrola *E. multilocularis* je posebno težavna, saj življenjski krog parazita poteka predvsem med divjimi živalmi (Eckert in sod., 2000; Gemmell in sod., 2001; Conchedda in sod., 2002).

Ehinokokoza v Sloveniji

V Sloveniji je cistična ehinokokoza razširjena predvsem v vzhodnih delih države. Prašičereja je najpogostejsa v teh delih Slovenije, in ravno prašiča je Brgez v 70-ih opisal kot epidemiološko najpomembnejšega vmesnega gostitelja cistične ehinokokoze. Med leti 1956 in 1968 so ugotovili, da je prevalenca cistične ehinokokoze v celotni slovenski populaciji 4,8 primerov na 100.000 prebivalcev (Brgez, 1970). V obdobju 2002-2006 pa le 1,7 primera na 100.000 prebivalcev. Povprečna starost bolnikov v letih 2002-2006 je bila 58,3 let. Najmlajši bolnik je bil star 24 let, najstarejši pa 86 let. Tak padec prevalence je morda zaradi manj pogostega ali kontroliranega klanja živali na kmetijah, izboljšanih splošnih in sanitarnih razmer pri rejenju živali, še posebno prašičev, boljša skrb za pitno vodo ter kontrola in antihelmintsko zdravljenje psov (Logar in sod., 2008).

Prevalenco alveolarne ehinokokoze so Logar in sod. v obdobju 2001-2005 ocenili na 0,45 primera na 100.000 prebivalcev. Povprečna starost bolnikov je bila 59,3 leta. Razširjenost alveolarne ehinokokoze je v Sloveniji podobna kot pri cistični. Bolniki so bili predvsem iz južnih in severovzhodnih predelov Slovenije. Tam so namreč kmetijske površine, naseljene z malimi glodavci, ki predstavljajo primarnega vmesnega gostitelja za prenos parazita. Nihče od bolnikov ni bil kmet ali lovec, večina pa je vsaj v preteklosti imela doma pse ali mačke, kar bi lahko predstavljalo rizičen dejavnik za okužbo (Logar in sod., 2007). Glede na zapise o alveolarni ehinokokozi pri govedu iz leta 1966 (Brgez, 1970) in miših leta 1984 (Brgez in Kryštufek, 1984) je bila verjetno alveolarna ehinokokoza že takrat v Sloveniji prisotna tudi pri ljudeh, a je bila neodkrita oz. spregledana, zaradi pomanjkanja raziskav in neustreznih seroloških testov, ki niso omogočali razlikovanja med alveolarno in cistično ehinokokozo (Logar in sod., 2007). Možno pa je tudi širjenje *E. multilocularis* iz

Avstrije, kjer so že v 80-ih odkrili ehinokoka pri lisicah (Eckert in Deplazes, 1999) (slika 7).



Slika 7: Geografska razširjenost okužbe z *E. multilocularis* v Srednji Evropi v letih 1990 in 1999 (Eckert in sod., 2000).

Ehinokokoza kot »porajajoča se« zoonoza

Alveolarna in cistična ehinokokoza sta zelo razširjeni zoonozi, ki lahko povzročata resno ali celo smrtno bolezen pri človeku in znatne ekonomske izgube v določenih endemskih predelih. Podatki z Japonske in Severne Amerike jasno kažejo na možnost širitve okužb z *E. multilocularis* iz endemičnih na ne-endemična področja. V Srednji Evropi so se od leta 1980 endemična področja značilno razširila, vendar ni znano ali na račun širjenja bolezni ali le zaradi boljše diagnostike. Znanih je nekaj dejavnikov, ki lahko vplivajo na širjenje okužb z *E. multilocularis* in povečanje tveganja okužbe za človeka. Ti dejavniki so: povečanje populacije lisic, večja prevalenca *E. multilocularis* pri lisicah, vdor lisic v mesta, pojav urbanega življenskega kroga parazita ter spremembe v načinu obdelovanja zemlje in človeškega vedenja. Še vedno ni učinkovite in poceni metode za nadzor okužb z *E. multilocularis*, zato je potreben poudarek na preprečevanju in zgodnji diagnozi alveolarne ehinokokoze pri ljudeh (Eckert in sod., 2000).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

V diplomski nalogi smo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani s serološkimi testi IHA, ELISA in Western blot med januarjem 2002 in decembrom 2006 pregledali 96 serumov bolnikov s sumom na ehinokokozo. Bolniki iz vse Slovenije so bili različnih starosti in spola.

3.2 METODE

Za ugotavljanje ehinokokoze smo uporabili encimsko imunski test-ELISA (proizvajalca NovaTec Immundiagnostica iz Nemčije), test posredne hemaglutinacije-IHA (proizvajalca Dade Behring Marburg GmbH iz Nemčije) in test Western blot-WB (proizvajalca LDBIO Diagnostics iz Francije).

3.2.1 Encimsko imunski test-ELISA

Test ELISA (*Echinococcus*, IgG-ELISA) ugotavlja prisotnost specifičnih protiteles IgG proti trakulji *Echinococcus*.

Princip testa

Vdolbinice mikrotitrsko ploščice so prevlečene z antigeni trakulje *Echinococcus*, na katere se vežejo odgovarjajoča protitelesa preiskovanega vzorca. Po spiranju nevezanega materiala dodamo konjugat, s hrenovo peroksidazo označenih anti-humanih IgG protiteles. Le-ta se vežejo na *Echinococcus*-specifična protitelesa, vezana na mikrotitrski ploščici. Imunski kompleks (antigen-protitelo-konjugat) postane viden (modro obarvan) po dodatku substrata (tetrametilbenzidin, TMB). Intenziteta barve je premo-sorazmerna količini specifičnih IgG protiteles v vzorcu. Reakcijo ustavimo z dodatkom žveplene kislina, ki da rumeno obarvan končni produkt. Z čitalcem izmerimo absorbanco pri 450 nm.

Potrebujemo:

- mikrotitrsko stripe, katerih vdolbinice so prekrite z ehinokokoznim antigenom
- pufer za redčenje serumov ($\text{pH}=7,2\pm0,2$)
- raztopino za ustavitev reakcije (žveplena kislina; 0,2 mol/l)
- spiralno raztopino ($\text{pH}=7,2\pm0,2$)
- ehinokokozni anti-IgG konjugat (s hrenovo peroksidazo označena zajčja protitelesa proti humanim IgG)
- raztopino substrata TMB (tetrametilbenzidin)
- pozitivno kontrolo IgG
- »cut-off« kontrolo IgG
- negativno kontrolo IgG
- spektrofotometer za merjenje absorbance pri 450/620 nm
- inkubator pri 37°C
- puhalko
- pipete z nastavki
- mešalnik (vortex)
- destilirano vodo
- epruvete

- folijo
- štoparico
- rokavice

Priprava reagentov

Pred pričetkom dela mora biti temperatura vseh reagentov, kontrol in vzorcev enaka sobni temperaturi. Spiralno raztopino redčimo z destilirano vodo v razmerju 1:19.

Priprava vzorcev

Protitelesa določamo v serumu bolnika. Pred pričetkom testa 10 µl bolnikovega seruma razredčimo z 1 ml pufra za redčenje. Pozitivne in negativne kontrole ne redčimo.

Postopek izvedbe testa

V vdolbinice mikrotitrskih stripov odpipetiramo po 100 µl:

- »substrat-blank« v vdolbinico A1
- negativne kontrole v vdolbinico B1
- »cut-off« kontrol v vdolbinici C1 in D1
- pozitivne kontrole v vdolbinico E1
- redčine vzorcev v ostale vdolbinice.

Vdolbinice pokrijemo s folijo in inkubiramo 1 uro pri 37 °C. Po končani inkubaciji odstranimo folijo, odlijemo vsebino vdolbinic in speremo vdolbinice trikrat s po 300 µl spiralne raztopine. Po končanem spiranju previdno odstranimo preostalo tekočino s tem, ko nekajkrat udarimo s stripi po papirnati brisači. Spiranje je kritičen korak, saj slabo spiranje lahko vodi do lažno pozitivnih rezultatov.

V vsako vdolbinico, razen v A1 (»substrat-blank«), dodamo 100 µl ehinokokoznega anti-IgG konjugata. Stripe pokrijemo s folijo in inkubiramo pri sobni temperaturi 30 minut. Ponovimo spiranje in nato dodamo 100 µl TMB substrata. Inkubiramo v temi, pri sobni temperaturi, natanko 15 minut. V vse vdolbinice dodamo 100 µl raztopine za ustavitev reakcije v enakem vrstnem redu kot smo dodajali substrat (modroobarvana raztopina se tako spremeni v rumeno).

S spektrofotometrom izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 450/620 nm v roku 30 minut po dodatku zadnje raztopine.

Za zagotovitev uspešnosti testa morajo biti izpolnjeni naslednji kriteriji:

- »substrat-blank« v vdolbinici A1: absorbanca nižja od 0,100
- negativna kontrola v vdolbinici B1: absorbanca nižja od 0,200
- »cut-off« kontroli v vdolbinici C1 in D1: absorbanca med 0,250 in 0,900
- pozitivna kontrola v vdolbinici E1: absorbanca enaka ali višja od absorbance »cut-off« kontrole

Absorbanca »cut-off« kontrole je povprečna vrednost izmerjenih absorbanc obeh »cut-off« kontrol.

Interpretacija rezultatov

Vzorec je pozitiven, če je njegova izmerjena absorbanca višja od 110 % povprečne vrednosti absorbance »cut-off« kontrol.

Vzorec, katerega absorbanca je v območju med 90 % in 110 % vrednosti absorbance (10 % nad in 10 % pod absorbanco) »cut-off« kontrol, ni ovrednoten kot pozitiven ali negativen, temveč se nahaja v območju t.i. sive cone. V tem primeru je priporočljiv ponoven odvzem

vzorca po 2-4 tednih. Če je rezultat testa znova v sivi coni, tak vzorec opredelimo kot negativnega.

Vzorec je negativen, če je njihova izmerjena absorbanca pod 90 % vrednosti absorbance »cut-off« kontrol.

3.2.2 Test posredne hemaglutinacije-IHA

Test IHA (Cellognost-Echinococcosis) dokazuje specifična protitelesa proti trkulji *Echinococcus granulosus*.

Princip testa

Test zaznava specifična protitelesa proti trkulji *Echinococcus granulosus*. Temelji na principu posredne eritrocitne aglutinacije. Humani eritrociti, senzibilizirani z antigenom trkulje *Echinococcus granulosus*, aglutinirajo v prisotnosti protiteles proti *Echinococcus granulosus* v preiskovanem vzorcu seruma. Opazujemo le razredčine serumov od 1:32 do 1:64 in več. Titri srednjega razpona ležijo med 1:512 in 1:2048. Nizko pozitivni titri serumov (1:32 do 1:128) so pozitivni samo, če tudi drugi testi pokažejo pozitivno vrednost.

Potrebujemo:

- ehinokokozni IHA reagent
- pozitivno kontrolo
- negativno kontrolo
- raztopino Tris pufra (pH=8,0)

- destilirano vodo
- pipete z nastavki
- mikrotitrsko ploščo
- stresalnik za mikrotitrsko ploščo
- ogledalo za odčitavanje rezultatov testa
- rokavice

Priprava reagentov

Pred pričetkom dela mora biti temperatura vseh reagentov, kontrol in vzorcev od +15 do +25 °C. Ehinokokozni IHA reagent raztopimo v 2,5 ml destilirane vode, ter pozitivno kontrolo (pozitivni ehinokokozni kontrolni serum) v 0,5 ml destilirane vode.

Postopek izvedbe testa

V prve vdolbinice mikrotitrsko plošče (A1 do H1) odpipetiramo 175 µl raztopine Tris pufra. V ostale vdolbinice, razen v A12, odpipetiramo 50 µl Tris pufra. Dodamo 25 µl pozitivne kontrole v vdolbinico A1 in dobro premešamo. V vdolbinico A12 dodamo 50 µl negativne kontrole (predhodno zredčene z raztopino Tris pufra v razmerju 1:15). Odpipetiramo po 25 µl preiskovanih serumov v vdolbinice B1 do H1 in ob tem dobro premešamo s pufrom. Nato prenesemo 50 µl mešanice iz vdolbinice 1 (A1 do H1) v vdolbinico 2, premešamo in nadaljujemo z redčenjem do vdolbinice 11. 50 µl razredčine iz zadnje vdolbinice zavrzemo. V vdolbinice 2-12 odpipetiramo po 25 µl ehinokokoznega IHA reagenta, ki ga pred uporabo dobro pretresemo. Tako dobimo začetno razredčino 1:16. Mikrotitrsko ploščo stresamo na stresalniku za 15 do 20 sekund (900 do 1100 obratov/min). Ploščo pokrijemo in inkubiramo pri sobni temperaturi. Rezultate odčitamo po 2 urah, do najkasneje 24 urah.

Da je test uspel, mora veljati naslednje:

- pri pozitivni kontroli dobimo titer kot je zapisan na oznaki ± 1
- negativna kontrola reagira negativno (eritrociti tvorijo ostro definiran gumb)

Interpretacija rezultatov

Rezultate odčitamo v 2-24 urah. Pomagamo si s primerjavo s kontrolami, ki jih testiramo vzporedno.

Popolna aglutinacija celic v vdolbinici pomeni pozitiven rezultat. Aglutinacijo, ki je razporejena enakomerno preko dna vdolbinice, z rahlo sedimentacijo, smatramo kot šibko pozitiven rezultat. Sedimentirane celice (tvorba eritrocitnega gumba) pomenijo negativen rezultat testa. Končni titer seruma je tista redčina, pri kateri se tvori 50 % eritrocitnega gumba, če jo primerjamo s popolno aglutinacijo (100 %).

3.2.3 Test Western blot-WB

Test Western blot (*Echinococcus*, WB) se uporablja za ugotavljanje protiteles IgG proti trakulji *Echinococcus*.

Princip metode

Antigeni larvalnega ekstrakta trakulje *Echinococcus multilocularis* so bili preko elektroforeze ločeni v pasove in nanešeni z elektro blottingom na nitrocelulozno

membrano. Ta je bila nato narezana na trakove. Vsak preiskovani serum je posamično inkubiran z membranskim trakom. Za ehinokoka specifična protitelesa IgG, če so le-ta prisotna v vzorcu, se vežejo na antigene na membrani. S prvim spiranjem odstranimo vse nevezane komponente seruma. Trakove nato inkubiramo s konjugatom alkalne fosfataze in anti-humanih protiteles IgG. Po ponovnem spiranju lahko celoten imunski kompleks (antigen-protitelo-konjugat) zaznamo po dodatku substrata (NBT/BCIP) kot temno modrovijoličen precipitat. Razvoj barve ustavimo s spiranjem trakov z destilirano vodo. Če so v serumu prisotna specifična protitelesa IgG, se na trakovih kažejo kot vijolično obarvani pasovi.

Pojav 7 in/ali 26-28 kDa velikega pasu na membrani kaže na prisotnost *Echinococcus*-specifičnih protiteles IgG v preiskovanem serumu. Specifični vmesni pasovi (med 7 in 26-28 kDa) nam omogočajo še nadaljnjo razlikovanje med *E. granulosus* in *E. multilocularis* okužbami pri več kot 2/3 primerov.

Za izvedbo testa potrebujemo:

- trakove nitrocelulozne membrane z nanešenimi antigeni ličinke *E. multilocularis*
- pufer za redčenje vzorcev
- raztopino za spiranje
- konjugat anti-IgG (konjugat kozjih anti-humanih protiteles IgG in alkalne fosfataze)
- pozitivno kontrolo
- substrat (NBT/BCIP)
- trak z nanešenimi standardi znanih molekulskih mas za pomoč pri ocenjevanju molekulskih mas dobljenih pasov vzorcev
- rokavice
- plastično pinceto

- banjico z več kanali
- stresalnik
- plastične puhalke
- skalpel
- ravnilo
- staničevino
- aluminijasto folijo
- destilirano vodo
- pipete z nastavki
- štoparico

Priprava reagentov

Raztopino za spiranje razredčimo z destilirano vodo v razmerju 1:10.

Izvedba testa

V kanale v banjici odpipetiramo po 1,2 ml pufra za redčenje vzorcev. Z rokavicami s pomočjo ravnila s skalpelom izrežemo ustrezno število trakov iz nitrocelulozne membrane. Le-te nato s pinceto položimo v kanale v banjici. Banjico nežno pretresemo, tako da so trakovi popolnoma prekriti s pufrom. Tako jih inkubiramo 5 do 10 minut, da se dobro navlažijo. V ustrezne kanale v banjici odpipetiramo po 50 µl vzorcev in pozitivne kontrole. Rahlo pretresemo banjico in inkubiramo na stresalniku (10 obratov/min) 90 min ± 5 min pri temperaturi 18-25 °C.

Sledi spiranje:

- s plastično puhalko posrkamo vso tekočino iz kanalov

- dodamo po 2 ml zredčene tekočine za spiranje, pretresemo banjico in posrkamo vso tekočino iz kanalov
- znova dodamo po 2 ml raztopine za spiranje v vsak kanal, inkubiramo na stresalniku 3-5 minut, ter ponovno posrkamo vso tekočino iz kanalov
- še enkrat ponovimo zadnji korak spiranja

V vsak kanal nato odpipetiramo po 1,2 ml konjugata anti-IgG. Banjico rahlo pretresemo, tako da so trakovi popolnoma prekriti s konjugatom in inkubiramo na stresalniku 60 min ± 5 min pri sobni temperaturi. Ponovimo spiranje, kot je že opisano zgoraj. Kvaliteta spiranja je ključnega pomena za pridobitev jasno vidnih pasov v kontrastu z ozadjem. Dodamo 1,2 ml substrata NBT/BCIP, rahlo premešamo banjico in inkubiramo na stresalniku pri sobni temperaturi. Banjico pokrijemo z aluminijasto folijo in vsake 5 minut spremljamo razvoj barve. Običajno do razvoja barve pride v 20-60 minutah, vendar za ta čas ni jasno določenih pravil. Inkubiramo, dokler se ne razvijejo jasno vidni pasovi v kontrastu z roza-sivo barvo trakov. Količina protiteles v serumu je lahko tako majhna, da je za razvoj vidnih pasov potrebno celo 90 minut. Razvoj barve ustavimo s posrkanjem tekočine iz kanalov in dodatkom 2 ml destilirane vode. To še enkrat ponovimo. Trakove nato s pinceto prenesemo na filter papir in pustimo da se na zraku posušijo (~15 min).

Interpretacija rezultatov

Molekulske mase dobljenih pasov lahko ocenimo s primerjavo s trakom z nanešenimi standardnimi molekulskimi masami, ki je priložen diagnostičnemu kompletu. Pasovi, ki jih dobimo pri pozitivni kontroli pa so najbolj natančen pozitivni standard kita. Ta nam da natančen model za končno identifikacijo posameznih pasov.

Serodiagnoza rodu *Echinococcus*

Za potrditev okužbe s trakuljo iz rodu *Echinococcus* iščemo pasove v višini 7 in 26-28 kDa. Pas 26-28 kDa se na membrani lahko pokaže kot en ozek pas v višini 26 ali 28 kDa, kot dva ozka pasova v isti višini, ali pa kot en širok pas med 26 in 28 kDa. Pojav pasu na

višini 7 in/ali 26-28 kDa nakazuje na prisotnost *Echinococcus*-specifičnih protiteles IgG v preiskovanem serumu.

Ločevanje med vrstama *E. granulosus* in *E. multilocularis*

To nam omogočajo nastali pasovi med višinama 7 in 28 kDa. Možen je pojav naslednjih pasov:

- pasovi skupni obema vrstama: 7, 12, 15, 24, 26-28 kDa
- ozki pasovi, značilni le za vrsto *E. multilocularis*: 16, 17, 18, 20 kDa
- pas, značilen le za *E. granulosus*: zelo širok pas med 16 in 18 kDa.

Pet značilnih vzorcev:

- le en pas pri višini 7 kDa → *E. granulosus*
- pas pri višini 7 kDa + širok megljen pas med 16 in 18 kDa (običajno je prisoten tudi pas pri 26-28 kDa) → *E. granulosus*
- pas pri 26-28 kDa + ozka pasova pri 16 in/ali 18 kDa (večina ostalih pasov je lahko tudi prisotna: 7, 12, 15, 17, 20 kDa) → *E. multilocularis*
- le en pas v višini 26-28 kDa → *E. granulosus* ali *E. multilocularis*
- samo pasova 7 kDa + 26-28 kDa → *E. granulosus* ali *E. multilocularis*

Sam pojav vmesnih pasov (12, 15, 16, 17, 18, 20, 24 kDa) ni specifičen in ne zadošča za diagnostiko okužbe z ehinokokom, za to mora biti vedno prisoten vsaj eden od pasov 7 in 26-28 kDa. Na trakovih lahko zasledimo tudi pasove z večjo molekulsko maso (redkeje z manjšo). Nekateri med njimi so specifični za okužbo z ehinokokom, drugi ne. Ker je razločevanje teh zahtevno, jih ne upoštevamo pri interpretaciji tega testa.

Lažno pozitivni rezultati tega testa so možni v primeru, če ima bolnik cisticerkozo, shistosomozo ali avtoimunske bolezni.

4 REZULTATI

Med 1. januarjem 2002 in 31. decembrom 2006 smo 96 serumov bolnikov s sumom na ehinokokozo pregledali s tremi serološkimi testi; indirektno hemaglutinacijo (IHA), encimsko imunskim testom (ELISA) in testom Western blot (WB).

Vse serume bolnikov smo najprej pregledali s testoma IHA in ELISA. Ko je eden od testov pokazal nejasen, mejen ali pozitiven rezultat, smo vzorce testirali še s testom WB. S primerjavo rezultatov teh testov smo skušali ovrednotiti njihovo zanesljivost, ter ugotoviti, če test WB res lahko služi kot zanesljiv potrditveni test za dokaz ehinokokoze.

Test ELISA

Rezultate testa ELISA smo ovrednotili glede na navodila proizvajalca. Torej, vzorec smo smatrali kot pozitivnega, če je bila njegova izmerjena absorbanca višja od 110 % povprečne vrednosti absorbance »cut-off« kontrol, negativnega pa, če je bila izmerjena absorbanca pod 90 % vrednosti absorbance »cut-off« kontrol. Vzorec, katerega absorbanca je bila v območju med 90 % in 110 % vrednosti absorbance »cut-off« kontrol, nismo ovrednotili kot pozitivnega ali negativnega, temveč kot nejasnega oz. mejnega.

Test IHA

Pri testu IHA smo kot pozitivne rezultate testa smatrali dobljene aglutinacije pri titrih višjih od redčine 1:128. Pozitivne redčine do vključno 1:128 smo obravnavali kot nejasne oz. mejne vrednosti.

Test Western blot

Kot pozitiven rezultat testa na ehinokokozo smo smatrali tiste serume, pri katerih so se pokazali specifični pasovi na nitrocelulozni membrani (pasovi v višini 7 in/ali 26-28 kDa).

Preglednica 1 prikazuje pozitivne (+), negativne (-) in nejasne (+/-) rezultate testov WB, IHA in ELISA, ter možne kombinacije rezultatov vseh treh testov.

Preglednica 1: 96 serumov testiranih na ehinokokozo med 1. januarjem 2002 in 31. decembrom 2006 s tremi testi (WB, IHA, ELISA), število pozitivnih (+), negativnih (-) in nejasnih rezultatov (+/-), ter vse možne kombinacije rezultatov.

| WB | IHA | ELISA | Št. vzorcev |
|-----------|------------|--------------|--------------------|
| + | + | + | 18 |
| + | + | +/- | 3 |
| + | + | - | 8 |
| + | +/- | + | 5 |
| + | - | + | 0 |
| + | +/- | +/- | 1 |
| + | +/- | - | 5 |
| + | - | +/- | 0 |
| + | - | - | 0 |
| - | - | +/- | 6 |
| - | - | + | 1 |
| - | +/- | - | 33 |
| - | +/- | + | 2 |
| - | + | - | 8 |

| | | | |
|---|-----|-----|---|
| - | + | + | 3 |
| - | +/- | +/- | 3 |
| - | + | +/- | 0 |
| - | - | - | 0 |

Od 96 serumov je test IHA pri 40 serumih pokazal pozitiven rezultat, 7 serumov je bilo negativnih in 49 z nejasnimi oz. mejnimi vrednostmi. Od 96 serumov je test ELISA pri 29 serumih pokazal pozitiven rezultat, 54 serumov je bilo negativnih in 13 nejasnih oz. mejnih (preglednica 2).

Preglednica 2: Število in delež (%) pozitivnih, negativnih in mejnih rezultatov dobljenih s testom IHA, ELISA in WB za ugotavljanje ehinokokoze med 1. januarjem 2002 in 31. decembrom 2006.

| | Pozitivni (%) | Negativni (%) | Mejni (%) | Skupaj |
|--------------|---------------|---------------|-----------|--------|
| IHA | 40 (42) | 7 (7) | 49 (51) | 96 |
| ELISA | 29 (30) | 54 (56) | 13 (14) | 96 |
| WB | 40 (42) | 56 (58) | / | 96 |

Ko smo IHA pozitivne serume ponovno testirali s testom WB, je od teh 40 vzorcev ponovno pokazalo pozitivno vrednost 29, 11 pa jih je test WB opredelil kot negativne serume. Izmed 29 ELISA pozitivnih serumov je test WB pokazal 23 pozitivnih in 6 negativnih serumov (preglednica 3).

Preglednica 3: Število in delež (%) pozitivnih in negativnih rezultatov testa WB pri serumih, ki so pokazali pozitivne rezultate pri testiranju s testom IHA oz. ELISA za ugotavljanje ehinokokoze.

| | Pozitivni WB (%) | Negativni WB (%) | Skupaj |
|------------------------|------------------|------------------|--------|
| Pozitivni IHA | 29 (73) | 11 (27) | 40 |
| Pozitivni ELISA | 23 (79) | 6 (21) | 29 |

Po testiranju negativnih serumov testa IHA s testom WB je od sedmih vzorcev ponovno pokazalo negativni rezultat vseh sedem serumov. Štiriinpetdeset ELISA negativnih serumov smo nato s testom WB opredelili kot 13 pozitivnih serumov in ostalih 41 kot negativne vrednosti (preglednica 4).

Preglednica 4: Število in delež (%) pozitivnih in negativnih rezultatov testa WB pri serumih, ki so pokazali negativne rezultate pri testiranju s testom IHA oz. ELISA za ugotavljanje ehinokokoze.

| | Pozitivni WB (%) | Negativni WB (%) | Skupaj |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------|
| Negativni IHA | 0 (0) | 7 (100) | 7 |
| Negativni ELISA | 13 (24) | 41 (76) | 54 |

Od 49 IHA nejasnih oz. mejnih serumov je 11 serumov test WB ovrednotil kot pozitivne serume, 38 vzorcev pa je pokazalo negativen rezultat. Pri testu ELISA pa je od nejasnih oz. mejnih 13 serumov test WB potrdil 4 serume kot pozitivne in 9 kot negativne serume (preglednica 5).

Preglednica 5: Število in delež (%) pozitivnih in negativnih rezultatov testa WB pri serumih, ki so pokazali mejne oz. nejasne rezultate pri testiranju s testom IHA oz. ELISA za ugotavljanje ehinokokoze.

| | Pozitivni WB (%) | Negativni WB (%) | Skupaj |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|---------------|
| Mejni IHA | 11 (22) | 38 (78) | 49 |
| Mejni ELISA | 4 (31) | 9 (69) | 13 |

V preglednici 6 lahko vidimo, da ob primerjavi testov IHA in WB dobimo 40 serumov pozitivnih z obema metodama in 7 negativnih z obema testoma. Rezultati za 49 serumov se med testoma razlikujejo. Če primerjamo test ELISA in WB, pa je 27 serumov pozitivnih in 41 negativnih z obema testoma, za 28 serumov pa se rezultati med testoma razlikujejo.

Preglednica 6: Število in delež (%) pozitivnih in negativnih rezultatov serumov testiranih na ehinokokozo s testom ELISA in WB, ter testom IHA in WB; mejne oz. nejasne vrednosti testa IHA in ELISA smo šteli za pozitivne in jih prišteli k pozitivnim serumom.

| | Pozitivni (%) | Negativni (%) | Različni (%) |
|--------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| IHA in WB | 40 (42) | 7 (7) | 49 (51) |
| ELISA in WB | 27 (28) | 41 (43) | 28 (29) |

V preglednici 7 vidimo kaj predstavljajo te različni rezultati testov. Tako je vseh 49 različnih rezultatov serumov med testoma WB in IHA na račun IHA pozitivnih serumov, ki jih je test WB nato opredelil kot negativne serume. Od 28 različnih serumov med testoma ELISA in WB jih je 15 zaradi ELISA pozitivnih in WB negativnih serumov. Trinajst izmed 28 različnih serumov med testoma ELISA in WB jih je pri testu ELISA negativnih in testu WB pozitivnih.

Preglednica 7: Število in delež (%) rezultatov serumov testiranih na ehinokokozo, ki so pokazali različne rezultate testa IHA in ELISA v primerjavi s testom WB; mejne oz. nejasne vrednosti testa IHA in ELISA smo šteli za pozitivne in jih prišteli k pozitivnim serumom.

| | Pozitivni WB (%) | Negativni WB (%) | Skupaj |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------|
| IHA pozitivni | - | 49 (100) | 49 |
| IHA negativni | 0 (0) | - | |
| ELISA pozitivni | - | 15 (54) | 28 |

ELISA negativni

13 (46)

-

Zanesljivost testov smo statistično ovrednotili s testom χ^2 . Mejna vrednost testa za določitev statistično značilne razlike je v našem primeru $\chi_a^2=3,841$ ($SP=1$; $\alpha=0,05$).

Razlika je statistično značilna, kadar velja:

$$\chi^2 > \chi_a^2 (SP=k-I)$$

Statistično značilno razliko za naš primer vzorcev dobimo, ko za izračun testa χ^2 velja:

$$\chi^2 > 3,841$$

Ko smo mejne oz. nejasne vrednosti testov IHA in ELISA šteli kot pozitivne in jih prišteli k pozitivnim serumom (preglednica 8), smo s testom χ^2 rezultate statistično ovrednotili in ugotovili, da se testa WB in IHA razlikujeta s statistično značilno razliko ($\chi^2=56,7$; $P<0,0001$). Med testoma WB in ELISA pa razlika ni statistično značilna ($\chi^2=0,09$; $P=0,7705$).

Preglednica 8: Število in delež (%) serumov testiranih na ehinokokozo, ki so pokazali pozitiven ali negativen rezultat s testi WB, IHA in ELISA; mejne oz. nejasne vrednosti testa IHA in ELISA smo šteli za pozitivne vrednosti.

| | Pozitivni (%) | Negativni (%) | Skupaj |
|------------|----------------------|----------------------|---------------|
| WB | 40 (42) | 56 (58) | 96 |
| IHA | 89 (93) | 7 (7) | 96 |

| | | | |
|--------------|---------|---------|----|
| ELISA | 42 (44) | 54 (56) | 96 |
|--------------|---------|---------|----|

Ko smo mejne oz. nejasne vrednosti testov IHA in ELISA šteli kot negativne in jih prišteli k negativnim serumom (preglednica 9), smo ugotovili, da tako med testoma WB in IHA tokrat ni statistično značilne razlike ($\chi^2=0$; $P=1$). Prav tako pri testu WB in ELISA razlika ni statistično značilna ($\chi^2=2,73$; $P=0,0981$).

Preglednica 9: Število in delež (%) serumov testiranih na ehinokokozo, ki so pokazali pozitiven ali negativen rezultat s testi WB, IHA in ELISA; mejne oz. nejasne vrednosti testa IHA in ELISA smo šteli za negativne vrednosti.

| | Pozitivni (%) | Negativni (%) | Skupaj |
|--------------|----------------------|----------------------|---------------|
| WB | 40 (42) | 56 (58) | 96 |
| IHA | 40 (42) | 56 (58) | 96 |
| ELISA | 29 (30) | 67 (70) | 96 |

Ko smo mejne oz. nejasne vrednosti testa IHA in ELISA šteli kot pozitivne ali negativne, glede na rezultate testa WB (preglednica 10), vidimo, da razlika med testoma WB in IHA ni statistično značilna ($\chi^2=2,53$; $P=0,1119$), in tudi testa WB in ELISA se tokrat statistično ne razlikujeta ($\chi^2=1,0830$; $P=0,2980$).

Preglednica 10: Število in delež (%) serumov testiranih na ehinokokozo, ki so pokazali pozitiven ali negativen rezultat s testi WB, IHA in ELISA; mejne oz. nejasne vrednosti testa IHA in ELISA smo prišteli k negativnim oz. pozitivnim, glede na rezultat s testom WB.

| | Pozitivni (%) | Negativni (%) | Skupaj |
|--|----------------------|----------------------|---------------|
|--|----------------------|----------------------|---------------|

| | | | |
|--------------|---------|---------|----|
| WB | 40 (42) | 56 (58) | 96 |
| IHA | 51 (53) | 45 (47) | 96 |
| ELISA | 33 (34) | 63 (66) | 96 |

Preračunane občutljivosti in specifičnosti testov IHA in ELISA smo zbrali v preglednici 11.

Preglednica 11: Občutljivost, specifičnost testa IHA, ELISA in WB za ugotavljanje ehinokokoze.

| | IHA | ELISA | WB | |
|-------------------------|-------------------|-------------------|-----------------|----------------------|
| | | | naši podatki | Liance in sod., 2000 |
| Občutljivost (%) | 100 ¹ | 63,9 ¹ | 93 ¹ | |
| | 100 ² | 67,5 ² | 83 ² | 97,3 |
| | 78,4 ³ | 63,0 ³ | | |
| Specifičnost (%) | 38,9 ¹ | 87,2 ¹ | | |
| | 12,5 ² | 73,2 ² | 92 ⁴ | 93 |
| | 80,4 ³ | 89,3 ³ | | |

¹ mejne oz. nejasne vrednosti testa IHA in ELISA niso upoštevane

² mejne oz. nejasne vrednosti testa IHA in ELISA štete kot pozitivne in prištete k pozitivnim rezultatom

³ mejne oz. nejasne vrednosti testa IHA in ELISA štete kot negativne in prištete k negativnim rezultatom

⁴ za preračunanje specifičnosti testa WB so kot lažno pozitivni serumi upoštevani serumi, ki so bili s testom ELISA negativni in so s testom IHA pokazali mejno vrednost

Opomba: Občutljivost in specifičnost testa IHA ter ELISA smo preračunali glede na vrednosti testa WB, občutljivost in specifičnost testa WB pa glede na kombinacijo vrednosti testa IHA in ELISA. V preglednici je podana še občutljivost in specifičnost testa WB raziskave Liance in sod., 2000.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Ehinokokoza je zootroza, ki jo povzroča pasja trakulja *Echinococcus granulosus* ali trakulja lisice *Echinococcus multilocularis*. Za dokaz okužbe, ki jo povzročata ti dve trakulji, so na voljo različni serološki testi. Ker je kvaliteta oz. zanesljivost teh testov zelo različna, smo se odločili, da serume bolnikov s sumom na ehinokokozo pregledamo s testom posredne hemaglutinacije (IHA) in encimsko imunskim (ELISA) testom, ter oba testa nato ovrednotimo s testom Western blot (WB). S primerjavo rezultatov testov smo poskušali ovrednotiti zanesljivost testov, ter ugotoviti, če test Western blot res lahko služi kot zanesljiv potrditveni test za dokaz te bolezni.

IHA in WB

Od 96 serumov je test IHA pri 40 serumih pokazal pozitiven rezultat, 7 serumov je bilo negativnih in 49 z nejasnimi oz. mejnimi vrednostmi.

Od 40 pozitivnih serumov jih je test WB pokazal 29 (73 %) kot pozitivne serume in 11 (27 %) kot negativne serume.

Sedem negativnih serumov testa IHA je po testiranju z metodo WB prav tako pokazalo negativen rezultat.

Po testiranju nejasnih oz. mejnih serumov s testom WB je od 49 nejasnih oz. mejnih vzorcev, 11 (22 %) serumov pokazalo pozitiven rezultat, 38 (78 %) vzorcev pa negativen rezultat.

Ko smo pri testu IHA upoštevali le pozitivne in negativne rezultate in ne nejasnih oz. mejnih rezultatov, lahko ob primerjavi s testom WB ugotovimo, da je test IHA specifičen v 38,9 % primerov (pokazal je 11 lažno pozitivnih serumov). Če k tem pozitivnim serumom testa IHA prištejemo še mejne vrednosti testa IHA, ob primerjavi s testom WB ugotovimo le 12,5 % specifičnost testa IHA (49 lažno pozitivnih, nejasnih oz. mejnih serumov, ki jih je nato WB ovrednotil kot negativne serume).

Vseh 7 negativnih rezultatov testa IHA je tudi test WB ovrednotil kot negativne serume. Torej je bil test IHA 100 % občutljiv, saj ni zgrešil niti enega pozitivnega seruma. Vendar je treba upoštevati dejstvo, da takšen nabor vzorcev ne omogoča točne določitve občutljivosti testa IHA, saj smo s testom WB pregledali le prvotno pozitivne, nejasne oz. mejne vrednosti testa IHA. Za pravilno določitev občutljivosti testa IHA bi bilo potrebno izbrati negativne serume z metodo IHA in le-te ponovno testirati še s testom WB.

Zanesljivost testov smo statistično ovrednotili s testom χ^2 :

- Ko smo mejne oz. nejasne vrednosti testa IHA šteli za pozitivne vrednosti, smo ugotovili, da se testa WB in IHA statistično razlikujeta ($\chi^2=56,7$; $P<0,0001$). P vrednost je zelo majhna, kar pomeni, da se rezultati testa WB in IHA razlikujejo zaradi resnične razlike med njima in ne zaradi naključja.
- Če smo mejne oz. nejasne vrednosti testa IHA šteli za negativne vrednosti, smo nato s testom χ^2 ugotovili, da tako med testoma WB in IHA tokrat ni statistično značilne razlike ($\chi^2=0$; $P=1$).
- Ko smo mejne oz. nejasne vrednosti testa IHA prišteli k negativnim oz. pozitivnim vrednostim, glede na rezultat s testom WB, smo s testom χ^2 ugotovili, da razlika med testoma WB in IHA ponovno ni statistično značilna ($\chi^2=2,53$; $P=0,1119$).

ELISA in WB

Od 96 serumov je test ELISA pri 29 serumih pokazal pozitiven rezultat, 54 serumov je bilo negativnih in 13 nejasnih oz. mejnih.

Od 29 ELISA pozitivnih serumov jih je test WB 23 (79 %) pokazal kot pozitivne serume in 6 (21 %) kot negativne serume.

Od 54 ELISA negativnih serumov je test WB pokazal 13 (24 %) kot pozitivne serume in 41 (76 %) kot negativne serume.

Od 13 nejasnih oz. mejnih vrednosti serumov je test WB potrdil 4 (31 %) serume kot pozitivne serume in 9 (69 %) kot negativne serume.

Če upoštevamo le pozitivne in negativne rezultate testa ELISA in ne nejasnih oz. mejnih rezultatov, lahko na podlagi rezultatov testa WB ugotovimo 87,2 % specifičnost testa ELISA (pokazal je 6 lažno pozitivnih serumov). Ob upoštevanju še nejasnih oz. mejnih rezultatov, ki jih prištejemo k pozitivnim vrednostim testa ELISA, pa ugotovimo, da je specifičnost testa ELISA 73,2 % (15 lažno pozitivnih serumov).

Občutljivost testa ELISA je v primerjavi s testom WB 63,9 % (13 lažno negativnih serumov), če upoštevamo le pozitivne in negativne vrednosti testa ELISA in ne upoštevamo nejasnih oz. mejnih vrednosti. Ko mejne oz. nejasne vrednosti testa ELISA prištejemo k pozitivnim, dobimo občutljivost testa ELISA 67,5 % (4 WB pozitivne serume, ki so s testom ELISA pokazali mejne oz. nejasne vrednosti, dodamo k pozitivnim rezultatom testa ELISA).

Sicer proizvajalec testa ELISA, zanj navaja občutljivost in specifičnost višjo od 95 %.

Zanesljivost testov smo statistično ovrednotili s testom χ^2 :

- Ko smo mejne oz. nejasne vrednosti testa ELISA šteli za pozitivne vrednosti, smo ugotovili, da razlika med testoma WB in ELISA ni statistično značilna ($\chi^2=0,09$; $P=0,7705$).
- Če smo mejne oz. nejasne vrednosti testa ELISA šteli za negativne vrednosti, smo nato s testom χ^2 ugotovili, da tudi tokrat razlika ni statistično značilna ($\chi^2=2,73$; $P=0,0981$).
- Ko smo mejne oz. nejasne vrednosti testa ELISA prišteli k negativnim oz. pozitivnim vrednostim, glede na rezultat s testom WB, smo s testom χ^2 ugotovili, da se testa WB in ELISA ponovno statistično ne razlikujeta ($\chi^2=1,0830$; $P=0,2980$).

Vsi trije testi (WB, IHA, ELISA) so bili pozitivni le pri 18 vzorcih od skupno 96 vzorcev.

Od 56 vseh lažno pozitivnih rezultatov testov IHA in/ali ELISA v primerjavi s testom WB (t.j. mejni, nejasni ali pozitivni rezultati testa IHA in/ali ELISA, ki jih je nato test WB ovrednotil kot negativne) jih je bilo kar 41 na račun samo testa IHA, samo 7 lažno pozitivnih rezultatov je pokazal le test ELISA in 8 oba testa. Če upoštevamo le lažno pozitivne rezultate testov IHA in ELISA, brez upoštevanja mejnih oz. nejasnih vrednosti, sta nato v primerjavi s testom WB, oba testa pokazala lažno pozitivne rezultate pri 3 serumih, samo test IHA v 8 primerih, test ELISA pa v 3 primerih. Lažno negativne rezultate (t.j. negativni rezultati, ki jih je nato WB pokazal pozitivne) smo dobili le s testom ELISA, in sicer v 13 primerih.

Če opazujemo deleže pozitivnih rezultatov testov IHA in ELISA, ki jih je nato WB opredelil kot pozitivne, so ti rezultati obeh testov primerljivi (73 % za test IHA oz. 79 % za test ELISA). Tudi pri mejnih oz. nejasnih vrednostih testov IHA in ELISA se odstotki serumov, ki jih je nato WB opredelil kot pozitivne serume, ne razlikujejo znatno (22 % pri testu IHA oz. 31 % pri testu ELISA). Največjo razliko vidimo pri opredeljevanju negativnih rezultatov testov IHA in ELISA, kjer je test WB vseh 100 % negativnih serumov testa IHA opredelil kot negativne serume, a le 76 % negativnih serumov testa ELISA. Znatna razlika pa je tudi v številu mejnih rezultatov, ki jih je pri testu IHA več kot pri testu ELISA. Namreč kar 49 od 96 serumov je test IHA pokazal kot mejne vrednosti, torej več kot polovico (51 %), medtem ko ELISA le 14 %.

Vidimo lahko, da je ob primerjavi s testom WB specifičnost testa IHA majhna (38,9 %), specifičnost testa ELISA pa je 87,2 %.

Lažno negativne rezultate (t.j. negativni rezultati, ki jih je nato test WB pokazal pozitivne) smo dobili le s testom ELISA, in sicer v 13 primerih. Tako je občutljivost testa ELISA v primerjavi s testom WB 63,9 %, medtem ko je občutljivost testa IHA 100 %.

Za lažno negativne rezultate testov IHA in ELISA v primerjavi s testom WB nimamo oprijemljivih podatkov, saj bi bilo v ta namen potrebno s testom WB pregledati negativne serume testov IHA in ELISA. V rutinski diagnostiki parazitološkega laboratorija se v potrditveno testiranje s testom WB namreč vključuje oz. upošteva le serume, pri katerih je test IHA ali ELISA pokazal pozitiven oz. mejen rezultat.

To je lahko en razlog za razliko v dobljeni občutljivosti in tisti občutljivosti, ki jo navaja proizvajalec. Drugi razlog pa je ta, da dejansko ne vemo ali nato WB pozitivni rezultati res pomenijo pozitivne serume. Možna je namreč navzkrižna reaktivnost testa WB pri bolnikih z drugimi helminti. Proizvajalec navaja možnost lažno pozitivnih rezultatov testa WB v primeru, če ima bolnik cisticazmo, shistosomozo ali avtoimunsko bolezen.

Specifičnost testa WB so na 154 serumih bolnikov z drugimi parazitskimi in neparazitskimi boleznimi ugotovili 93 %. Do navzkrižne reaktivnosti je prišlo pri sedmih primerih izmed 20 primerov serumov bolnikov z nevrocisticerkozo in pri treh izmed 18 primerov bolnikov okuženih s parazitom *Schistosoma mansoni* (Liance in sod., 2000).

Proizvajalec testa WB navaja občutljivost testa 97,3 % za rod *Echinococcus*, 98 % za vrsto *E. granulosus* in 96,7 % za vrsto *E. multilocularis*. Razlikovanje med vrstama *E. granulosus* in *E. multilocularis* omogoča v 76 % primerov (Liance in sod., 2000).

Pozitiven rezultat obeh metod IHA in ELISA, kjer ni nobena od teh dveh metod pokazala mejnega rezultata in je bil test WB nato negativen, je le pri treh serumih. Morda ti trije rezultati predstavljajo lažno negativen rezultat testa WB. Tako preračunana občutljivost testa WB znaša 93 %. Ob upoštevanju tudi nejasnih oz. mejnih vrednosti testov IHA in ELISA je nato test WB opredelil 8 serumov kot negativne in dobimo občutljivost testa WB 83 %.

Pet serumov je dalo negativen rezultat s testom ELISA, mejni rezultat s testom IHA in nato pozitivnega s testom WB. Te serumi so sumljivi na lažno pozitivne rezultate testa WB. V tem primeru je naša preračunana specifičnost testa WB 92 %, kar se ujema z rezultati, ki so jih dobili Liance in sod., čeprav naša zasnova diplomske naloge ne omogoča točne določitve specifičnosti testov.

Izračuni nam kažejo, da je razlika med testom IHA in WB statistično značilna ali neznačilna, odvisna glede na to kako vrednotimo mejne oz. nejasne vrednosti. Sklepamo lahko, da test IHA zajame veliko lažno pozitivnih rezultatov, saj ko prištejemo mejne vrednosti tega testa k negativnim rezultatom ali glede na rezultate testa WB, nato razlika med testoma IHA in WB ni več statistično značilna. Če mejne vrednosti testa IHA prištejemo k pozitivnim vrednostim pa le-ta je statistično značilna.

Pri testu ELISA lahko vidimo, da razlika s testom WB ni statistično značilna tudi ob različnem vrednotenju mejnih oz. nejasnih vrednosti.

Tudi ob primerjavi različnosti rezultatov testov IHA in WB, ko smo mejne vrednosti testa IHA šteli za pozitivne, je razvidno kako test IHA kaže različne rezultate od testa WB, predvsem zaradi velikega števila lažno pozitivnih rezultatov. Mejne vrednosti smo namreč upoštevali kot pozitivne IHA vrednosti testa, torej je 49 različnih rezultatov le zaradi mejnih IHA vrednosti, od katerih je nato test WB 38 serumov pokazal negativne. Test ELISA kaže za skoraj polovico boljše ujemanje s testom WB, kot test IHA.

Kar 14 % rezultatov testa ELISA je lažno negativnih (zajeti so v diplomsko nalogu, ker je test IHA pokazal pozitiven ali mejen rezultat). To predstavlja kar več kot četrtino vseh WB pozitivnih serumov in s tem težavo pri izbiri testa ELISA kot presejalnega. Ker pa žal nimamo zlatega standarda, je mogoče tudi, da gre pri teh rezultatih za lažno pozitivne rezultate testa WB.

Liance in sod., 2000, glede ugotavljanja okužbe s trakuljo *E. granulosus* in *E. multilocularis* predlagajo test *Echinococcus* Western Blot IgG, in sicer kot potrditveni test za pozitivne serume presejalnega testiranja ali kot prva izbira testa, kadar so znani značilni klinični znaki ali rezultati slikanja.

Iz naših ugotovitev raziskave lahko povzamemo, da je test IHA boljša izbira testa za presejalno testiranje na ehinokokozo, saj je manjša verjetnost lažno negativnih rezultatov. Po testiranju s testom IHA pa je nujno potrditveno testiranje s testom *Echinococcus* Western Blot IgG. Ob tem je, kot navaja proizvajalec testa WB, potrebno rezultate tega testa upoštevati skupaj z vsemi dostopnimi kliničnimi in epidemiološkimi podatki ter rezultati slikanja.

5.2 SKLEPI

- Ko smo upoštevali le pozitivne in negativne rezultate testa IHA in ELISA in ne nejasnih oz. mejnih rezultatov, smo ob primerjavi s testom WB ugotovili, da je test IHA specifičen v 38,9 % primerov in test ELISA v 87,2 % primerov.
- Za test IHA smo ugotovili 100 % občutljivost, saj ni zgrešil niti enega WB pozitivnega seruma, medtem ko je test ELISA pokazal le 63,9 % občutljivost (13 lažno negativnih serumov).
- Test IHA je pokazal veliko več serumov (51 %) z mejnimi vrednostmi kot test ELISA, ki je pokazal samo 14 % mejnih vrednosti. Ugotovili smo, da je odstotek mejnih rezultatov testov IHA in ELISA, ki jih je nato test WB opredelil kot pozitivne, primerljiv (za test IHA 22 % oz. test ELISA 31 %).
- Test IHA nam je pokazal veliko več »lažno pozitivnih« rezultatov (nizko pozitivnih oz. mejnih vrednosti) kot test ELISA. Tako je razlika med testom WB in IHA statistično značilna le v primeru, ko mejne oz. nejasne vrednosti testa IHA štejemo za pozitivne vrednosti.
- Test ELISA nam je pokazal skoraj za polovico boljše ujemanje s testom WB kot test IHA.
- V 14 % vseh serumov je test ELISA pokazal lažno negativne rezultate.
- Občutljivost testa WB znaša 93 %, če smo kot lažno negativne rezultate testa WB upoštevali 3 WB negativne serume, kjer so bili rezultati obeh metod IHA in ELISA pozitivni. Pet serumov je pokazalo negativen rezultat s testom ELISA, mejni rezultat s testom IHA in nato pozitivnega s testom WB. Ti serumi so bili sumljivi na lažno pozitivne rezultate testa WB. V tem primeru je preračunana specifičnost testa WB znašala 92 %.

- Ugotovili smo, da je za presejalno testiranje na ehinokokozo boljši test IHA kot ELISA, saj smo z njim ugotovili veliko manj lažno negativnih rezultatov. Za test WB pa smo ugotovili 92 % specifičnost in 93 % občutljivost, kar kaže, da je odličen za potrditev dvomljivih rezultatov testa IHA kot tudi testa ELISA.
- Rezultate testa WB je potrebno upoštevati skupaj z vsemi kliničnimi in epidemiološkimi podatki ter s podatki računalniške tomografije ali magnetne resonance.

6 POVZETEK

Ehinokokoza je zoonoza, ki jo povzroča odrasla žival ali ličinka trkulje rodu *Echinococcus*. Mesojede živali parazitom služijo kot končni gostitelji, kjer v črevesju odrasla trkulja producira jajčeca. Z zaužitjem teh jajčec se lahko okužijo živali (vmesni gostitelji) ali ljudje. Onkosfera predre steno tankega črevesja vmesnega gostitelja in ko doseže kapilaro ali črevesno mezgovnico, pasivno potuje do jeter. Največkrat se zadrži v jetrih, lahko pa potuje tudi do pljuč, ledvic, vranice, mišic ali možganov. Okužba z ličinko se kaže kot dolgotrajna rast hidatidnih (metacestodnih) cist ali t.i. mehurnjakov. Krog se zaključi takrat, ko takšnega vmesnega gostitelja požre ustrezna mesojeda žival.

Medicinsko pomembni vrsti sta *Echinococcus granulosus* in *Echinococcus multilocularis*, ki povzročata cistično in alveolarno ehinokokozo. Le-ti sta obe resni, življenje ogrožajoči bolezni, še posebno alveolarna ehinokokoza z visoko umrljivostjo in hudo prognozo, če okužbe ne zdravimo. K boljši prognozi prispeva tudi zgodnja postavitev diagnoze.

V nalogi smo skušali ovrednotiti zanesljivost testa Western blot (WB) za rutinsko ugotavljanje ehinokokoze in ugotoviti, če lahko služi za potrjevanje drugih seroloških testov, napr. posredne hemaglutinacije (IHA) ali encimsko imunskega testa (ELISA).

Med 1. januarjem 2002 in 31. decembrom 2006 smo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani 96 serumov bolnikov s sumom na ehinokokozo najprej pregledali s testoma IHA in ELISA. Ko je eden od testov pokazal nejasen, mejen ali pozitiven rezultat, smo vzorce testirali še s testom WB. Dobljene rezultate smo ovrednotili s χ^2 testom.

Od 96 serumov je test IHA pri 40 serumih pokazal pozitiven rezultat, 7 serumov je bilo negativnih in 49 z nejasnimi oz. mejnimi vrednostmi. Od 40 pozitivnih serumov jih je test

WB pokazal 29 (73 %) kot pozitivne serume in 11 (27 %) kot negativne serume. Sedem negativnih serumov testa IHA je po testiranju z metodo WB prav tako pokazalo negativen rezultat. Po testiranju nejasnih oz. mejnih serumov s testom WB je od 49 nejasnih oz. mejnih vzorcev, 11 (22 %) serumov pokazalo pozitiven rezultat, 38 (78 %) vzorcev pa negativen rezultat.

Od 96 serumov je test ELISA pri 29 serumih pokazal pozitiven rezultat, 54 serumov je bilo negativnih in 13 nejasnih oz. mejnih. Od 29 ELISA pozitivnih serumov jih je test WB 23 (79 %) pokazal kot pozitivne serume in 6 (21 %) kot negativne serume. Od 54 ELISA negativnih serumov je test WB pokazal 13 (24 %) kot pozitivne serume in 41 (76 %) kot negativne serume. Od 13 nejasnih oz. mejnih vrednosti serumov je test WB potrdil 4 (31 %) serume kot pozitivne serume in 9 (69 %) kot negativne serume.

Ko smo upoštevali le pozitivne in negativne rezultate testa IHA in ELISA in ne nejasnih oz. mejnih rezultatov, smo ob primerjavi teh dveh testov s testom WB ugotovili, da je test IHA specifičen v 38,9 % primerov in test ELISA v 87,2 % primerov. Za test IHA smo ugotovili 100% občutljivost, saj ni zgrešil niti enega WB pozitivnega seruma, medtem ko je test ELISA pokazal le 63,9 % občutljivost (13 lažno negativnih serumov).

Občutljivost testa WB znaša 93 %, če smo kot lažno negativne rezultate testa WB upoštevali 3 WB negativne serume, kjer so bili rezultati obeh metod IHA in ELISA pozitivni. Pet serumov je pokazalo negativen rezultat s testom ELISA, mejni rezultat s testom IHA in nato pozitivnega s testom WB. Ti serumi so bili sumljivi na lažno pozitivne rezultate testa WB. V tem primeru je preračunana specifičnost testa WB znašala 92 %, kar se ujema z rezultati, ki so jih dobili Liance in sod., 2000.

Če smo mejne vrednosti testa IHA šteli za pozitivne vrednosti, je razlika med testoma IHA in WB statistično značilna. Testa WB in ELISA pa se tudi ob različnih vrednotenjih mejnih oz. nejasnih vrednosti testa ELISA med seboj ne razlikujeta s statistično značilno razliko.

Ugotovili smo, da je za presejalno testiranje na ehinokokozo boljši test IHA kot ELISA, saj je pokazal manj lažno negativnih rezultatov kot test ELISA. Za test WB pa smo ugotovili, da je odličen potrditveni test, tako za dvomljive rezultate testa IHA kot testa ELISA. Zanj smo ugotovili 92 % specifičnost in 93 % občutljivost.

7 VIRI

Ammann R., Eckert J. 1995. Clinical diagnosis and treatment of echinococcosis in humans. V: *Echinococcus* and hydatid disease. Thompson R.C.A., Lymbery A.J. (eds.). Wallingford, CAB International: 411-463

Ammann R.W., Eckert J. 1996. *Cestodes. Echinococcus*. Gastroenterology Clinics of North America, 25, 3: 655-689

Andersen F.L., Ouhelli H., Kachani M. 1997. Compendium on cystic echinococcosis in Africa and in Middle Eastern Countries with special reference to Morocco. Provo, Brigham Young University, Print Services: 1-345

Auer H., Hermentin K., Aspöck H. 1988. Demonstration of a specific *Echinococcus multilocularis* antigen in the supernatant of in vitro maintained protoscolices. Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene, 268, 3: 416-23

Barbieri M., Fernández C., González A., Luaces V.M., Nieto A. 1998. Diagnostic evaluation of a synthetic peptide derived from a novel antigen B subunit as related to other available peptides and native antigens used for serology of cystic hydatidosis. Parasite Immunology, 29: 51-61

Basset D., Girou C., Nozais I.P., D'Hermies F., Hoang C., Gordon R., D'Alessandro A. 1998. Neotropical echinococcosis in Suriname: *Echinococcus oligarthus* in the orbit and *Echinococcus vogeli* in the abdomen. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 59, 5: 787-790

Brehm A.E. 1887. Brehm's Tierleben. File: Paka (Coelogenys Paca). Wikimedia Commons
[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Paka_\(Coelogenys_Paca\).png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Paka_(Coelogenys_Paca).png) : 1

Bresson-Hadni S., Vuitton D.A., Bartholomot B., Heyd B., Godart D., Meyer J.P., Hrusovsky S., Becker M.C., Mantion G., Lenys D., Miguet J.P. 2000. A twenty-year history of alveolar echinococcosis: analysis of a series of 117 patients from eastern France. European Journal of Gastroenterology & Hepatology, 12, 3: 327–336

Brglez J. 1970. Echinococcosis in Slovenia. Zdravniški Vestnik, 39: 265-267

Brglez J., Kryštufek B. 1984. Metacestod *Echinococcus multilocularis* pri *Apodemus flavicollis* v Sloveniji. Zbornik Biotehniške Fakultete Univerze Edvarda Kardelja v Ljubljani, Veterinarstvo, 21, 1: 173-176

CDC. 2008. Echinococcosis. Atlanta, CDC-Centers for Disease Control and Prevention
<http://dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Echinococcosis.htm> : 1

Conchedda M., Ecci A., Gabrielle F., Bortoletti G., Palmas C. 2002. Options for control of echinococcosis: the Sardinian example. V: Cestode zoonoses: echinococcosis and cysticercosis. Craig P., Pawlowski Z. (eds.). Amsterdam, IOS Press: 343-353

Craig P.S. 1997. Immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* and comparison of techniques for diagnosis of canine echinococcosis. V: Compendium on cystic echinococcosis in Africa and in Middle Eastern Countries with special reference to Morocco. Andersen F.L., Ouhelli H., Kachani M. (eds.). Provo, Brigham Young University, Print Services: 85-118

D'Alesandro A. 1997. Polycystic echinococcosis in tropical America: *Echinococcus vogeli* and, *E oligarthrus*. Acta Tropica, 67: 43-65

Di Felice G., Pini C., Afferri C., Vicari G. 1986. Purification and partial characterization of the major antigen of *Echinococcus granulosus* (antigen 5) with monoclonal antibodies. Molecular and Biochemical Parasitology, 20, 2: 133-142

Doiz O., Benito R., Sbihi Y., Osuna A., Clavel A., Gómez-Lus R. 2001. Western blot applied to the diagnosis and post-treatment monitoring of human hydatidosis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 41, 3: 139-142

Dreweck C.M., Lüder C.G., Soboslay P.T., Kern P. 1997. Subclass-specific serological reactivity and IgG4-specific antigen recognition in human echinococcosis. *Tropical Medicine & International Health*, 2, 8: 779-787

Eckert J. 1998. Alveolar echinococcosis (*Echinococcus multilocularis*) and other forms of echinococcosis (*E. vogeli* and *E. oligarthrus*). V: *Zoonoses*. Palmer S.R., Soulsby E.J.L., Simpson D.I.H. (eds.). Oxford, Oxford University Press: 689-716

Eckert J., Conraths F., Tackmann K. 2000. Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? *International Journal for Parasitology*, 30: 1283-1294

Eckert J., Deplazes P. 1999. Alveolar echinococcosis in humans: the current situation in Central Europe and the need for countermeasures. *Parasitology Today*, 15, 8: 315-9

Eckert J., Deplazes P. 2004. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clinical Microbiology Reviews*, 17, 1: 107-135

Eckert J., Schantz P.M., Gasser R.B., Torgerson P.R., Bessonov A.S., Movsessian S.O., Thakur A., Grimm F., Nikogossian M.A. 2001. Geographic distribution and prevalence. V: WHOI/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. Eckert J., Gemmell M., Meslin F.-X., Pawlowski Z. (eds.). Paris, World Organisation for Animal Health: 101-143

Franchi C., Di Vico B., Teggi A. 1999. Long-term evaluation of patients with hydatidosis treated with benzimidazole carbamates. *Clinical Infectious Diseases*, 29: 304-309

Frider B., Larrieu E., Odriozola M. 1999. Long-term outcome of asymptomatic liver hydatidosis. *Journal of Hepatology*, 30, 2: 228-231

Gemmell M., Roberts M., Beard T., Campano-Diaz S., Lawson J., Nonnemaker J. 2001. Control of echinococcosis. V: WHOI/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. Eckert J., Gemmell M., Meslin F.-X., Pawlowski Z. (eds.). Paris, World Organisation for Animal Health: 195-204

Gottstein B., Tschudi K., Eckert J., Ammann R. 1989. Em2-ELISA for the follow-up of alveolar echinococcosis after complete surgical resection of liver lesions. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83: 389-393

Gottstein B., Jacquier P., Bresson-Hadni S., Eckert J. 1993. Improved primary immunodiagnosis of alveolar echinococcosis in humans by an enzyme-linked immunosorbent assay using the Em2plus antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 2: 373-376

Gottstein B., D'Alessandro A., Rausch R.L. 1995. Immunodiagnosis of polycystic hydatid disease/polycystic echinococcosis due to *Echinococcus vogeli*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53, 5: 558-563

Grimm F., Maly F.E., Lü J., Llano R. 1998. Analysis of specific immunoglobulin G subclass antibodies for serological diagnosis of Echinococcosis by a standard enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5, 5: 613-616

Guisantes J.A. 1997. Progress on the laboratory diagnosis of the human hydatid disease – from the recent past till the present. *Archivos Internacionales de la Hidatidosis*, 32: 136-140

Haag K.L., Zaha A., Araujo A.M., Gottstein B. 1997. Reduced genetic variability within coding and non-coding regions of the *Echinococcus multilocularis* genome. *Parasitology*, 115: 521-529

Helbig M., Frosch P., Kern P., Frosch M. 1993. Serological differentiation between cystic and alveolar echinococcosis by use of recombinant larval antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 12: 3211-3215

Horton R. 1997. Albendazole in treatment of human cystic echinococcosis: 12 years of experience. *Acta Tropica*, 64: 79-93

Ibrahem M.M., Craig P.S., McVie A., Ersfeld K., Rogan M.T. 1996. *Echinococcus granulosus* antigen B and seroreactivity in natural ovine hydatidosis. *Research in Veterinary Science*, 61: 102-106

Ioppolo S., Notari Giacomo S., Profumo E., Franchi C., Ortona E., Rigano R., Siracusano A. 1996. Immunological responses to antigen B from *Echinococcus granulosus* cyst fluid in hydatid patients. *Parasite Immunology*, 18, 11: 571-578

Ito A., Nakao M., Kutsumi H., Lightowlers M.W., Itoh M., Sato S. 1993. Serodiagnosis of alveolar hydatid disease by western blotting. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 87, 2: 170-172

Ito A., Ma L., Schantz P.M., Gottstein B., Liu Y.H., Chai J.J., Abdel-Hafez S.K., Altintas N., Joshi D.D., Lightowlers M.W., Pawlowski Z.S. 1999. Differential serodiagnosis for cystic and alveolar echinococcosis using fractions of *Echinococcus granulosus* cyst fluid (antigen B) and *E. multilocularis* protoscolex (EM18). American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 60, 2: 188-192

Khabiri A.R., Bagheri F., Assmar M., Siavashi M.R. 2006. Analysis of specific IgE and IgG subclass antibodies for diagnosis of *Echinococcus granulosus*. Parasite Immunology, 28, 8: 357-362

Lawn S.D., Bligh J., Craig P.S., Chiodini P.L. 2004. Human cystic echinococcosis: evaluation of post-treatment serologic follow-up by IgG subclass antibody detection. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 70, 3: 329-335

Le T., Pearson M., Blair D., Dai N., Zhang L., McManus D.P. 2002. Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse-dog and sheep-dog strains of *Echinococcus granulosus*. Parasitology, 124: 97-112

Leggatt G.R., McManus D.P. 1994. Identification and diagnostic value of a major antibody epitope on the 12 kDa antigen from *Echinococcus granulosus* (hydatid disease) cyst fluid. Parasite Immunology, 16, 2: 87-96

Leggatt G.R., Yang W., McManus D.P. 1992. Serological evaluation of the 12 kDa subunit of antigen B in *Echinococcus granulosus* cyst fluid by immunoblot analysis. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 86, 2: 189-192

Lianc M., Janin V., Bresson-Hadni S., Vuitton D.A., Houin R., Piarroux R. 2000. Immunodiagnosis of *Echinococcus* infections: confirmatory testing and species differentiation by a new commercial Western Blot. Journal of Clinical Microbiology, 38, 10: 3718-21

Lightowlers M.W., Rickard M.D., Honey R.D., Obendorf D.L., Mitchell G.F. 1984. Serological diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in sheep using cyst fluid antigen processed by antibody affinity chromatography. Australian Veterinary Journal, 61: 101-108

Lighthowlers M.W., Gottstein B. 1995. Echinococcosis/hydatidosis: antigens, immunological and molecular diagnosis. V: *Echinococcus* and hydatid disease. Thompson R.C.A., Lymbery A.J. (eds.). Oxon, CAB International: 355-410

Liu Y.H. 1997. Continuous or intermittent treatment with albendazole? Archivos Internacionales de la Hidatidosis, 32: 171-173

Logar J., Soba B., Kotar T. 2008. Serological evidence for human cystic echinococcosis in Slovenia. BMC Infectious Diseases, 8: 63

Logar J., Soba B., Lejko-Zupanc T., Kotar T. 2007. Human alveolar echinococcosis in Slovenia. Clinical Microbiology and Infection, 13, 5: 544-546

Lorenzo C., Salinas G., Brugnini A., Wernstedt C., Hellman U., González-Sapienza G. 2003. Echinococcus granulosus antigen 5 is closely related to proteases of the trypsin family. Biochemical Journal, 369, 1: 191-198

Ma L., Ito A., Liu Y.H., Wang X.G., Yao Y.Q., Yu D.G., Chen Y.T. 1997. Alveolar echinococcosis: Em2plus-ELISA and Em18-western blots for follow-up after treatment with albendazole. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 91: 476-478

Macpherson C.N.L. 1983. An active intermediate host role for man in the life cycle of *Echinococcus granulosus* in Turkana, Kenya. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 32: 397-404

Maddison S.E., Slemenda S.B., Schantz P.M., Fried J.A., Wilson M., Tsang V.C. 1989. A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDa. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 40: 377-383

Mboti B., Van de Stadt J., Carlier Y., Peny M., Jacobs F., Bourgeois N., Adler M., Gelin M. 1996. Long-term disease-free survival after liver transplantation for alveolar echinococcosis. Acta Chirurgica Belgica, 96, 5: 229-232

McManus D.P. 2002. The molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* and cystic hydatid disease. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 96, 1: 151-157

McManus D.P., Zhang W., Li J., Bartley P.B. 2003. Echinococcosis. Lancet, 362, 9392: 1295-1304

Moro P., Verastegui M., Gilman R.H., Falcon N., Bernal T., Gavidia C., Gonzalez A., Malqui V., Moro M.H., Dueger E. 1997. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay for diagnosis of hydatidosis (*Echinococcus granulosus*) in sheep. Veterinary Record, 140: 605-606

Nirmalan N., Craig P.S. 1997. Immunoblot evaluation of the species-specificity of Em18 and Em16 antigens for serodiagnosis of human alveolar echinococcosis. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 91, 4: 484-486

Pawlowski Z.S. 1997. Critical points in the clinical management of cystic echinococcosis. V: Compendium on cystic echinococcosis in Africa and in Middle Eastern Countries with special reference to Morocco. Andersen F.L., Ouhelli H., Kachani M. (eds.). Provo, Brigham Young University, Print Services: 119-135

Pawlowski I., Eckert J., Vuitton D.A., Ammann R.W., Kern P., Craig K.F., Dar K.F., De Rosa F., Filice C., Gottstein B., Grimm F., Macpherson C.N.L., Sato N., Todorov T., Uchino J., von Siner W., Wen H. 2001. Echinococcosis in humans: clinical aspects, diagnosis and treatment. V: WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. Eckert J., Gemmell M., Meslin F.-X., Pawlowski Z. (eds.). Paris, World Organisation for Animal Health: 20-71

Piarroux R., Janin, V., Bresson-Hadni S., Vuitton D.A., Houin R., Liance M. 2000. Diagnostic value of a western blot using crude larval antigen from *Echinococcus multilocularis*. Acta Parasitologica, 45: 196

Profumo E., Ortona E., Riganò R., Gioia I., Notargiacomo S., Ioppolo S., Siracusano A. 1994. Cellular and humoral responses to antigenic subunits of *Echinococcus granulosus* cyst fluid in hydatid patients. Parasite Immunology, 16, 8: 393-398

Rausch R.L. 1975. *Taeniidae*. V: Diseases transmitted from animals to men. Hubbert W.F., McCulloch W.F., Schurrenberger P.R. (eds.). Springfield, Thomas: 678-707

Rausch R.L. 1995. Life-cycle patterns and geographic distribution of *Echinococcus* species. V: *Echinococcus* and hydatid disease. Thompson R.C.A., Lymbery A.J. (eds.). Wallingford, CAB International: 89-134

Rausch R.L., Wilson J.F. 1973. Rearing of the adult *Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863, from sterile larvae from man. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 22, 3: 357-360

Rausch R.L., Wilson J.F., Schantz P.M., McMahon B.J. 1987. Spontaneous death of *Echinococcus multilocularis*: cases diagnosed serologically (by Em2 ELISA) and clinical significance. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 36, 3: 576-585

Rogan M.T., Craig P.S., Zeyhle E., Romig T., Lubano G.M., Deshan L. 1991. Evaluation of a rapid dot-ELISA as a field test for the diagnosis of cystic hydatid disease. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 85, 6: 773-777

Sambesh M.K., Craig P.C., Wen H. 1997. IgG1 and IgG4 serum antibody responses in asymptomatic and clinically expressed cystic echinococcosis patients. Acta Tropica, 64: 53-63

Sarciron E.M., Bresson-Hadni S., Mercier M., Lawton P., Duranton C., Lenys D., Petavy A.F., Vuitton D.A. 1997. Antibodies against *Echinococcus multilocularis* alkaline phosphatase as markers for the specific diagnosis and the serological monitoring of alveolar echinococcosis. Parasite Immunology, 19: 61-68

Sato N., Nagano H., Furuya K. 1996. A diagnostic polysaccharid antigen in human alveolar hydatid disease. V: Alveolar echinococcosis. Strategy for eradication of alveolar echinococcosis of the liver. Uchino J., Sato N. (eds.). Sapporo, Fuji Shoin: 129-134

Sato N., Namieno T., Furuya K., Takahashi H., Yamashita K., Uchino J., Suzuki K. 1997. Contribution of mass screening system to resectability of hepatic lesions involving, *Echinococcus multilocularis*. Journal of Gastroenterology, 32, 3: 351-354

Shepherd J.C., McManus D.P. 1987. Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. Molecular and Biochemical Parasitology, 25, 2: 143-154

Shepherd J.C., Aitken A., McManus D.P. 1991. A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. Molecular and Biochemical Parasitology, 44, 1: 81-90

Short J.A., Heirier D.C., Hsiao R.L., Anderson F.L. 1990. Immunoglobulin E and G4 antibodies in cysticercosis. Journal of Clinical Microbiology, 28: 1635-1639

Siracusano A., Vuitton D. 1997. Immunology and immunopathology of *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* infections. Archivos Internacionales de la Hidatidosis, 32: 132-135

Thompson R.C.A. 1995. Biology and systematics of *Echinococcus*. V: *Echinococcus* and hydatid disease. Thompson R.C.A., Lymbery A.J. (eds.). Wallingford, CAB International: 1-50

Thompson R.C.A., McManus D.P. 2001. Aetiology: parasites and life-cycles. V: WHOI/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. Eckert J., Gemmell M., Meslin F.-X., Pawlowski Z. (eds.). Paris, World Organisation for Animal Health: 1-19

Thompson R.C.A., McManus D.P. 2002. Taxonomic revision of, Echinococcus. Trends in Parasitology, 18: 452-457

Vuitton D.A., Bresson-Hadni S., Bartholomot B., Mantion G., Miguet J.P. 1996. The natural history of alveolar echinococcosis before and during the era of benzimidazoles. V: Alveolar echinococcosis. Strategy for eradication of alveolar echinococcosis of the liver. Uchino J., Sato N. (eds.). Sapporo, Fuji Shoin: 243-251

Wen H., Craig P.S. 1994. Immunoglobulin G subclass responses in human cystic and alveolar echinococcosis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 51, 6: 741-748

Wen H., Craig P.S., Ito A., Vuitton D.A., Bresson-Hadni S., Allan J.C., Rogan M.T., Paollilo E., Shambesh M. 1995. Immunoblot evaluation of IgG and IgG-subclass antibody responses for immunodiagnosis of human alveolar echinococcosis. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 89, 5: 485-95

Wilson J.F., Rausch R.L., McMahon B.J., Schantz P.M. 1992. Parasiticidal effect of chemotherapy in alveolar hydatid disease: review of experience with mebendazole and albendazole in Alaskan Eskimos. Clinical Infectious Diseases, 15, 2: 234-249

Xiao N., Qiu J., Nakao M., Li T., Yang W., Chen X., Schantz P.M., Craig P.S., Ito A. 2005. *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. International Journal for Parasitology, 35, 6: 693-701

Young W.K., Heath D.D., Van Knapen F. 1984. Comparison of cestode antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena*. Research in Veterinary Science, 36: 24-31

Zentel. 1999. Manufacturer's information on Zentel. V: Arzneimittelkompendium der Schweiz. Morant J., Ruppaner H. (eds.). Basel, Documed AG: 2644-2645

Zhang W., Li J., McManus D.P. 2003. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. Clinical Microbiology, 16: 18-36

ZAHVALA

Mentorju prof. dr. Jerneju Logarju se zahvaljujem za vso pomoč in potrpežljivost. Hvala tudi vsem v parazitološkem laboratoriju Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, še posebno gospodu Jožetu Kastelicu za izčrpno pomoč in prijaznost pri delu ter zbiranju podatkov.

Hvala prof. dr. Tatjani Avšič-Županc za recenzijo.

Hvala mojim in ... vsem dobrim ljudem.

