

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Dane LUŽNIK

**PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI DVEH METOD ZA
UGOTAVLJANJE PROTITELES IgG IN IgM PROTI PRAŽIVALI
*Toxoplasma gondii***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF EFFICIENCY OF TWO METHODS FOR
DETECTION OF IgG AND IgM ANTIBODIES TO PROTOZOAN
*Toxoplasma gondii***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

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

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

Mentor: prof. dr. Jernej Logar, univ. dipl. biol.
Somentor: doc.dr. Miroslav Petrovec, dr. med.
Recenzentka: prof. dr. Tatjana Avšič Županc, univ. dipl. biol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur Bertok, univ.dipl.biol.
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član: prof. dr. Jernej Logar, univ. dipl. biol.
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo
Član: doc. dr. Miroslav Petrovec, dr. med.
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo
Članica: prof. dr. Tatjana Avšič Županc, univ. dipl. biol.
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Dane Lužnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 577.336.083.34: 616.993(043)=163.6
KG	serološki testi/ mikrobiološke tehnike/ <i>Toxoplasma gondii</i> / toksoplazmoza/ protitelesa IgG/ protitelesa IgM/ fluorescenčni testi/ občutljivost aparata/ aparat cobas e 411/ aparat Liaison/ presejalno testiranje
AV	LUŽNIK, Dane
SA	LOGAR, Jernej (mentor) / PETROVEC, Miroslav (somentor) / AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2009
IN	PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI DVEH METOD ZA UGOTAVLJANJE PROTITELES IgG IN IgM PROTI PRAŽIVALI <i>Toxoplasma gondii</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 61 str., 15 pregl., 5 sl., 5 pril., 20 vir.
IJ	Sl
Jl	sl/en
AI	V nalogi smo si zadali cilj, da preskusimo in ovrednotimo dve metodi oz. testa (aparati Liaison in cobas e 411) za dokazovanje protiteles IgG in IgM proti <i>Toxoplasma gondii</i> . V obdobju od septembra 2007 do januarja 2008 smo z obema metodama pregledali 173 serumov nosečnic na okužbo s <i>T. gondii</i> . Rezultate obeh metod smo primerjali in ugotavljali odstotek ujemanja ali neujemanja testov. Vzorce z rezultati, ki se niso ujemali, smo dodatno testirali z metodo imunoblot. Rezultati na specifična IgG protitelesa so se z obema metodama ujemali pri 153 (88,4 %) vzorcih. Z dodatnim imunoblot testiranjem na IgG protitelesa, smo ugotovili, da je dal aparat Liaison od vseh pregledanih vzorcev pravilen rezultat v 97,1 %, aparata cobas e 411 pa v 88,4 %. Občutljivost testov na IgG protitelesa je bila pri obeh testih oz. aparatih 100 %. Specifičnost aparata Liaison je bila 100 %, aparata cobas e 411 pa 68,1 %. Pri testiranju IgM protiteles sta se metodi ujemali pri 112 vzorcih oz. v 64,7 %. Cobas IgM test je bil pri 173 pregledanih vzorcih pravilen pri 128 vzorcih (74,0 %), Liaison IgM test pa je bil pravilen pri 133 vzorcih (76,9 %). Glede IgM protiteles, smo pri aparatu cobas e 411 ugotovili 97,4 % občutljivost in 81,5 % specifičnost, pri sistemu Liaison pa 65,8 % občutljivost in 97,2 % specifičnost. Menimo, da sta obe metodi glede ujemanja in predvsem zaradi visoke občutljivosti na protitelesa IgG in IgM, zanesljivi in primerni za testiranje na kongenitalno toksoplazmozo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 577.336.083.34: 616.993(043)=163.6
CX serologic tests/ microbiological techniques/ *Toxoplasma gondii*/
toxoplasmosis/ antibodies IgG/ antibodies IgM/ fluorescent tests/ sensitivity
of analyser/ cobas e 411 analyser/ Liaison analyser/ screening tests
AU LUŽNIK, Dane
AA LOGAR, Jernej (supervisor) / PETROVEC, Miroslav (co-advisor) / AVŠIČ
ŽUPANC, Tatjana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
PY 2009
TI COMPARISON OF EFFICIENCY OF TWO METHODS FOR DETECTION
OF IgG AND IgM ANTIBODIES TO PROTOZOAN *Toxoplasma gondii*
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 61 p., 15 tab., 5 fig., 5 app., 20 ref.
LA Sl
AL sl/en
AB The objective of our task was to test and evaluate two methods (diagnostic
system Liaison and cobas e 411) for the detection of IgG and IgM antibodies
against *Toxoplasma gondii*. In the period from September 2007 to January
2008 we examined 173 sera from pregnant women for infection with *T. gondii*
using both methods. We compared the results of both methods and observed
the percentage of match or mismatch of the tests. Further have we tested the
samples with non matching results with the imunoblot method. Results for
specific IgG antibodies matched in 153 (88.4 %) samples with both methods.
With additional imunoblot testing on IgG antibodies we found out that the
Liaison analyser gave the correct result in 97.1 % of all examined samples and
cobas e 411 in 88.4 %. Sensitivity of the methods for IgG antibodies was 100
% in both methods. The specificity of the diagnostic system Liaison was 100
% and of cobas e 411 68.1 %. In testing IgM antibodies both methods
matched in 112 samples, that is in 64.7 %. Cobas IgM test was of 173
examined samples correct in 128 samples (74.0 %), Liaison IgM test was
correct in 133 samples (76.9 %). For testing antibodies IgM cobas e 411 had
97.4 % sensitivity and 81.5 % specificity. The Liaison system had 65.8 %
sensitivity and 97.2 % specificity. We believe that the two methods are
reliable and suitable for screening testing for congenital toxoplasmosis due to
the match and the high sensitivity to antibodies IgG and IgM.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
1 UVOD	1
1.1 Namen dela	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	3
2.2 Življenjski krog in prenos	4
2.3 Klinična slika	4
2.3.1 Pridobljena toksoplazmoza	4
2.3.2 Toksoplazmoza pri imunsko oslabljenih	5
2.3.3 Kongenitalna toksoplazmoza	6
2.4 Laboratorijska diagnostika okužb s <i>T. gondii</i>	7
2.4.1 Izolacija <i>T. gondii</i>	7
2.4.2 Histološka diagnoza	7
2.4.3 Serološki testi	8
2.4.3.1 Specifična protitelesa IgG	9
2.4.3.2 Specifična protitelesa IgM.....	9
2.4.3.3 Interpretacija rezultatov seroloških testov	10
2.4.3.4 Specifična protitelesa IgA	11
2.4.3.5 Specifična protitelesa IgE.....	11
2.4.3.6 Serološko testiranje z uporabo rekombinantnih antigenov <i>T. gondii</i>	11
2.4.4 Verižna reakcija s polimerazo - PCR	12
2.5 Epidemiologija	13
2.6 Presejalno testiranje	14
2.6.1 Presejalno testiranje na <i>Toksoplasma gondii</i> v tujini	15
2.7 Učinkovitost zdravljenja kongenitalne toksoplazmoze in smiselnost presejalnega testiranja	15

2.8 Serološko presejalno testiranje na okužbo s <i>Toxoplasma gondii</i> v Sloveniji.....	17
2.9 Pogostost akutne toksoplazmoze pri nosečnicah glede na letni čas	20
3 MATERIAL IN METODE	22
3.1 Vzorci	22
3.2 Metode dela	23
3.2.1 Aparat cobas e 411.....	23
3.2.2 Diagnostični sistem LIAISON	25
3.3 <i>recomLine Toxoplasma IgG, IgM</i>	28
3.4 Izračun občutljivosti in specifičnosti testov.....	32
4 REZULTATI	33
4.1 Protitelesa IgG proti <i>Toxoplasma gondii</i>	34
4.1.1 Občutljivost in specifičnost metod za določevanje protiteles IgG.....	36
4.2 Protitelesa IgG proti <i>Toxoplasma gondii</i> ; rezultati Toxo IgG ECLIA vrednoteni z dodatnimi navodili tovarne Roche	37
4.3 Protitelesa IgG proti <i>Toxoplasma gondii</i> ob dvigu pozitivne meje aparata cobas e 411 na 30 IU/mL	39
4.3.1 Občutljivost in specifičnost metod za določevanje protiteles IgG ob dvigu pozitivne meje aparata cobas e 411.....	41
4.4 Protitelesa IgM proti <i>Toxoplasma gondii</i>	43
4.4.1 Občutljivost in specifičnost metod za določevanje protiteles IgM.....	47
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	48
5.2. Sklepi.....	54
6 POVZETEK	56
7 VIRI	58
ZAHVALA	61
PRILOGE	62

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 2. 01: Interpretacija rezultatov seroloških testov za določanje specifičnih protiteles IgG in IgM proti <i>T. gondii</i>	10
Preglednica 3. 01: Točkovno vrednotenje antigenov <i>T. gondii</i> , ki ga uporabljamo pri interpretaciji testa imunoblot.	32
Preglednica 3. 02: Interpretacija točkovnih vrednosti pri testu imunoblot.	32
Preglednica 4. 01: Primerjava števila in delež pozitivnih, negativnih in mejnih rezultatov pri dokazovanju specifičnih protiteles proti <i>T. gondii</i> razredov IgG in IgM.....	33
Preglednica 4. 02.: Ujemanje rezultatov pri dokazovanju specifičnih protiteles IgG in IgM proti <i>T. gondii</i>	34
Preglednica 4. 03: Primerjava rezultatov testiranj na specifična protitelesa IgG proti <i>T. gondii</i>	34
Preglednica 4. 04: Rezultati testiranj vzorcev z neujemajočimi rezultati pri testiranju specifičnih protiteles IgG s tremi različnimi metodami.	35
Preglednica 4. 05: Primerjava rezultatov testiranj na specifična protitelesa IgG proti <i>T. gondii</i>	37
Preglednica 4. 06: Rezultati testiranj vzorcev z neujemajočimi rezultati pri testiranju specifičnih protiteles IgG proti <i>T. gondii</i> s tremi različnimi metodami.	38
Preglednica 4. 07: Primerjava rezultatov testiranj na specifična protitelesa IgG proti <i>T. gondii</i>	39
Preglednica 4. 08: Rezultati testiranj vzorcev z neujemajočimi rezultati pri testiranju specifičnih protiteles IgG proti <i>T. gondii</i> s tremi različnimi metodami.	40
Preglednica 4. 09: Primerjava števila in delež pozitivnih, negativnih in mejnih rezultatov pri dokazovanju specifičnih protiteles proti <i>T. gondii</i> razredov IgG in IgM.....	42
Preglednica 4. 10: Primerjava rezultatov testiranj na specifična protitelesa IgM proti <i>T. gondii</i>	43
Preglednica 4. 11: Primerjava rezultatov testa cobas IgM proti <i>T. gondii</i> z metodo imunoblot.....	45
Preglednica 4. 12: Primerjava rezultatov testa Liaison IgM proti <i>T. gondii</i> z metodo imunoblot.....	45

KAZALO SLIK

Slika 1: Trak recomLine Toxoplasma IgG, IgM, IgA	1
Slika 2: Rezultati specifičnih protiteles IgG proti <i>T. gondii</i> ob različni interpretaciji rezultatov aparata cobas e 411.....	42
Slika 3: Rezultati specifičnih protiteles IgG proti <i>T. gondii</i> ob različni interpretaciji rezultatov aparata cobas e 411 v odstotkih.....	43
Slika 4: Primerjava rezultatov testiranj na specifična protitelesa IgM proti <i>T. gondii</i>	44
Slika 5: Rezultati protiteles IgM	46

KAZALO PRILOG

Priloga A:	Seznam vzorcev.....	62
Priloga B:	Navodila za encimski test cobas Toxo IgG ECLIA.....	67
Priloga C:	Navodila za encimski test cobas Toxo IgM ECLIA	72
Priloga D:	Navodila za encimski test Liaison Toxo IgG CLIA.....	77
Priloga E:	Navodila za encimski test Liaison Toxo IgM CLIA.....	80

1 UVOD

Toksoplazmoza je pogosta parazitska zoonoza, ki jo povzroča *Toxoplasma gondii*. Pri imunsko neoslabljenih osebah okužba običajno poteka brez simptomov, redko pa se lahko pokaže kot bolezen, ki navadno prizadene bezgavke. Primarna toksoplazemska okužba v nosečnosti lahko povzroči t.i. kongenitalno toksoplazmozo. Posledice bolezni so hude poškodbe ploda ali celo njegovo smrt. Kongenitalno toksoplazmozo je delno mogoče preprečiti s seznanjanjem žensk o načinu okužbe s tem parazitom in z rutinskim presejalnim testiranjem nosečnic na okužbo s toksoplazmo. Zaradi možnih zelo hudih posledic kongenitalne okužbe je zelo pomembno, da je serološko presejalno testiranje hitro in zanesljivo. V laboratoriju za parazitologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani opravljajo serološko presejalno testiranje na toksoplazmozo za osrednjo Slovenijo. Do nedavna so za testiranje uporabljali metodo indirektno imunofluorescence, ki so jo kasneje zamenjali z encimsko imunsko metodo, to pa nato nadomestili z metodo, ki temelji na principu elektrokemoluminiscence. Na principu kemoluminiscence temelji veliko sistemov, primernih tudi za serološko testiranje pri sumu na različne infekcijske bolezni. Avtomatski diagnostični sistemi oz. aparature se kljub enotni metodologiji oz. principu detekcije med seboj razlikujejo po antigenih, po različnih reagentih, po ergonomiji dela in ceni reagentov. Pred izbiro sistema za presejalno testiranje nosečnic je potrebno primerjalno testirati večje število kliničnih vzorcev in ugotoviti, kakšne so pozitivne, negativne in mejne vrednosti za natančno interpretacijo rezultatov nekega sistema oz. testa, saj imajo lažno pozitivni in lažno negativni rezultati lahko hude posledice za nosečnico in plod, povzročajo pa tudi nepotrebno zaskrbljenost in strah zaradi možnih posledic.

1.1 Namen dela

V diplomski nalogi smo primerjali dve metodi za dokazovanje protiteles IgG in IgM proti *T. gondii*. Obe metodi uporabljajo na različnih oddelkih Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Rezultate serološkega testiranja smo primerjali in ugotovili odstotek ujemanja rezultatov obeh metod. Vzorce z rezultati, ki se

niso ujemali, smo dodatno testirali z metodo imunoblot. Pri pozitivnih vzorcih, v katerih smo hkrati dokazali specifična protitelesa razreda IgG in IgM, smo za potrditev akutne okužbe opravili tudi testiranje avidnosti specifičnih protiteles razreda IgG proti *T. gondii*. Z nalogo smo poskušali ugotoviti, katera metoda je boljša ali slabša za presejalno testiranje na kongenitalno toksoplazmozo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii je parazit iz debla *Apicomplexa*. Spada v red *Coccidia* in razred trosovcev *Sporozoa*. Odkrila sta ga Nicolle in Manceaux leta 1908. Toksoplazma se v naravi pojavlja v vegetativni obliki ali tahizoitu, bradizoitu in sporozoitu v oocisti.

Tahizoit ima obliko polmeseca. Dolg je od 4 do 8 μm in širok od 2 do 4 μm . Sprednji del je koničast, zadnji pa zaobljen. Citoplazma vsebuje organele, ki so normalno prisotni v evkariontih ter apikalni kompleks z značilnimi strukturami (konoid s polarnim obročem, mikroneme, roptriji, podpelikularni tubuli in mikropora na površini telesca). Tahizoit je hitro deleča se znotrajcelična oblika, ki je zmožna vstopiti v katerikoli tip celice. V vmesnih gostiteljih, človeku in živalih, se tahizoit nespolno razmnožuje v različnih tkivih in organih, najpogosteje v bezgavkah, možganih, očeh, skeletnem mišičevju, srcu in pljučih (Logar, 2002).

Bradizoiti predstavljajo na zunanje vplive odporno obliko parazita. Zaradi imunskega odziva gostitelja pride do njihovega tvorjenja kjerkoli v telesu. Razvijejo se iz tahizoitov. Bradizoiti so manjši in tanjši kot tahizoiti ter imajo zelo počasen metabolizem in deljenje. Membrana se jim odebeli in več sto jih tvori tkivno cisto. To je od 5 μm do 100 μm velika okrogla znotrajcelična tvorba. Cisto navadno najdemo v nevronih, astrocitih, mišičnih celicah in celicah očesne mrežnice.

Sporozoit je rezultat spolnega razmnoževanja, ki poteka v epitelnih celicah mačjih prebavil. Morfološko se od ostalih infektivnih oblik parazita ne razlikuje. Nahaja se v oocisti. Vsaka oocista vsebuje dve sporocisti, vsaka sporocista pa štiri sporozoite. Oocisto mačka s fecesom izloči na prosto. V okolju oocista na primerni temperaturi in vlagi v nekaj dneh sporulira. Oocista lahko v tleh preživi tudi več kot eno leto (Logar, 2002).

2.2 Življenjski krog in prenos

T. gondii je zelo razširjen parazit. Najdemo ga po vsem svetu v vseh toplokrvnih živalih. Vmesni gostitelji so lahko tako sesalci kot tudi ptiči. Končni gostitelji so mačke. Posebnost toksoplazme je možnost nepopolnega življenjskega kroga, ki ne vključuje končnega gostitelja. Parazit se lahko prenaša med vmesnimi gostitelji z zaužitjem tkivnih cist v mesu mesojedih ali rastlinojedih živali. Ta prenos, kljub spolnemu razmnoževanju v mački, lahko delno pojasni nizek genetski polimorfizem toksoplazme. To je za organizem, ki se razmnožuje spolno, nenavadno. Izolate toksoplazme razvrščajo v tri genotipe (I, II in III). Človeško toksoplazmozo v Evropi navadno povzroča genotip II.

Človek se lahko okuži na tri različne načine:

- Z zaužitjem oociste. Človek se okuži z zaužitjem slabo opranega in surovega sadja, zelenjave ali s kontaminirano pitno vodo. To je posreden prenos.
- Z zaužitjem tkivne ciste. Do okužbe pride, če človek poje okuženo prekajeno, marinirano ali ne dovolj dobro kuhano meso. Ciste uniči kuhanje pri temperaturi 67°C ali vsaj tri dni dolgo zamrzovanje pri temperaturi, nižji od -12°C. Ciste so lahko vzrok za prenos okužbe in nastanek bolezni po presaditvi organov, kadar ima darovalec organa specifična protitelesa proti toksoplazmi in prejemnik, ki takih protiteles nima. Do takih prenosov je največkrat prihajalo pri presaditvah srca.
- Okužba s tahizoiti. Tahizoiti so zelo občutljivi, zato jih zunanje okolje in želodčni sokovi zlahka uničijo. Odgovorni so za okužbo posteljice ter za t.i. kongenitalno toksoplazmozo. Odgovorni so tudi za redke primere okužbe s transfuzijo krvi in za okužbe v laboratorijih (Logar, 2002).

2.3 Klinična slika

2.3.1 Pridobljena toksoplazmoza

Pridobljena toksoplazmoza pri zdravih ljudeh v več kot 80 % primerov poteka brez jasnih kliničnih znakov in simptomov zato okužbo običajno lahko dokažemo le pri klinično izraženi bolezni. Inkubacijska doba traja od 7 do 21 dni (Logar, 2002).

Pri majhnem odstotku okuženih se pojavijo znaki bolezni, kot so povečane bezgavke, vročina, nočno potenje, glavobol in huda utrujenost. Bezgavke so običajno prizadete enostransko, največkrat na vratu. Lahko je prizadeta katerakoli bezgavka. Okužene bezgavke v premeru le redko merijo več kot 3 centimetre. So neboleče, trde in se ne gnojijo. Po telesu in udih se redko pojavi makulopapulozni izpuščaj. Lahko se pojavi tudi enostranski horioretinitis. Vročina lahko traja nekaj dni do nekaj tednov, utrujenost pa tudi več mesecev. Bolezen je benigna. Vsi simptomi ponavadi izginejo spontano, brez zdravljenja. Zelo redko so prizadeti srce (miokarditis), pljuča (pneumonitis) ali osrednje živčevje (encefalitis). Raziskovalci predvidevajo, da je okužba s *T. gondii* vzrok za klinično pomembno povečanje bezgavk v 3-7 %. Zdravniki povečane bezgavke pogosto pripešajo okužbi z virusom Epstein Barr ali citomegalovirusom, lahko pa jih pripišejo nastanku maligne bolezni (npr. Hodgkinovo bolezen, limfom ali zasevkom malignih tumorjev). Diagnozo postavimo s serološkimi testi. Zdravniki redko pomislijo na pridobljeno akutno toksoplazmozo. (Mandell in sod., 2005)

Poročajo tudi o resnejši obliki pridobljene toksoplazmoze, ki ponavadi prizadene oči ali možgane. V nekaj primerih se je celo končala s smrtjo. V vseh teh primerih, ko so preučevali genotip parazita, se je pokazala večja pogostnost genotipa I. (Sibley in sod., 2005)

2.3.2 Toksoplazmoza pri imunsko oslabljenih

To je resna in pogosto usodna bolezen, če bolnika ne zdravimo. Bolezen poteka bliskovito in se pogosto konča smrtno. Razlikujemo lokalizirano in diseminirano obliko bolezni, čeprav v praksi ti dve obliki včasih med seboj težko razlikujemo.

Pri lokalizirani toksoplazmozi so najpogosteje prizadeti možgani. Pojavljajo se encefalitis, meningoencefalitis in druge bolezenske spremembe na možganih (npr. ogojnek). Pogosti so makulopapulozni izpuščaji na koži pa tudi miokarditis in pnevmonitis. Simptomi so vročina, glavobol, zmedenost, krči. Možni so tudi epileptični napadi. Drugi najpogosteje prizadet organ je oko. Pacienti se pritožujejo nad zmanjšano ostrino vida ali pa rdečino oči. Očesna oblika toksoplazmoze lahko vodi v slepoto. Možgani so prizadeti pri 40 %

pacientov, okuženih z virusom HIV. Pljučna toksoplazmoza se kaže kot vročična pljučnica, ki jo spremlja astma. Do pravilne diagnoze pridemo s preiskavo bronhiolo-alveolarnega materiala. Tahizoit *T. gondii* lahko vstopi v katerikoli tip celic in prizadene različne organe.

Pri diseminirani toksoplazmozi so prizadeti različni organi. V večini primerov se okužbo dokaže z identifikacijo parazita z barvanjem, inokulacijo oz. kultiviranjem prizadetega tkiva v živali ali z molekularnimi metodami (Logar, 2002).

2.3.3 Kongenitalna toksoplazmoza

Je posledica okužbe zarodka med nosečnostjo. Poglavitni vzrok je primarna okužba nosečnice. Izjemoma se kongenitalna toksoplazmoza pojavi tudi pri otroku matere s kronično oz. latentno toksoplazmozo. Resnost bolezni je v obratnem vrstnem redu kot tveganje za prenos bolezni. Pogostnost prenosa okužbe je v prvem trimesečju okoli 17 %, v drugem 24 % in v tretjem trimesečju kar 64 % (Logar, 2002). Najhujša oblika bolezni pa nastopi, če pride do okužbe ploda v prvem trimesečju nosečnosti. Obstaja tudi tveganje prenosa okužbe, če se je mati okužila 2 meseca pred spočetjem otroka. Približno toliko časa se paraziti nahajajo v krvi okužene osebe. Vertikalen prenos okužbe skoraj nikoli ni posledica ponovne okužbe. Kongenitalna toksoplazmoza lahko povzroči tudi splav.

Kongenitalna toksoplazmoza se kaže v treh oblikah:

- Resna kongenitalna toksoplazmoza je encefalo-meningo-mielitis, ki ga zdravnik opazi takoj po rojstvu otroka in je običajno posledica okužbe na začetku nosečnosti. Klinični znaki so makrocefalija s hidrocefalijo, možganske poapnitve in očesna toksoplazmoza v obliki horiorretinitisa. Vsi ti znaki so slaba prognoza za novorojenčka. Zaradi sistematičnega testiranja nosečnic na toksoplazmozo se te resne oblike pojavljajo redkeje.
- Novorojenci z latentno kongenitalno toksoplazmozo so ob rojstvu na pogled zdravi in diagnosticirani le z laboratorijskimi testi. Ta oblika predstavlja približno 70 % - 80 % kongenitalne toksoplazmoze. V teh primerih zgodnja terapija prepreči morebitno sekundarno napredovanje v zapoznelo obliko bolezni.

- Zapozneno kongenitalno toksoplazmozo, ki je navadno posledica okužbe v zadnjem trimesečju nosečnosti, diagnosticirajo v času od rojstva otroka do zgodnjega otroštva. Simptomi so zapoznel motorični razvoj, krči ali horioretinitis.

2.4 Laboratorijska diagnostika okužb s *T. gondii*

Klinični znaki okužbe s *T. gondii* so zelo nespecifični. Za spoznavo toksoplazmoze moramo uporabiti primeren diagnostični test in ga ustrezno interpretirati glede na bolnikovo zdravstveno stanje. Laboratorijsko diagnostiko okužbe s *T. gondii* lahko izvedemo z neposrednimi in posrednimi metodami. Med neposredne metode prištevamo izolacijo parazita in histološki prikaz parazita oz. njegovih antigenov. Med posredne metode štejemo serološke teste in pomnoževanje določenega dela genoma (t.j. verižno reakcijo s polimerazo oz. PCR). Druge redkeje uporabljene in manj učinkovite metode so dokazovanje antigena v serumu in telesnih tekočinah, kožni test in antigen-specifična transformacija limfocitov.

2.4.1 Izolacija *T. gondii*

Izolacija *T. gondii* iz krvi ali drugih telesnih tekočin je dokaz akutne okužbe. Parazita izolirajo z cepljenjem človeškega tkiva ali telesne tekočine v tkivne celične kulture ali z cepljenjem tega materiala v miši. V tkivnih celičnih kulturah parazita dokažemo z barvanjem. Prednost tkivnih celičnih kultur pred mišmi je v veliki razširjenosti celičnih kultur (npr. virološki laboratoriji) in hitrejšem pridobivanju rezultatov (v treh do šestih dneh). Cepitev v miši je bolj občutljiva metoda kot cepljenje v tkivne celične kulture.

2.4.2 Histološka diagnoza

Z dokazovanjem tahizoitov v rezinah tkiv ali v razmazu telesnih tekočin lahko tudi postavimo diagnozo akutne okužbe. Pogosto je v rezinah tkiv težko dokazati tahizoite z navadnimi barvanji. Pokazali so, da je imunoperoksidazna tehnika, kjer uporabljajo antiserum proti *T. gondii*, zelo občutljiva in specifična. Z njo so uspešno dokazali prisotnost parazita v centralnem živčnem sistemu bolnikov z AIDS-om.

Imunoperoksidazna metoda je uporabna za nefiksirane kot tudi s formalinom fiksirane in v parafin vložene tkivne rezine. Hitra in tehnično nezahtevna metoda za zaznavanje *T. gondii* je tudi barvanje z barvo Wright-Giemsa. Odkritje tkivnih cist blizu vnetih nekrotičnih razjed potrjuje akutno okužbo ali reaktivacijo latentne okužbe.

2.4.3 Serološki testi

Serološki testi za dokazovanje specifičnih protiteles proti *T. gondii* so pomembne diagnostične metode. Problem pri serološki diagnostiki je ta, da so lahko visoke koncentracije specifičnih protiteles v zdravih ljudeh prisotne več let. Opisali so veliko različnih testov za določanje različnih razredov specifičnih protiteles, ki se pojavljajo po okužbi. Pri seroloških testih velik problem predstavljajo lažno pozitivni ali lažno negativni rezultati. Za razrešitev tega problema potrebujemo kombinacijo več seroloških testov. S kombinacijo testov tudi ugotovimo, ali je bil posameznik okužen nedavno ali v daljni preteklosti.

Skupina dr. Montoye je uporabila več različnih testov za serološki profil *T. gondii* (the *Toxoplasma* Serological Profile ali TSP), s katerim je uspešno ugotovila, kdaj se je oseba okužila. Uporabili so test po Sabin-Feldmanu, dokazovanje specifičnih protiteles razredov IgA, IgM, IgE z encimskoimunskim testom in test aglutinacije. Barvanje po Sabin-Feldmanu temelji na opažanju, da se z alkalnim barvilom metilen modro živi tahizoiti obarvajo modro. Žive tahizoite zmešajo z različnimi razredčinami pacientovega seruma. Mešanice nato eno uro inkubirajo, dodajo barvilo in pregledajo z mikroskopom. Če so v serumu pacienta prisotna protitelesa proti *T. gondii*, ta poškodujejo žive organizme. Poškodovani organizmi ne prevzamejo barve in ostanejo neobarvani. Ker za izvedbo testa potrebujemo žive toksoplazme, je ta test v diagnostiki toksoplazmoze vedno redkejši. Test je zelo občutljiv in specifičen, zato še vedno velja kot referenčna metoda. (Montoya in sod., 2002)

2.4.3.1 Specifična protitelesa IgG

Najpogosteje uporabljani testi za določanje specifičnih protiteles IgG so barvanje po Sabin-Feldmanu, ELISA, IFA in modificirani test direktne aglutinacije. S temi testi protitelesa IgG ponavadi ugotovimo 1-2 tedna po okužbi, vrh dosežejo po 1-2 mesecih in upadejo različno hitro; navadno so prisotna vse življenje. Kadar v testu aglutinacije uporabijo dve različni sestavini (npr. aceton in formalin) za fiksiranje parazitov, je to t.i. diferencialni aglutinacijski test (znan tudi kot AC/HS test). Temelji na tem, da se različni antigenski pripravki razlikujejo po sposobnosti zaznavanja protiteles med akutno ali kronično okužbo. Ta test je torej uporaben za razlikovanje med akutno in kronično okužbo.

Na trgu je tudi precej testov za določanje avidnosti protiteles IgG proti *T. gondii*. Ti testi pomagajo razlikovati med nedavno ali staro okužbo. Znano je, da je afiniteta protiteles IgG za ustrezne antigene takoj po primarni okužbi majhna in da se po nekaj tednih ali mesecih poveča zaradi selekcije limfocitov B. Za določanje avidnosti potrebujemo reagente, ki denaturirajo proteine (npr. urea) in raztopijo kompleks protitelo-antigen. Rezultate testa avidnosti ugotavljamo z razmerjem titracijskih krivulj z ureo obdelanih in neobdelanih vzorcev.

2.4.3.2 Specifična protitelesa IgM

Protitelesa IgM se pojavijo hitreje in tudi upadejo hitreje kot protitelesa IgG. Testi za merjenje teh protiteles so: capture IgM-ELISA, IFA test in aglutinacijski testi. Lažno pozitivne rezultate zaradi revmatoidnega faktorja in antijedrnih protiteles včasih zaznajo v nekaterih IgM-IFA testih, ne pa v taki meri pri testih IgM ELISA. Zaradi nizke specifičnosti testov IgM ELISA lahko pri interpretaciji rezultatov tudi tu pride do napake oz. lažno pozitivnih ali negativnih rezultatov. Večina laboratorijev uporablja teste IgM za ločevanje sveže in stare okužbe. Pri bolnikih z nedavno pridobljeno primarno okužbo s *T. gondii* najprej zaznamo protitelesa IgM. V večini primerov pozitivne vrednosti v nekaj mesecih postanejo negativne. V nekaterih primerih *T. gondii* specifične vrednosti IgM ostanejo pozitivne tudi med kronično okužbo. Včasih zaznamo protitelesa IgM tudi po več letih. Vztrajanje protiteles IgM verjetno ni klinično pomembno. Te paciente je potrebno obravnavati kot kronično okužene osebe.

2.4.3.3 Interpretacija rezultatov seroloških testov

Pri nosečnici s sumom na toksoplazemsko okužbo je nujno ugotoviti čas okužbe. Za presejalno testiranje večinoma uporabljajo serološke teste za specifična protitelesa razredov IgG in IgM. V preteklosti so bili komercialni serološki testi razmeroma slabo zanesljivi zaradi precejšnjega števila lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov. Zato je leta 1997 ameriška FDA (Food and Drug Administration) opozorila laboratorijsko osebje na probleme s specifičnostjo testov za določanje specifičnih protiteles IgG in IgM proti *T. gondii* in objavila smernice (tabela 2.1) za interpretacijo rezultatov testov. (Jones in sod., 2001)

Preglednica 2. 1: Interpretacija rezultatov seroloških testov za določanje specifičnih protiteles IgG in IgM proti *T. gondii* (Jones in sod., 2001)

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

2.4.3.4 Specifična protitelesa IgA

Specifična protitelesa IgA lahko zaznamo v serumu akutno okuženih odraslih oseb ali kongenitalno okuženih dojenčkov. Specifična protitelesa IgA lahko vztrajajo več mesecev ali več kot eno leto. Zaradi tega niso v pomoč pri diagnosticiranju okužbe pri odraslih ljudeh. Ker protitelesa IgA ne prehajajo skozi posteljico, je pozitivna serološka vrednost teh protiteles pri novorojenčkih znak prirojene okužbe. Tudi protitelesa IgM ne prehajajo preko posteljice, toda pojavijo se le pri 50 % okuženih novorojenčkov. Protitelesa IgA so pri okuženih novorojenčkih bolj pogosta (95 %), zato je test IgA bolj zanesljiv kot IgM test in zato zelo koristen pri postavljanju diagnoze pri novorojenčkih.

2.4.3.5 Specifična protitelesa IgE

Specifična protitelesa IgE lahko zaznamo v serumu akutno okuženih odraslih, kongenitalno okuženih dojenčkov in pri otrocih s horioretinitisom kot posledico kongenitalne toksoplazmoze. Ker protitelesa IgE ostanejo v krvi manj časa kot protitelesa IgM in IgA je dokaz teh protiteles koristen pri ugotavljanju nedavne okužbe. (Montoya in sod., 2002)

2.4.3.6 Serološko testiranje z uporabo rekombinantnih antigenov *T. gondii*

Več raziskav je potrdilo, da nam serološko testiranje z uporabo rekombinantnih antigenov lahko pomembno izboljša možnosti za diagnostično opredelitev okužbe s toksoplazmo.

Raziskovalci s Poljske (Myjak in sod., 2004) so rekombinantne antigene parazita *Toxoplasma gondii* SAG1, GRA1 in GRA7 uporabili za zaznavanje specifičnih protiteles IgG proti *T. gondii* pri ljudeh z akutno ali kronično toksoplazmozo. Ugotovili so, da z rekombinantnim proteinom GRA7 zaznajo specifična protitelesa med akutno toksoplazmozo pogosteje kot s proteinoma SAG1 in GRA1.

Kur in sodelavci so preučevali rekombinantni protein MAG1. Z njim so specifična protitelesa IgG proti *T. gondii* zaznali bistveno pogosteje (97,3 %) v akutni kot v kronični

fazi okužbe (7,5 %). Predvidevajo, da bi ta antigen lahko uporabili za ugotavljanje aktivne oz. akutne toksoplazmoze. (Kur in sod, 2007)

Za izboljšanje dokazovanja akutne toksoplazmoze med nosečnostjo so v podjetju Mikrogen razvili in ovrednotili nov test *recomLine Toxoplasma*, ki temelji na metodi imunoblot. (Pfrepper, 2005) Pet rekombinantnih antigenov (ROP1, MAG1, SAG1, GRA7 in GRA8) parazita *Toxoplasma gondii* so klonirali v bakteriji *Escherichia coli*, očistili, nanesli na nitrocelulozno membrano ter membrano razrezali na trakove. V raziskavi so primerjali rezultate 102 serumov 25 nosečnic z akutno toksoplazmozo, dva seruma simptomatskih otrok in 71 serumov oseb s staro toksoplazemsko okužbo. Serume so analizirali na prisotnost specifičnih protiteles razreda IgG, IgM in IgA z rekombinatnim *recomLine* testom in z encimskoimunskim testom.

Pri bolnikih, pri katerih so ugotovili prisotnost specifičnih protiteles IgM proti antigenu ROP1, so ugotovili, da so protitelesa IgM proti ROP1 zaznavna pri večini, ne glede na fazo okužbe. Pri analizi protiteles IgG so ugotovili, da je značilni vzorec reakcije protiteles z rekombinantnimi antigeni na traku pri sveži okužbi bistveno drugačen kot pri preboleli okužbi. Te informacije bi lahko uporabili za razlikovanje med akutno in kronično okužbo. Specifična protitelesa IgG proti antigenom GRA7 in GRA8 so bila značilna pri zelo sveži okužbi. Protitelesa proti SAG1 in MAG1 so se pojavila nekoliko kasneje. Te rezultate so dodatno potrdili s testom avidnosti protiteles IgG. Ugotovili so, da so protitelesa IgG proti zgodaj prepoznanim antigenom dozorela prej kot protitelesa proti poznejšim antigenom. Pri protitelesih IgA niso odkrili nobenih zanesljivih podatkov, ki bi kazali na potek okužbe. (Pfrepper, 2005)

2.4.4 Verižna reakcija s polimerazo - PCR

PCR pomnoževanje za zaznavanje *T. gondii* DNA v telesnih tekočinah in tkivih so uspešno uporabili za diagnosticiranje kongenitalne, očesne, cerebralne in diseminirane toksoplazmoze. Z metodo PCR so močno spremenili način diagnosticiranja kongenitalne toksoplazmoze. Metoda omogoča zgodnje diagnosticiranje, pri čemer niso potrebne nobene invazivne metode, ki bi lahko škodovale zarodku. Metoda PCR je omogočila tudi

zaznavanje *T. gondii* DNA v možganskem tkivu, možganski tekočini, krvi, različnih drugih telesnih tekočinah, bronhoalveolarnem izpirku in pri pacientih z aidsom.

2.5 Epidemiologija

Toksoplazmoza je kozmopolitska parazitoza. Prevalenca (pogostost) se večja s starostjo ljudi in je različna med posameznimi regijami. Odvisna je od podnebja, okoljskih pogojev, prehrabnenih navad in higijene. Na splošno se ljudje bolj zgodaj okužijo v državah v razvoju kot pa v bogatih državah, kjer so higijenski standardi višji. V razvitih deželah Evrope in Severne Amerike je okužba večinoma posledica zaužitja kontaminiranega mesa. V deželah, kjer jedo dobro kuhano meso (Velika Britanija, Skandinavija), je prevalenca nizka, večinoma manj kot 25 %. Številke so nekoliko višje v Franciji in Nemčiji (prevalenca je od 40 – 60 %), kjer imajo ljudje navado jesti prekajeno ali ne dovolj pečeno (krvavo) meso. Prevalenca v Španiji in Italiji je srednje visoka (20 – 50 %). Podobna je tudi v Sloveniji (37 % v letih 1991-94). Regionalne razlike so prisotne in so bile dobro preučene v Franciji. Številke se gibljejo od 38 % v mrzlih hribovski področjih (Jura, Centralni masiv, Alpe) do 68 % na jugu in na vlažnih severo-zahodnih področjih. V Severni Ameriki je prevalenca nižja od 25 %. Izredno nizka prevalenca je v Jugo-vzhodni Aziji in na Japonskem, pod 10 %. V Indiji in na Srednjem Vzhodu je prevalenca 20 do 30 %.

Okužba v tropskih Afriških in Ameriških deželah je večinoma posledica zaužitja toksoplazemskih oocist. Prevalenca je nizka v pokrajinah, kjer je podnebje toplo in suho. Tako podnebje je neugodno za preživetje oocist v tleh. V vlažnih področjih je prevalenca tudi do 80 %.

»Nove« navade prehranjevanja, t.j. zamrzovanje mesa, boljša higijena, uporaba kupljene hrane za živali, pripomorejo k zmanjševanju toksoplazemske prevalence.

2.6 Presejalno testiranje

Presejalno testiranje pri posameznikih, ki so še brez znakov bolezni, temelji na preventivnem zgodnjem odkrivanju predklinične bolezni, rizičnih faktorjev ali genetskih karakteristik, povezanih z boleznijo.

Cilj presejalnega testiranja je prepoznati bolezen dovolj zgodaj, da je možno zgodnje zdravljenje, doseči manjšo obolevnost in smrtnost ter izboljšati kvaliteto življenja. Danes s presejalnim testiranjem ponavadi odkrivamo resne kronične bolezni (npr. rak dojke, rak materničnega vratu), rizične faktorje (npr. visok krvni pritisk) in kongenitalne bolezni (npr. kongenitalna toksoplazmoza). Čeprav presejalno testiranje vodi k zgodnemu diagnosticiranju bolezni, se presejalna testiranja niso vedno pokazala koristna. Odkritje bolezni, ki pri preiskovanem človeku nikoli ne bi povzročila simptomov ali smrti, napačna diagnoza zaradi lažno pozitivnega ali negativnega rezultata in lažni občutek varnosti zaradi lažno negativnega rezultata so glavni škodljivi dejavniki presejalnega testiranja. Zaradi teh razlogov mora imeti presejalni test zelo dobro specifičnost in občutljivost. To velja še posebno za bolezni z nizko incidenco.

Leta 1968 je Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) objavila še vedno uporabne smernice presejalnega testiranja. (Wilson in Jungner, 1968)

Načela presejalnega testiranja:

- Bolezen mora biti pomemben zdravstveni problem.
- Za prepoznano bolezen mora obstajati zdravljenje.
- Za diagnozo in zdravljenje morajo biti na voljo ustrezne ustanove.
- Obstajati mora latentna faza bolezni.
- Na voljo mora biti ustrezen test ali preiskava.
- Test mora biti sprejemljiv za populacijo.
- Naravni potek celotne bolezni je potrebno dobro razumeti.
- Dogovorjeno mora biti, kateri bolniki so primerni za zdravljenje.
- Cena odkrivanja primerov bolezni mora biti uravnotežena s stroški medicinske oskrbe kot celote.
- Odkrivanje primerov bolezni mora biti stalen in ne enkratni projekt.

2.6.1 Presejalno testiranje na *Toxoplasma gondii* v tujini

Okužba s parazitom *Toxoplasma gondii* je pri nosečnici ponavadi neopazna. Povzroči pa lahko resne poškodbe ploda. Kongenitalno toksoplazmozo lahko preprečimo s seznanjanjem nosečnic o načinih okužbe s tem parazitom, o načinih preprečevanja okužbe, s presejalnim testiranjem nosečnic na okužbo in z zdravljenjem tistih nosečnic, pri katerih odkrijemo prvo okužbo s *T. gondii*.

Slovensko presejalno testiranje na okužbo nosečnic s *T. gondii* je tako kot v Avstriji. V Avstriji so uvedli presejalno testiranje na kongenitalno toksoplazmozo leta 1975. Nosečnice pregledujejo zgodaj v nosečnosti in če je rezultat testa negativen, test ponovijo še v drugem in tretjem trimesečju nosečnosti. Ženske zdravijo takoj po odkritju okužbe. Podobno presejalno testiranje so v Franciji uvedli leta 1976. Cilj presejalnega testiranja je zagotoviti preventivne ukrepe pri še neokuženih ženskah in zdravljenje okužbe, pridobljene med nosečnostjo. (Jones in sod, 2001)

2.7 Učinkovitost zdravljenja kongenitalne toksoplazmoze in smiselnost presejalnega testiranja

Presejalno testiranje na kongenitalno toksoplazmozo je smiselno le v primeru, ko ob potrditvi okužbe obstaja učinkovito zdravljenje okužbe. Glede učinka zdravljenja toksoplazmoze si strokovnjaki še vedno niso enotni. Zaradi tega se v različnih državah različno spopadajo s to boleznijo. V nekaterih državah presejalnega testiranja nosečnic ne poznajo, drugje imajo le presejalno testiranje novorojenčkov. V Sloveniji testirajo nosečnice vsake tri mesece. V Franciji testirajo nosečnice vsak mesec. Tudi ob potrditvi okužbe v nosečnosti so v različnih državah razlike v zdravljenju. V večini dežel, npr. v Franciji, pa tudi pri nas, zdravniki takoj po ugotovitvi materine okužbe v prvem trimesečju predpišejo spiramicin. Če s pregledom krvi zarodka ali amniocentezo zaznajo okužbo zarodka, zdravijo še s pirimetaminom in sulfadiazinom ali sulfadoksinom, ki je bolj

učinkovit kot spiramicin. Nasprotno pa v Avstriji ženske v začetku nosečnosti zdravijo s pirimetamin-sulfonamidom.

Dr. Thiebaut s sodelavci (Thiebaut in sod., 2007) se v svojem članku sprašuje o učinkovitosti takega zdravljenja. Naredili so splošen pregled kohortnih študij, ki so temeljile na presejalnem testiranju nosečnic za toksoplazmozo. Podatke o študijah so dobili s podatkovnih baz MEDLINE, EMBASE in PASCAL. Študij, izvedenih pred letom 1985, niso upoštevali, saj takrat še niso diagnosticirali okužbe s pomočjo specifičnih protiteles IgM. Izločili so tudi študije iz obeh Amerik, saj je tam na določenih področjih očesna toksoplazmoza pogostejša in za diagnosticiranje uporabljajo CT slikanje. Uporabili so podatke posameznih pacientov in naredili meta-analizo, da bi ugotovili vpliv zdravljenja v nosečnosti na prenos okužbe na novorojenčka in na znake bolezni do prvega letu starosti otroka. Analize so prilagodili glede na trajanje nosečnosti ob materini serokonverziji. Za čim natančnejšo analizo prenosa okužbe z matere na otroka so potrebovali točne datume testiranja in zdravljenja: datum zadnjega negativnega in prvega pozitivnega testiranja specifičnih protiteles, datum rojstva ali zadnje menstruacije in status okužbe otroka po 11 mesecih od rojstva.

V pregled so vključili 26 kohort, kamor je spadalo 1438 okuženih mater, pri katerih je bila okužba odkrita s presejalnim testiranjem. Z meta-analizo so našli šibke dokaze, da zdravljenje v roku treh tednov po serokonverziji v primerjavi z zdravljenjem po osmih tednih od okužbe zmanjša tveganje za prenos okužbe z matere na otroka. Tip zdravljenja ni bil pomemben. Pri 550 okuženih dojenčkih niso našli nobenih dokazov, da terapija pred rojstvom občutno zmanjša tveganje za razvoj kliničnih znakov bolezni. Otroci, rojeni materam, ki so ji zdravili samo z pirimetamin-sulfonamidom, so imeli nižje tveganje za razvoj kliničnih znakov kot tisti, katerih matere so na začetku zdravili samo s spiramicinom. Z analizo so ugotovili, da nevarnost prehoda okužbe na otroka narašča s trajanjem nosečnosti. Z večjim tveganjem za prenos bolezni pa je hkrati upadalo tveganje za nastanek poškodb možganov. Ni pa upadlo tveganje za nastanek očesnih poškodb. Raziskovalci predvidevajo, da dodatne študije verjetno ne bi bistveno spremenile njihovih ugotovitev. Edino velika, randomizirana klinična študija bi lahko zdravnikom in pacientom

priskrbela trdnejše dokaze o morebitni učinkovitosti predrojstvenega zdravljenja toksoplazmoze.

2.8 Serološko presejalno testiranje na okužbo s *Toxoplasma gondii* v Sloveniji

Neobvezno serološko presejalno testiranje nosečnic za toksoplazmozo je bilo v Sloveniji uvedeno leta 1981 (Logar in sod., 1995). Od maja 1981 do septembra 1994 je bilo na okužbo s toksoplazmo testiranih 20953 nosečnic v Sloveniji. Serološko testiranje so izvedli na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo (IMI) Medicinske fakultete Ljubljana.

Rezultati so pokazali, da 55 % testiranih nosečnic ni imelo protiteles proti toksoplazmi. Za 0,60 % nosečnic so ugotovili, da so se prvič okužile med nosečnostjo. Odstotki okužbe pa so se po 14 letih po prvi preiskavi precej znižali. V zgodnjih osemdesetih letih je bilo seropozitivnih 52 % nosečnic, v začetku devetdesetih pa le še 37 %. V istem obdobju se je delež nosečnic, pri katerih so sumili na primarno okužbo, povečal iz 0,33 % na 0,75 %. Vzrok za nižji odstotek prekuženosti nosečnic je verjetno v izboljšanju osebne higiene v tem obdobju.

Obvezno serološko pregledovanje nosečnic na kongenitalno toksoplazmozo je bilo v Sloveniji uvedeno konec leta 1995. Ta preventivni program je podoben Avstrijskemu.

Od januarja leta 1996 do decembra leta 1999 je na Oddelku za parazitologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani potekala raziskava, ki je zajela 21270 nosečnic s klinik v Ljubljani in okolici (Logar in sod., 2002). Med testiranimi nosečnicami je bilo 7151 (34 %) seropozitivnih in 13987 (66 %) seronegativnih za *T. gondii*. Primarno okužbo s toksoplazmo so zaznali pri 132 (0,62 %) nosečnicah. Sto dojenčkom, rojenim primarno okuženim ženskam, so spremljali zdravstveno stanje. Od tega je bilo 9 dojenčkov okuženih (eden s trajno nizkim IFA titrom 1:256 in 8 z IFA titri od 1:256 do 1:4096 in potrjenimi protitelesi IgM in/ali IgA) in 2 kongenitalno okužena dojenčka (prvi z IFA titrom 1:1024, pozitivnimi protitelesi IgM in IgA, nenormalnim EEG, možganskimi poapnitvami, mikrocefalijo in drugi z IFA titrom 1:16384, pozitivnimi protitelesi IgM in IgA, nenormalnim EEG in epilepsijo). Oba prizadeta dojenčka sta bila

rojena materama, ki sta bili s presejalnimi testi testirani prepozno v nosečnosti in torej nista bili pravočasno zdravljeni. Devetinosemdeset dojenčkov ni bilo okuženih. Štiriindvajset od 89 dojenčkovih serumov je bilo pozitivnih pri prvem pregledu krvi takoj po rojstvu (prisotna so bila protitelesa IgG, IgM ali IgA), verjetno zaradi kontaminacije s krvjo matere. Dodatni pregledi dodatnih vzorcev seruma, zbranih takoj ko je bilo to mogoče, so pokazali upadanje titra IgG in odsotnost protiteles IgM in IgA. Med obdobjem spremljanja zdravstvenega stanja dojenčkov v vzorcih ostalih 65 dojenčkov niso našli za *T. gondii* specifičnih protiteles IgM in IgA. Če so bila prisotna protitelesa IgG, se je njihova količina zmanjševala in postala celo negativna med obdobjem spremljanja. To pomeni, da okužba skoraj ni bila verjetna. Od mater 9 okuženih dojenčkov, ki niso kazali simptomov okužbe, so se 3 matere primarno okužile v prvem, 3 v drugem in 3 v zadnjem trimesečju nosečnosti. Za materi, katerima sta se rodila prizadeta otroka, ni natančnejših podatkov o okužbi. Okužba je bila odkrita pozno v zadnjem trimesečju nosečnosti.

Delež primarnih okužb dovzetnih nosečnic v Sloveniji se je od 0,75 % v obdobju 1991-1994 kljub obveščanju žensk o načinih preprečitve okužbe povečal na 0,94 % v letih 1996-1999. (Logar in sod., 2002) Če ženske, ki so sodelovale v tej študiji, predstavljajo reprezentativen vzorec ženske populacije v Sloveniji, je nacionalna prevalenca primarne okužbe nosečnic s toksoplazmo 0,52-0,73 % in potencialno ogroženih nosečih ženskah 0,78-1,1 %.

V drugi raziskavi so na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani od leta 2000 do konca leta 2005 pri povprečno 6000 serološko pregledanih nosečnicah na leto odkrili od 35 do 57 nosečnic z akutno toksoplazmozo (nizka avidnost) (Logar in sod., 2006). Med temi pa so vsako leto odkrili 6 nosečnic, kjer je zanesljivo prišlo do primarne okužbe med nosečnostjo. Okuženim in zdravljenim nosečnicam so se v tem obdobju na leto rodili povprečno 4 okuženi otroci, pri katerih so dokazali protitelesa IgA in/ali IgM. Od leta 1995, ko je bilo uvedeno obvezno presejalno testiranje, pa do konca leta 2005 se nosečnicam, ki so bile v nosečnosti testirane in zdravljene, ni rodil noben otrok, poškodovan zaradi kongenitalne toksoplazmoze. Dve nosečnici iz leta 1995 in 1996, ki v nosečnosti nista bili serološko pregledani na toksoplazmozo in tudi ne zdravljeni, sta rodili otroka s hudimi možganskimi in očesnimi poškodbami.

Vzorci nosečnic v prvem trimesečju (8.-12. teden nosečnosti) nosečnosti pregledujejo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani in še v sedmih mikrobioloških laboratorijih po vsej Sloveniji. Serume istočasno pregledajo na prisotnost protiteles IgG in IgM proti *T. gondii* (Logar in sod., 2006). Če pri prvem pregledu ugotovijo samo protitelesa IgG brez protiteles IgM, sklepajo da se je nosečnica okužila že pred več kot enim letom. To kaže na staro in za plod nenevarno okužbo. Če pri nosečnici v prvem trimesečju ne dokažejo protiteles IgG in IgM sklepajo, da še ni bila okužena s parazitom. Med nosečnostjo se lahko prvič okuži in je ogrožena. Take nosečnice pregledajo še enkrat v drugem trimesečju (20.-24.teden nosečnosti) in v tretjem (24.-36. teden) trimesečju nosečnosti, da odkrijejo morebitno prvo okužbo v nosečnosti. Po okužbi se protitelesa IgM pojavijo po približno 5 dneh, dosežejo svoj vrh po 1 mesecu, nato padejo in ponavadi izginejo po nekaj mesecih. V nizkih vrednostih so protitelesa IgM navadno prisotna še 6 mesecev, lahko pa tudi 2 leti ali več. Če pri serološkem pregledu poleg protiteles IgG ugotovijo tudi protitelesa IgM, ta kažejo na možno primarno svežo okužbo, lahko pa tudi na več tednov ali mesecev staro okužbo. Da potrdijo ali ovržejo svežo okužbo, tak serum testirajo še s testom avidnosti Toxo IgG (Bouty, Milano, Italija). Vrednosti testa, manjše od 15 %, kažejo na svežo okužbo, do katere je verjetno prišlo v zadnjih treh mesecih. Vrednosti testa avidnosti Toxo IgG od 15 do 25 % kažejo na okužbo, do katere je prišlo v zadnjih 6 mesecih. Vrednosti večje od 25 % pa kažejo na okužbo, do katere je prišlo pred več meseci. Toda pri okuženi osebi so lahko nizke vrednosti testa avidnosti prisotne tudi leto ali več, zato se s tem testom ne da vedno potrditi, ali gre za svežo okužbo v nosečnosti ali za okužbo pred zanositvijo. Da pri nosečnici z akutno toksoplazmozo ugotovijo, ali so paraziti prešli preko placente na plod, z verižno reakcijo s polimerazo pregledajo amnijsko tekočino. S toksoplazmo prvič okužene nosečnice na Ginekološki kliniki v Ljubljani zdravijo v prvem trimesečju s spiramicinom, kasneje v nosečnosti pa s pirimetamin/sulfadiazinom in folno kislino.

Ob rojstvu otroka akutno okužene matere je potreben laboratorijski pregled posteljice ter serološki in klinični pregled novorojenčka. Klinične preglede opravljajo na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja in Očesni kliniki Kliničnega centra Ljubljani. Protitelesa IgM in IgA ne prehajajo skozi posteljico, zato ti serološki testi pri plodu ali

novorojenčku kažejo na prenatalno okužbo. Deset dni po rojstvu svetujejo ponoven pregled novorojenčkove krvi, da izključijo morebitno kontaminacijo novorojenčkove krvi z materino krvjo. Raziskovalci so ugotovili, da so protitelesa IgA pri seroloških preiskavah okuženih plodov ali novorojenčkov, starih manj kot dva meseca, bolj pogosta kot protitelesa IgM. Zato je test IgA v kombinaciji z testom IgM postal zelo pomemben za ugotavljanje kongenitalne toksoplazmoze. Pri novorojenčkih so tudi ugotovili, da protitelesa IgA vztrajajo dalj časa kot protitelesa IgM. Novorojenčke brez protiteles IgM in/ali IgA in IgG v upadanju ni potrebno ne zdraviti ne nadaljnje kontrolirati. Novorojenčke z zanesljivo okužbo (s protitelesi IgM in/ali IgA) in z verjetno okužbo (brez protiteles IgM in/ali IgA in z visokimi vrednostmi protiteles IgG) pa je potrebno zdraviti in klinično ter serološko pregledovati enkrat mesečno do 12. meseca starosti, še enkrat v starosti 18 mesecev in nato enkrat letno do otrokovega 15. leta starosti.

2.9 Pogostost akutne toksoplazmoze pri nosečnicah glede na letni čas

Med 22. decembrom 1999 in 21. decembrom 2004 je na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani potekala raziskava o pogostosti akutne toksoplazmoze pri nosečnicah v različnih letnih časih (Logar in sod., 2005). Z encimskim imunskim testom (Toxo-IgG EIA, Toxo-IgM EIA; Cobas-Core, Roche, Mannheim, Nemčija) so pregledali 40081 nosečnic iz osrednje Slovenije. Ker se lahko količina protiteles IgM zmanjša do nizkih ali nezaznavnih koncentracij ali pa ostanejo povišana tudi do 2 leti, je včasih težko določiti natančen čas okužbe s *T. gondii*. Da so razlikovali nedavne okužbe s toksoplazmo od starih, so vse vzorce v katerih so dokazali specifična protitelesa IgG in IgM, ponovno testirali s testom avidnosti Toxo-IgG (Bouty, Milano, Italija). Nizka avidnost (< 15 %), kot smo že omenili, kaže nedavno akutno okužbo s toksoplazmo. Mejni rezultat (15-25 %) kaže na okužbo v zadnjih 6 mesecih in visoka avidnost (> 25 %) izključi okužbo v zadnjih 3 mesecih. Ženske, pri katerih so ugotovili visoko ali mejno avidnost niso vključili v študijo. Slovenija ima raznoliko podnebje. Lahko jo razdelimo na primorski, alpski, centralni in vzhodni del. V študijo so vključili nosečnice iz centralnega kontinentalnega področja (povprečna nadmorska višina okoli 300 m).

Področje ima zmerno sub-alpsko podnebje s toplimi poletji (povprečna temperatura 21°C), letno 1300-1600 mm padavin in mrzle zime (povprečno 0,9°C s snegom). Akutno okužbo s *T. gondii* so pozimi zaznali pri 47 (0,48 %) od 9747 nosečnic, poleti pa pri 26 (0,27 %) od 9806 nosečnic. Akutna toksoplazmoza je bila torej bistveno pogostejša pozimi kot pa poleti. Pogostejša je bila tudi v obdobju zima-pomlad (89 od 19835 nosečnic) kot pa poletje-jesen (64 od 20246 nosečnic). Na incidenco toksoplazmoze lahko vpliva veliko faktorjev, med drugim način upravljanja z domačimi živalmi, higienski standardi pri pripravi hrane, gostota mačk v okolju, geografski položaj glede na nadmorsko višino in prevladujoči tip podnebja. Raziskovalna skupina je predvidevala, da bo manj akutne toksoplazmoze poleti, ko je toplo in suho obdobje in oociste v okolju težje preživijo. Tuje študije so dokazovale nasprotno (Logar in sod., 2005, cit. po Hall in sod., 2001: 58-124). V Sloveniji je poraba mesa približno enaka čez celo leto, zato je višja incidenca akutne okužbe s toksoplazmo v hladnih mesecih verjetno povezana z oocistami *T. gondii*, ki jih izločajo mačke. Mačke se pozimi bolj zadržujejo v toplih stanovanjih in zato je med potencialno okuženimi mačkami in ljudmi več stikov pozimi kot poleti.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 Vzorci

Na Oddelku za parazitologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani izvajajo presejalno testiranje nosečnic na toksoplazmozo. Serume nosečnic pregledujejo na protitelesa IgG in IgM proti parazitu *Toxoplasma gondii* v prvem, drugem in tretjem trimesečju nosečnosti. Pregledujejo tudi serume novorojenčkov, ki so se rodili okuženim materam. Za pregledovanje serumov uporabljajo aparat cobas e 411 proizvajalca Roche.

Za diplomsko nalogo smo v obdobju od septembra 2007 do januarja 2008 zbrali 173 serumov nosečnic. Serume smo izbrali glede na rezultate, ki smo jih pridobili z aparatom cobas e 411. Pri izvedbi diplomske naloge smo se osredotočili na vzorce pacientk z dokazano akutno toksoplazemsko okužbo in na vzorce, kjer so bili rezultati blizu mejnih vrednosti. Domnevali smo, da bi ravno pri takih vzorcih lahko prišlo do napačne opredelitve diagnoze.

Serumi so bili po izvedenem rutinskem testiranju zamrznjeni pri -30 °C.

Stotriinsedemdeset serumov smo pregledali še na protitelesa proti *T. gondii* z aparatom Liaison. Dobljene rezultate smo nato primerjali z rezultati, dobljenimi na aparatu cobas e 411. Od 173 serumskih vzorcev smo imeli na voljo 11 parnih serumov (od dveh pacientk smo imeli na voljo celo tri vzorce). S primerjavo parnih serumov smo poskusili ugotoviti značilno dinamiko spreminjanja koncentracije protiteles in s tem potrditi okužbo. Pri teh vzorcih je mogoča takojšnja in zanesljiva potrditev rezultatov. Ti vzorci so bili še posebno pomembni pri razrešitvi neujemajočih rezultatov na obeh aparatih.

3.2 Metode dela

V okviru izvedbe diplomske naloge smo primerjali dva diagnostična sistema. Z obema aparatoma smo upravljali v skladu z navodili proizvajalca.

3.2.1 Aparat cobas e 411

Aparat **cobas e 411** (Roche, Basel, Švica) omogoča izvajanje imunskih testov, ki temeljijo na elektrokemiluminescenci (vrsta oddajanja svetlobe, ki je posledica elektrokemičnih reakcij v raztopinah). Delovanje aparata je avtomatizirano. Aparat za izvedbo testa kot antigen uporablja specifične rekombinantne proteine *T. gondii*.

Toxo IgG ECLIA - Elektrokemiluminescenčni imunski test (electrochemiluminescence immunoassay) za ugotavljanje protiteles IgG proti *Toxoplasma gondii*.

Princip metode:

Princip sendviča. Trajanje testa: 18 minut.

- Prva inkubacija: 10 µL vzorca, biotinizirani rekombinantni *T. gondii*-specifični antigen in *T. gondii*-specifični rekombinantni antigen, označen z ruteniumovim kompleksom (Tris(2,2'-bipiridil)rutenium(II)-kompleks ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) tvori sendvični kompleks.
- Druga inkubacija: Po dodatku s streptavidinom obloženih mikrodelcev se kompleks veže na trdno fazo zaradi reakcije med biotinom in streptavidinom.
- V merilni celici so mikrodelci iz reakcijske mešanice magnetno ujeti na površino elektrode. Nevezana snov je zatem odstranjena s sistemskim pufrom ProCell. Dodatek električne napetosti elektrodi inducira kemiluminescenčno emisijo, ki jo meri fotopomnoževalnik.
- Rezultati se ugotovijo s primerjavo s kalibracijsko krivuljo, ki je ustvarjena z za inštrument specifično 2-točkovno kalibracijo in t.i. »master« krivuljo, ki je odčitamo preko črtne kode reagenta.

Območje merjenja je od 0,125-650 IU/mL (definirano s spodnjo mejo zaznavanja in z maksimumom krivulje). Vrednosti pod mejo zaznavanja so označene kot < 0,125 IU/mL.

Vrednosti nad področjem merjenja so označeni kot > 650 IU/mL (ali do 13000 IU/mL za 20-krat redčene vzorce).

Vzorce s koncentracijami specifičnih protiteles IgG nad območjem merjenja lahko dodatno redčimo s posebnim pufrom za redčenje vzorcev »Elecsys Diluent Universal«. Priporočljivo redčenje je 1:20 (avtomatično ali ročno). Po ročnem redčenju je potrebno rezultat pomnožiti s faktorjem redčenja. Po avtomatičnem redčenju z aparatom programska oprema samodejno izračuna koncentracijo v vzorcu.

Vrednotenje rezultatov:

Aparat avtomatično izračuna koncentracije vsakega vzorca v IU/mL.

Rezultate, Toxo IgG ECLIA, interpretiramo tako:

Negativno: < 1 IU/mL

Mejno: $\geq 1 - < 3$ IU/mL

Pozitivno: ≥ 3 IU/mL

(IU/ml - mednarodne enote na mililiter).

Po zaključku naše naloge je tovarna Roche k reagentom dodala dodatna navodila za tolmačenje rezultatov za istočasno testiranje serumov na protitelesa Toxo IgG in Toxo IgM.

Negativno oz. nereaktivno: < 1 IU/mL

Mejno: $\geq 1 - < 30$ IU/mL

Pozitivno oz. reaktivno: ≥ 30 IU/mL

Toxo IgM ECLIA - Elektrokemiluminescenčni imunski test (electrochemiluminescence immunoassay) za ugotavljanje protiteles IgM proti *Toxoplasma gondii*.

Princip metode:

Princip testa je » μ -Capture«. Trajanje testa: 18 minut.

- Prva inkubacija: 10 μ L vzorca je avtomatsko razredčeno v razmerju 1:20 s pufrom za redčenje (Elecsys Diluent Universal. Dodan je *T. gondii* specifični rekombinantni

antigen, označen z ruteniumovim kompleksom (Tris(2,2'-bipiridil)rutenium(II)-kompleks ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)

- Anti-Toxo IgM protitelesa, prisotna v vzorcu, reagirajo z z ruteniumom označenim *T. gondii* specifičnim antigenom.
- Druga inkubacija: Dodana so biotinizirana monoklonska h-IgM specifična protitelesa in s streptavidinom prevlečeni mikrodenci. Kompleks se veže na trdno fazo zaradi interakcije med biotinom in streptavidinom.
- V merilni celici so mikrodenci iz reakcijske mešanice zaradi delovanja magnetnih sil ujeti na površino elektrode. Nevezana snov je zatem odstranjena s sistemskim pufrom »ProCell«. Dodatek električne napetosti elektrodi inducira kemiluminescenčno emisijo, ki jo meri fotopomnoževalnik.
- Rezultati so izračunani avtomatično z Elecsys programsko opremo, ki primerja elektrokemiluminescenčni signal reakcijskega produkta vzorca, in signal mejne vrednosti, ki je bila predhodno določena s kalibracijo testa Toxo IgM.

Vrednotenje rezultatov:

Rezultate, Toxo IgM ECLIA, interpretiramo tako:

Negativno: $< 0,8$ COI

Mejno: $\geq 0,8 - < 1$ COI

Pozitivno: $\geq 1,0$ COI

(COI - CutOff Index)

Aparat avtomatično izračuna mejno vrednosti glede na meritve kalibratorjev Cal1 in Cal2.

Rezultat vzorca je podan kot reaktivno, nereaktivno v obliki mejnega indeksa (signal vzorca/mejne kontrole).

3.2.2 Diagnostični sistem LIAISON

Diagnostični sistem **LIAISON** (DiaSorin, Saluggia, Italija) omogoča izvajanje imunskih testov, ki temeljijo na kemiluminiscenci (oddajanje svetlobe zaradi kemične reakcije). Delovanje aparata je popolnoma avtomatizirano. Aparat za izvedbo testa kot antigen uporablja inaktivirane in razbite trofozoite *T. gondii*.

Toxo IgG CLIA - Kemiluminescenčni imunski test (chemiluminescence immunoassay) za ugotavljanje protiteles IgG proti *Toxoplasma gondii*.

Princip metode:

Ta metoda za kvantitativno določanje specifičnih protiteles IgG proti *T. gondii* je indirektni kemiluminiscenčni test (CLIA). Za test se uporabljajo magnetni delci, ki so obdani s *T. gondii* (trdna faza), in mišja monoklonska protitelesa, ki so povezana z derivatom izoluminola (konjugat izoluminol-protitelo). Med prvo inkubacijo se proti *T. gondii* specifična protitelesa, ki so prisotna v kalibratorjih, vzorcih ali kontrolah, vežejo na trdno fazo. Med drugo inkubacijo konjugat izoluminol-protitelo reagira z anti *Toxoplasma gondii* IgG protitelesi, ki so vezana na trdni fazi. Po vsaki inkubaciji je nevezan material odplaknjen s korakom spiranja. Nazadnje so dodani vzpodbujevalni (»starter«) reagenti, ki povzročijo svetlobno kemiluminescenčno reakcijo. Svetlobni signal, katerega jakost je odvisna od količine konjugata izoluminol-protitelo, meri fotopomnoževalnik v relativnih svetlobnih enotah (RLU). Te so sorazmerne s koncentracijo specifičnih *T. gondii* protiteles IgG v kalibratorjih, vzorcih ali kontrolah.

Območje merjenja:

0 do 400 IU/ml *Toxoplasma gondii* IgG.

Vzorci, ki imajo večjo koncentracijo protiteles kot je merilno območje aparata, lahko razredčimo s funkcijo »Dilute« (priporočljivo redčenje je 1:20). Aparat rezultate zatem avtomatično pomnoži s faktorjem redčitve, da lahko določi pravilno vrednost. Količina redčila v integralu omogoča redčitev 18 vzorcev.

Vrednotenje rezultatov:

Aparat avtomatično izračuna koncentracije protiteles IgG parazita *T. gondii* (izražene v IU/mL) in oceni rezultate.

Rezultate, dobljene z Toxo IgG CLIA, interpretiramo tako:

Negativno: < 7,2 IU/mL

Mejno: $\geq 7,2$ - < 8,8 IU/mL

Pozitivno: $\geq 8,8$ IU/mL

(IU/ml - mednarodne enote na mililiter).

Toxo IgM CLIA - Kemiluminescenčni imunski test (chemiluminescence immunoassay) za ugotavljanje protiteles IgM proti *Toxoplasma gondii*.

Princip metode:

Ta metoda za kvantitativno določanje specifičnih protiteles IgM proti *T. gondii* je indirektni capture kemiluminescenčni test (CLIA). V testu se uporabljajo magnetni delci, ki so obdani z protitelesi IgG (mišja, monoklonska), ki se vežejo na človeška protitelesa IgM (trdna faza), in mišja monoklonska protitelesa (vežejo se na *T. gondii*), ki so povezana z derivatom izoluminola (konjugat izoluminol-protitelo). Med prvo inkubacijo se proti *T. gondii* specifična protitelesa IgM, ki so prisotna v kalibratorjih, vzorcih ali kontrolah, vežejo na trdno fazo. Med drugo inkubacijo konjugat izoluminol-protitelo reagira s prej dodanimi *Toxoplasma gondii* antigeni. Ta imunski kompleks reagira s protitelesi IgM, ki so vezana na trdni fazi. Po vsaki inkubaciji je nevezan material spran v fazi spiranja. Zadnji so dodani starterski reagenti, ki povzročijo svetlobno kemiluminescenčno reakcijo. Svetlobni signal, katerega jakost je odvisna od količine konjugata izoluminol-protitelo, meri fotopomnoževalnik v relativnih svetlobnih enotah (RLU). Te so sorazmerne s koncentracijo *T. gondii* protiteles IgM v kalibratorjih, vzorcih ali kontrolah.

Območje merjenja:

0 do 160 AU/ml *Toxoplasma gondii* IgM.

Vzorci, ki imajo večjo koncentracijo protiteles kot je merilno območje aparata lahko razredčimo s funkcijo Dilute (priporočljivo redčenje je 1:20). Rezultate aparat zatem avtomatično pomnoži s faktorjem redčitve in izračuna vrednosti. Količina redčila v integralu omogoča redčitev 15 vzorcev.

Vrednotenje rezultatov:

Aparat avtomatično izračuna koncentracije protiteles IgM parazita *T. gondii* (izražene v AU/mL) in oceni rezultate.

Rezultate Toxo IgM CLIA, interpretiramo tako:

Negativno: < 6 AU/mL

Mejno: ≥ 6 - < 8 AU/mL

Pozitivno: ≥ 8 AU/mL

(AU/ml - absorpcijske enote (absorbance units) na mililiter)

3.3 *recomLine Toxoplasma IgG, IgM*

Za pojasnitev neujemajočih rezultatov aparata cobas e 411 in Liaison smo izvedli še tretjo metodo, imunoblot test *recomLine Toxoplasma IgG in IgM* (Mikrogen, Neuried, Nemčija). Test *recomLine* temelji na uporabi rekombinantnih antigenov za ugotavljanje specifičnih protiteles razredov IgG, IgM in IgA in avidnosti protiteles IgG proti parazitu *Toxoplasma gondii* v človeškem serumu in plazmi.

Za razliko od ELISA testa, zaradi posamično nanesenih antigenov *recomLine Toxoplasma* omogoča zanesljivo identifikacijo specifičnih protiteles proti točno določenim antigenom parazita *Toxoplasma gondii*.

Princip metode

Na nitrocelulozno membrano so nanesen rekombinantni, visoko prečiščeni proteini. Membrano je razrezana na posamične trakove od katerih vsak vsebuje vse antigene.

Za dokazovanje specifičnih protiteles je potrebno trakove inkubirati z redčenim serumom ali plazmo. Med tem se protitelesa vežejo na antigene vezane na testnem traku. Nevezana protitelesa speremo in trakove nato inkubiramo z anti-humanimi IgG, IgM, IgA protitelesi, ki imajo vezano hrenovo peroksidazo. Specifično vezana protitelesa zaznamo zaradi barvne reakcije, ki jo katalizira peroksidaza. Če je potekla reakcija »antigen-protitelo«, se na ustreznem mestu na traku pojavi temno obarvan pas.

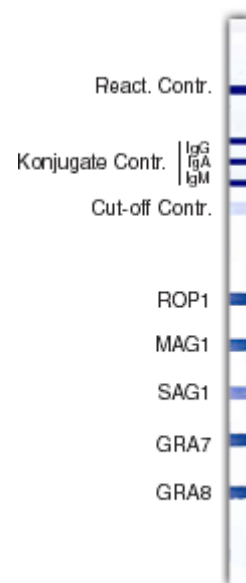
Pet kontrolnih pasov je razporejenih drug ob drugem na zgornjem koncu testnega traku:

- Reakcijski kontrolni pas na traku mora reagirati z vsakim preizkovanim serumom. Je dokaz pravilno izvedene reakcije.
- Trije pasovi za kontrolo konjugata: IgG/IgM/IgA. Ti pasovi služijo za kontrolo razreda protiteles, ki so zaznani pri posameznih primerih. Naprimer, če je trak

namenjen zaznavanju IgG protiteles, mora kontrolni pas za IgG konjugat pokazati očitno barvo.

- Mejna »cutoff« kontrola: Za kontrolo procesa barvanja in za vrednotenje testnega traku. Intenzivnost tega pasu pomeni osnovo za vrednotenje protitelesne reaktivnosti kot pozitivno, mejno ali negativno.

Sledi pet pasov z rekombinantnimi proteini. V tem testu uporabljeni rekombinantni imunodominantni antigeni so prisotni na tahizoitih, ki prevladujejo med infektivnim obdobjem okužbe, kot tudi na bradizoitih ali na obeh oblikah. Na testni trak so antigeni nanešeni v naslednjem vrstnem redu:



Slika 1: Trak recomLine Toxoplasma IgG, IgM, IgA

ROP1: Antigen tahizoita in bradizoita. Značilen je pri odzivu s protitelesi razreda IgM. Protitelesa IgM za ta protein vztrajajo v subakutni fazi. Čas, ko so prisotna protitelesa IgM je ponavadi 6 do 12 mesecev po okužbi, lahko pa tudi do 36 mesecev. Protitelesa razreda IgA usmerjena proti tem antigenu so redka in še ta so zaznavna le v akutni fazi (to je prvih 6 mesecih od okužbe.). Protitelesa IgG z nizko avidnostjo so pogosta v latentni fazi, kjer ni več zaznati specifičnih protiteles IgA in IgM, ampak le še protitelesa IgG. Če je od okužbe minilo že dalj časa, specifična IgG protitelesa za ta antigen niso več zaznavna.

MAG1: Antigen bradizoita. Ponavadi na ta antigen ni odziva protiteles razreda IgA in IgM. Protiteles IgG za ta antigen (nizka avidnost) ni na začetku faze I (prvi trije meseci okužbe).

rSAG1: Antigen tahizoita. Občasno nespecifični odziv protiteles IgM. Protiteles razreda IgG z nizko avidnostjo za ta protein ne moremo zaznati do faze II (3. do 6. mesec okužbe.). V latentni fazi ni specifičnih protiteles IgG z nizko avidnostjo. Protitelesa IgG usmerjena proti antigenu rSAG1 običajno lahko dokažemo vse življenje.

GRA7: Antigen tahizoita in bradizoita. Redko zaznamo odziv protiteles IgM, tudi takrat le v akutni fazi. Protitelesa IgG z nizko avidnostjo so prisotna že v zgodnji fazi I. Do

konca faze I se tem protitelesom zviša avidnost. Protitelesa IgG usmerjena proti antigenu GRA7 običajno lahko dokažemo vse življenje.

GRA8: Antigen tahizoita in bradizoita. S tem antigenom običajno reagirajo specifična protitelesa IgM v akutni fazi. V subakutni fazi ta protitelesa upadajo. Protitelesa IgG z nizko avidnostjo so običajno prisotna že v zgodnji akutni fazi, pogosto pa tudi v subakutni in latentni fazi okužbe. Specifičnih protiteles proti tem antigenu nikoli ne moremo dokazati pri okužbi v daljni preteklosti.

Potek testa

Inkubacija vzorcev

Za vsak vzorec potrebujemo eno banjico na inkubacijskem pladnju. V vsako banjico odpipetiramo 2 mL spiralnega pufra A. Nato v vsako banjico, napolnjeno s spiralnim pufrom A, s plastično pinceto previdno položimo en testni trak. Številka traku mora biti obrnjena navzgor. Pomembno je, da pred dodajanjem vzorcev trak v banjici popolnoma omočimo s spiralnim pufrom.

Zatem odpipetiramo 20 μ L vzorca (človeški serum ali plazma) v ustrezno banjico. Vzorec moramo dodati na en konec banjice in ga nato čimprej premešati z nežnim tresenjem inkubacijskega pladnja. Inkubacijski pladenj zapremo s plastičnim pokrovom in med nežnim tresenjem inkubiramo eno uro.

Spiranje

Po inkubaciji previdno z vsake banjice posesamo razredčene serume. Paziti moramo, da pred vsakim sesanjem serumov zamenjamo nastavek na pipeti ali ga vsaj dobro speremo z destilirano vodo. Na ta način se izognemo navzkrižni kontaminaciji. Zatem v vsako banjico dodamo 2 mL spiralnega pufra A in z nežnim tresenjem spiramo 5 minut. Nato spiralni pufer A posesamo. Postopek ponovimo trikrat.

Inkubacija s peroksidaznim konjugatom

Po spiranju testnih trakov v vsako banjico damo 2 mL po navodilih proizvajalca pripravljene raztopine konjugata. Banjice z nežnim tresenjem inkubiramo 45 minut na sobni temperaturi.

Spiranje

Raztopino konjugata speremo na enak način, kot smo sprali serumsko raztopino.

Reakcija s substratom

1,5 mL raztopine substrata dodamo v vsako banjico in med nežnim tresenjem inkubiramo 5-10 minut. Testni trak opazujemo in takoj ko opazimo pas na mestu mejne kontrole, reakcijo ustavimo.

Ustavitev reakcije

Raztopino substrata posesamo in trakove trikrat na hitro speremo z deionizirano vodo. S plastično pipeto pobereмо trakove iz vode in jih položimo med dve plasti staničevine ter jih sušimo približno dve uri. Za vrednotenje in ocenitev rezultatov, trakove nato prilepimo na bel list papirja. Da ti rezultati ne obledijo, jih je potrebno hraniti v temi.

Vrednotenje jakosti pasov

Testu je priložen list za vodenje podatkov, kot so: datum testiranja, številka lota, razred protiteles in številke vzorcev.

Test lahko ustrezno ovrednotimo, če so izpolnjeni naslednji kriteriji:

- Kontrolni pas reakcije (zgornja črta) je jasne, temne barve
- Razred protiteles (drugi do četrti pas): Ustrezni pas za kontrolo uporabljenega konjugata mora biti značilno obarvan. Ostala dva pasova lahko razvijeta šibko, nespecifično barvo.
- Mejna (»cutoff«) kontrola (peti pas): šibka, toda očitna barva.

Za zanesljivo in enostavno vrednotenje testa uporabljamo način, ki temelji na točkah. Rezultat testa dobimo z dodajanjem točkovnih vrednosti pasovom glede na intenzivnost barve posameznega pasu. Točke pripišemo samo tistim pasovom, ki so toliko obarvani kot pas mejne kontrole ali intenzivnejše. Vsota točk nam pove, ali je rezultat testiranja pozitiven, mejen ali negativen.

Preglednica 3. 1: Točkovno vrednotenje antigenov *T. gondii*, ki ga uporabljamo pri interpretaciji testa imunoblot.

Antigen	Točke pri testu IgG	Točke pri testu IgM
ROP1	1	6
MAG1	2	1
rSAG1	4	0
GRA7	4	2
GRA8	4	4

Preglednica 3. 2: Interpretacija točkovnih vrednosti pri testu imunoblot.

Vsota točk	Vrednotenje
≤ 3	negativno
4 - 5	mejno
≥ 6	pozitivno

3.4 Izračun občutljivosti in specifičnosti testov

Serološke teste smo ovrednotili glede občutljivosti in specifičnosti, izraženi v odstotkih. Občutljivost je sposobnost testa, da za pozitiven vzorec poda pozitiven rezultat. Specifičnost je sposobnost testa, da za negativni vzorec poda negativni rezultat. Občutljivost in specifičnost smo izračunali na naslednji način:

$$\text{Občutljivost (\%)} = \frac{\text{Resnično pozitivni rezultati}}{\text{Resnično pozitivni rezultati} + \text{Lažno negativni rezultati}} \times 100 \%$$

$$\text{Specifičnost (\%)} = \frac{\text{Resnično negativni rezultati}}{\text{Resnično negativni rezultati} + \text{Lažno pozitivni rezultati}} \times 100 \%$$

4 REZULTATI

V diplomski nalogi smo na okužbo s *T. gondii* pregledali 173 serumov nosečnic. Osredotočili smo se predvsem na serume nosečnic z akutno toksoplazmozo in na serume nosečnic, pri katerih so bile predhodno ugotovljene mejne vrednosti. Vse vzorce smo testirali z dvema diagnostičnima sistemoma cobas e 411 in Liaison. Pri vseh vzorcih smo ugotavljali specifična toksoplazemska protitelesa IgG in IgM.

Rezultati testiranj so prikazani v tabeli 4.1.

Preglednica 4. 1: Primerjava števila in delež pozitivnih, negativnih in mejnih rezultatov pri dokazovanju specifičnih protiteles proti *T. gondii* razredov IgG in IgM s cobas e 411 in sistemom Liaison.

	Število (%) serumov							
	IgG				IgM			
	Pozitivno	Negativno	Mejno	Skupaj	Pozitivni	Negativni	Mejni	Skupaj
Sistem cobas e 411	141 (81,5)	32 (18,5)	0 (0,0)	173 (100)	64 (37,0)	96 (55,5)	13 (7,5)	173 (100)
Sistem LIAISON	121 (70,0)	49 (28,3)	3 (1,7)	173 (100)	33 (19,1)	126 (72,8)	14 (8,1)	173 (100)

Pri testiranju na specifična protitelesa IgG s sistemom cobas e 411 smo z navodili za tolmačenje rezultatov ugotovili 141 pozitivnih in 32 negativnih vzorcev. S sistemom Liaison pa smo ugotovili 121 pozitivnih in 49 negativnih serumov. Pri testiranju s sistemom cobas e 411 smo dokazali 20 pozitivnih vzorcev več oz. 11,5 % serumov.

Še večjo razliko smo ugotovili pri testiranju na specifična protitelesa IgM. S sistemom cobas e 411 smo ugotovili 64 pozitivnih in 96 negativnih rezultatov, s sistemom Liaison pa 33 pozitivnih in 126 negativnih serumov. S sistemom cobas e 411 smo dokazali dvakrat toliko pozitivnih rezultatov IgM kot z diagnostičnim sistemom Liaison. Razlika je bila 31 oz. 17,9 % od vseh pregledanih serumov.

S primerjavo rezultatov (Tabela 4. 2.) obeh metod smo ugotovili, da so se rezultati meritev protiteles IgG proti *T. gondii* ujemali v 88,4 %, rezultati protiteles IgM pa le v 64,2 %.

Preglednica 4. 2.: Ujemanje rezultatov pri dokazovanju specifičnih protiteles IgG in IgM proti *T. gondii*.

Test	Število vzorcev (% od vseh)				Število (%) ujemajočih rezultatov
	Testirano z obema metodama	Negativno z obema metodama	Pozitivno z obema metodama	Mejno z obema metodama	
<i>T. gondii</i> IgG	173 (100)	32 (18,5)	121 (69,9)	0	153 (88,4)
<i>T. gondii</i> IgM	173 (100)	85 (49,1)	25 (13,9)	2 (1,2)	112 (64,7)

4.1 Protitelesa IgG proti *Toxoplasma gondii*

Rezultati metode Liaison in cobas e-411 za dokazovanje specifičnih IgG protiteles v tabeli 4. 3.

Preglednica 4. 3: Primerjava rezultatov testiranj na specifična protitelesa IgG proti *T. gondii*.

IgG		cobas IgG		Skupna vsota
		-	+	
Liaison IgG	-	32	17	49
	+	0	121	121
	+/-	0	3	3
Skupna vsota		32	141	173

Skladne rezultate na obeh aparaturnah smo dokazali pri 121 pozitivnih vzorcih (69,9 %) in 32 negativnih vzorcih (18,5 %). Rezultati so se skupno ujemali pri 153 preiskovanih vzorcih (88,4 %).

Rezultati testiranj na specifična protitelesa razreda IgG, usmerjena proti *T. gondii*, se niso ujemali pri 20 vzorcih (11,6 %). Pri 3 vzorcih smo s sistemom cobas e 411 ugotovili pozitiven rezultat, z diagnostičnim sistemom Liaison pa mejni rezultat. Te vzorce smo izključili iz nadaljnje analize.

Sedemnajst vzorcev (9,8 % vseh), pri katerih smo s testom cobas IgG določili pozitiven rezultat, s testom Liaison IgG pa negativen rezultat, smo pregledali s tretjo, potrditveno metodo imunoblot *recomLine* Toxoplasma IgG proizvajalca Mikrogen. Metoda je zelo zanesljiva in specifična, zato smo rezultate upoštevali za pojasnitev rezultatov, ki se medsebojno niso ujemali. S testom imunoblot smo testirali 15 vzorcev. Dva seruma od 17 sta bila namreč parna vzorca istih bolnikov, zato smo testirali samo drugi vzorec od vsakega para.

Preglednica 4. 4: Rezultati testiranj vzorcev z neujemajočimi rezultati pri testiranju specifičnih protiteles IgG s tremi različnimi metodami.

IgG	cobas IgG	Liaison IgG	Mikrogen IgG
+	15	0	0
+/-	0	0	2
-	0	15	13

Z imunoblot *recomLine* IgG smo med preiskovanimi vzorci določili 13 negativnih rezultatov in dve mejni vrednosti. Iz rezultatov sklepamo, da smo s testom imunoblot potrdili rezultate Liaison Toxo IgG testa v 13 primerih. Glede na te rezultate ocenjujemo, da je v 13 primerih cobas IgG Toxo ECLIA določil lažno pozitiven rezultat. Dva vzorca sta ostala nerazjasnjena, saj smo tudi s testom imunoblot dokazali mejen rezultat, ki ga ne moremo interpretirati kot potrditev.

Glede na rezultate *recomLine* IgG testa je bil Cobas Toxo IgG ECLIA test od 173 vzorcev pravilen pri 153 vzorcih (88,4 %), lažno pozitiven pa pri 15 vzorcih (8,7 %).

Liaison Toxo IgG CLIA test je bil od 173 vzorcev pravilen pri 168 vzorcih (97,1 %).

Nejasnih je ostalo 5 vzorcev (2,9 %). Dva vzorca sta imela mejen rezultat s testom *recomLine*. Trije vzorci so bili mejni z aparatom Liaison. Teh vzorcev nismo dodatno testirali in jih v evalvaciji nimo upoštevali.

4.1.1 Občutljivost in specifičnost metod za določevanje protiteles IgG

Iz rezultatov smo izračunali občutljivost in specifičnost testov.

$$\text{Občutljivost (\%)} \quad (\text{cobas e 411}) = \frac{121}{121 + 0} \times 100 \% = 100 \%$$

$$\text{Občutljivost (\%)} \quad (\text{Liaison}) = \frac{121}{121 + 0} \times 100 \% = 100 \%$$

Ker pri nobenem aparatu nismo dobili lažno negativnih rezultatov, je bila občutljivost pri obeh aparatih enaka 100 %.

$$\text{Specifičnost (\%)} \quad (\text{cobas e 411}) = \frac{32}{32 + 15} \times 100 \% = 68,1 \%$$

$$\text{Specifičnost (\%)} \quad (\text{Liaison}) = \frac{47}{47 + 0} \times 100 \% = 100 \%$$

Aparat cobas e 411 je imel 32 pravilno negativnih in 15 lažno pozitivnih rezultatov, zato je imel specifičnost 68,1 %. Pri diagnostičnem sistemu Liaison nismo dobili nobenega lažno pozitivnega rezultata, zato je bila specifičnost aparata za ta test 100 %.

Če pa smo rezultate protiteles IgG cobas e 411 ovrednotili po naknadno dodanih navodilih, smo dobili sledeče rezultate:

4.2 Protitelesa IgG proti *Toxoplasma gondii*; rezultati Toxo IgG ECLIA vrednoteni z dodatnimi navodili tovarne Roche

Po zaključku naše naloge je tovarna Roche k reagentom dodala dodatna navodila za tolmačenje rezultatov za istočasno testiranje serumov na protitelesa Toxo IgG in Toxo IgM. Po teh navodilih smo rezultate Toxo IgG ECLIA interpretirali tako:

Negativno: < 1 IU/mL

Mejno: $\geq 1 - < 30$ IU/mL

Pozitivno: ≥ 30 IU/mL

Za podrobnejšo primerjavo obeh metod rezultate za dokazovanje specifičnih protiteles IgG prikazujemo v tabeli 4.5.

Preglednica 4. 5: Primerjava rezultatov testiranj na specifična protitelesa IgG proti *T. gondii*.

IgG		cobas IgG			Skupna vsota
		-	+	+/-	
Liaison IgG	-	32	4	13	49
	+	0	114	7	121
	+/-	0	2	1	3
Skupna vsota		32	120	21	173

Skladne rezultate na obeh aparataturah smo dokazali pri 114 pozitivnih vzorcih (65,9 %), 32 negativnih vzorcih (18,5 %) in pri enem (0,6 %) mejnem vzorcu. Rezultati so se skupno ujemali pri 147 preiskovanih vzorcih (85,0 %).

Rezultati testiranj na specifična protitelesa razreda IgG, usmerjena proti *T. gondii*, se niso ujemali pri 26 vzorcih (15,0 %).

Pri 22 (12,7 %) vzorcih smo enem aparatu dobili mejen rezultat. Pri 2 vzorcih smo s sistemom cobas e 411 ugotovili pozitiven rezultat, z diagnostičnim sistemom Liaison pa mejni rezultat. Pri 13 vzorcih smo s sistemom cobas e 411 ugotovili mejen rezultat, z diagnostičnim sistemom Liaison pa negativen rezultat. Pri 7 vzorcih smo s sistemom cobas e 411 ugotovili mejen rezultat, z diagnostičnim sistemom Liaison pa pozitiven rezultat. Vseh 22 mejnih vzorcev smo izključili iz nadaljnje analize.

Štiri vzorce (2,3 % vseh), pri katerih smo s testom cobas IgG določili pozitiven rezultat, s testom Liaison IgG pa negativen rezultat, smo pregledali s tretjo, potrditveno metodo imunoblot *recomLine Toxoplasma IgG* proizvajalca Mikrogen. Metoda je zelo zanesljiva in specifična, zato smo rezultate upoštevali za pojasnitev rezultatov, ki se medsebojno niso ujemali.

Preglednica 4. 6: Rezultati testiranja vzorcev z neujemajočimi rezultati pri testiranju specifičnih protiteles IgG proti *T. gondii* s tremi različnimi metodami.

IgG	cobas IgG	Liaison IgG	Mikrogen IgG
+	4	0	0
+/-	0	0	2
-	0	4	2

Z imunoblot *recomLine IgG* smo med preiskovanimi vzorci določili 2 negativna rezultata in dve mejni vrednosti. Iz rezultatov sklepamo, da smo s testom imunoblot potrdili rezultate Liaison Toxo IgG testa v 2 primerih. Glede na te rezultate ocenjujemo, da je v 2 primerih cobas IgG Toxo ECLIA določil lažno pozitiven rezultat. Dva vzorca sta ostala nerazjasnjena, saj smo tudi s testom imunoblot dokazali mejen rezultat, ki ga ne moremo interpretirati kot potrditev.

Glede na rezultate *recomLine IgG* testa je bil Cobas Toxo IgG ECLIA test od 173 vzorcev pravilen pri 147 vzorcih (85,0 %), lažno pozitiven pa pri 2 vzorcih (1,2 %).

Liaison Toxo IgG CLIA test je bil od 173 vzorcev pravilen pri 149 vzorcih (86,1 %).

Nejasnih je ostalo 24 vzorcev (2,9 %). Dva vzorca sta imela mejen rezultat s testom *recomLine*. Dva vzorca sta bila mejna z aparatom *Liaison*, 20 vzorcev pa je bilo mejnih z aparatom *Liaison*. Teh vzorcev nismo dodatno testirali in jih v evaluaciji nimo upoštevali.

4.3 Protitelesa IgG proti *Toxoplasma gondii* ob dvigu pozitivne meje aparata *cobas e 411* na 30 IU/mL

V Laboratoriju za parazitologijo pri nosečnicah, ki jim s presejalnim testom *cobas IgM* ne najdejo specifičnih protiteles IgM proti *T. gondii*, vse rezultate testa *cobas IgG* z vrednostmi pod 30 IU/mL smatrajo za negativne in ne za mejne. Te nosečnice pregledajo še enkrat v drugem in tretjem trimesečju nosečnosti. Sledi še ena predstavitev podatkov s tako postavljenimi mejami na aparatu *cobas e 411*:

Negativno: < 30 IU/mL

Pozitivno: ≥ 30 IU/mL

Ob upoštevanju naknadno dodanih vrednosti in prakse v Laboratoriju za parazitologijo pri *cobas e 411* aparatu smo skladne rezultate obeh aparatov smo dokazali pri 114 pozitivnih vzorcih (65,9 %) in 45 negativnih vzorcih (26,0 %). Rezultati so se skupno ujemali pri 159 preiskovanih vzorcih (91,9 %). (Tabela 4.7)

Preglednica 4. 7: Primerjava rezultatov testiranj na specifična protitelesa IgG proti *T. gondii*.

IgG		cobas IgG		Skupna vsota
		-	+	
Liaison IgG	-	45	4	49
	+	7	114	121
	+/-	1	2	3
Skupna vsota		53	120	173

Rezultati testiranj na specifična protitelesa razreda IgG, usmerjena proti *T. gondii*, se niso ujemali pri 14 vzorcih (8,1 %).

Pri 11 vzorcih (6,4 %) so bili rezultati neujemajoči. Pri 4 vzorcih je dal test cobas IgG pozitiven rezultat, test Liaison IgG negativen rezultat. Pri 7 vzorcih je test cobas IgG dal negativen rezultat, test Liaison IgG pa pozitiven rezultat.

Pri 3 vzorcih smo z aparatom Liaison dobili mejen rezultat. Vzorce z mejnim rezultatom smo izključili iz nadaljnje analize. Pri 2 vzorcih smo s sistemom cobas e 411 ugotovili pozitiven rezultat, z diagnostičnim sistemom Liaison pa mejni rezultat. Pri 1 vzorcu pa smo s sistemom cobas e 411 ugotovili negativen rezultat, z diagnostičnim sistemom Liaison pa mejni rezultat.

Pri aparatu cobas e 411 smo pozitivno mejo prestavili na 30 IU/mL naknadno, po koncu laboratorijskega dela. Zato smo od 11 neujemajočih vzorcev s tretjo metodo, z imunoblot testom *recomLine Toxoplasma IgG* proizvajalca Mikrogen, pregledali le 4 vzorce. Za te vzorce smo kljub dvigu meje dobili pozitivne rezultate z aparatom cobas e 411 in negativne z aparatom Liaison.

Preglednica 4. 8: Rezultati testiranja vzorcev z neujemajočimi rezultati pri testiranju specifičnih protiteles IgG proti *T. gondii* s tremi različnimi metodami.

IgG	cobas IgG	Liaison IgG	Mikrogen IgG
+	4	7	0
+/-	0	0	2
-	7	4	2

Pri teh 4 vzorcih je Mikrogen *recomLine IgG* test pokazal za 2 vzorca negativen rezultat, za 2 vzorca pa mejen rezultat. Mikrogen imunoblot test je cobas Toxo IgG test zavrgel v 2 primerih. Glede na te rezultate je bil v dveh primerih IgG Toxo ECLIA lažno pozitiven. Dva vzorca sta ostala nerazjasnjena, saj je dal imunoblot test mejen rezultat.

Glede na rezultate *recomLine IgG* testa je bil Cobas Toxo IgG ECLIA test od 173 vzorcev pravilen pri 159 vzorcih (91,9 %), lažno pozitiven pa pri 2 vzorcih (1,2 %).

Liaison Toxo IgG CLIA test je bil od 173 vzorcev pravilen pri 161 vzorcih (93,1 %).

Nejasnih je ostalo 12 vzorcev (6,9 %). Dva vzorca sta imela mejen rezultat s testom *recomLine*. Trije vzorci so bili mejni z aparatom *Liaison*. Sedem neujemajočih vzorcev, ki so se pokazali naknadno po dvigu meje, nismo dodatno testirali z Mikrogen *recomLine* IgG testom in jih nismo upoštevali v izračunu občutljivosti in specifičnosti.

4.3.1 Občutljivost in specifičnost metod za določevanje protiteles IgG ob dvigu pozitivne meje aparata *cobas e 411*

Iz rezultatov, ki smo jih dobili ob upoštevanju naknadno dodanih navodil proizvajalca in prakse v Laboratorijo za parazitologijo, smo izračunali občutljivost in specifičnost testov.

$$\text{Občutljivost (\%)} \quad (\text{cobas e 411}) = \frac{114}{114 + 0} \times 100 \% = 100 \%$$

$$\text{Občutljivost (\%)} \quad (\text{Liaison}) = \frac{114}{114 + 0} \times 100 \% = 100 \%$$

Ker pri nobenem aparatu nismo dokazali lažno negativnih rezultatov, je bila občutljivost pri obeh aparatih enaka 100 %.

$$\text{Specifičnost (\%)} \quad (\text{cobas e 411}) = \frac{45}{45 + 2} \times 100 \% = 95,7 \%$$

$$\text{Specifičnost (\%)} \quad (\text{Liaison}) = \frac{34}{34 + 0} \times 100 \% = 100 \%$$

Ker pri nobenem aparatu nismo dokazali lažno negativnih rezultatov, je bila občutljivost pri obeh aparatih enaka 100 %. Aparat *cobas e 411* je imel 45 pravilno negativnih in 2 lažno pozitivna rezultata, zato je imel specifičnost 95,7 %. Pri diagnostičnem sistemu

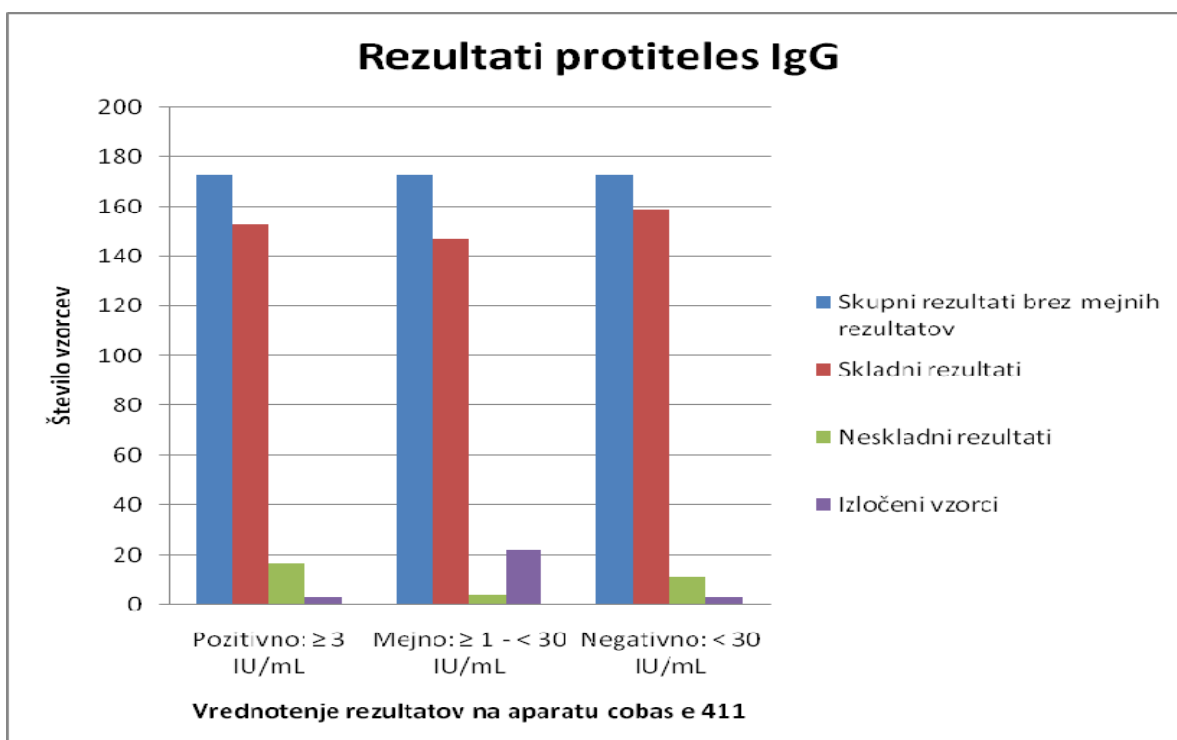
Liaison nismo dokazali nobenega lažno pozitivnega rezultata, zato je bila specifičnost aparata za test Liaison Toxo IgG CLIA 100 %.

Primerjavo metod Liaison in cobas za ugotavljanje protiteles IgG z različnim vrednotenjem rezultatov testa cobas Toxo IgG ECLIA vidimo na tabeli in sliki 1 in 2.

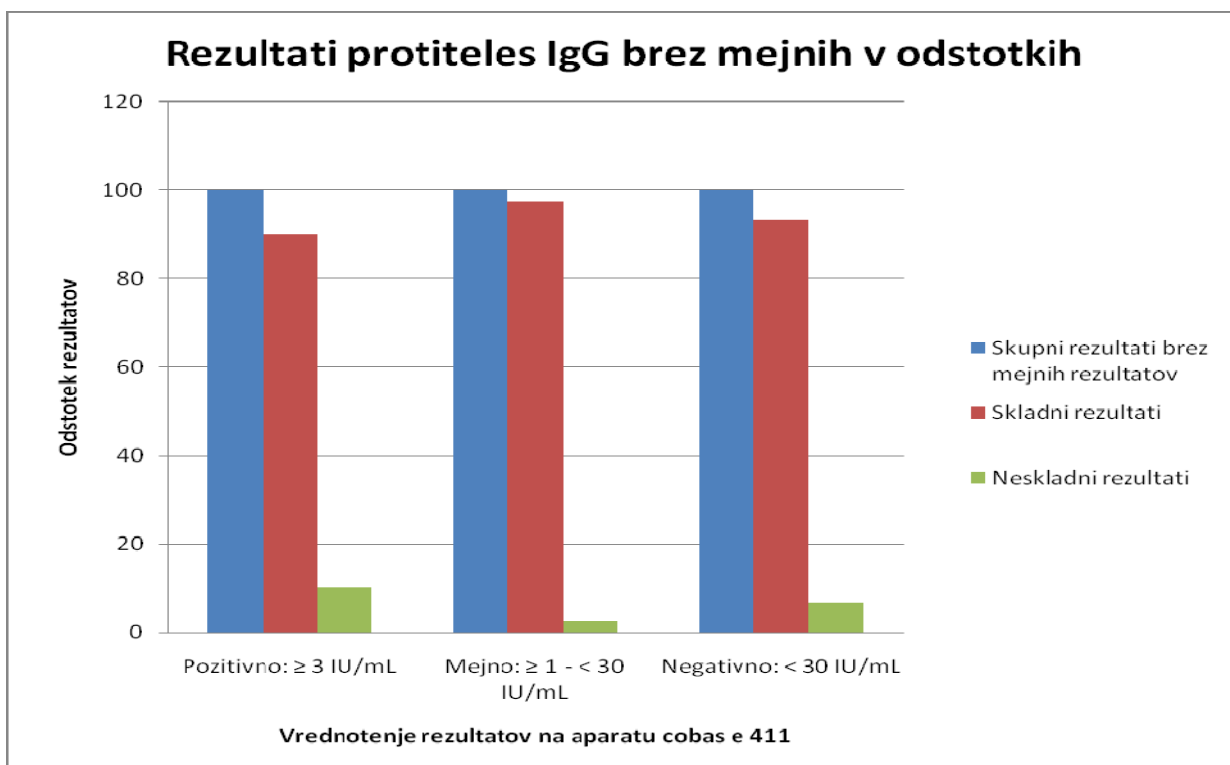
Preglednica 4. 9: Primerjava števila in delež pozitivnih, negativnih in mejnih rezultatov pri dokazovanju specifičnih protiteles IgG proti *T. gondii*.

	Število (%) serumov			
	IgG			
	Pozitivno	Negativno	Mejno	Skupaj
Sistem Liaison	121 (70,0)	49 (28,3)	3 (1,7)	173 (100)
Sistem cobas e 411 (Pozitivno: ≥ 3 IU/mL)	141 (81,5)	32 (18,5)	0 (0,0)	173 (100)
Sistem cobas e 411 (Mejno: $\geq 1 - < 30$ IU/mL)	120 (69,4)	32 (18,5)	21 (12,1)	173 (100)
Sistem cobas e 411 (Negativno: < 30 IU/mL)	120 (69,4)	53 (30,6)	0 (0,0)	173 (100)

Slika 2: Rezultati specifičnih protiteles IgG proti *T. gondii* ob različni interpretaciji rezultatov aparata cobas e 411.



Slika 3: Rezultati specifičnih protiteles IgG proti *T. gondii* ob različni interpretaciji rezultatov aparata cobas e 411 v odstotkih.



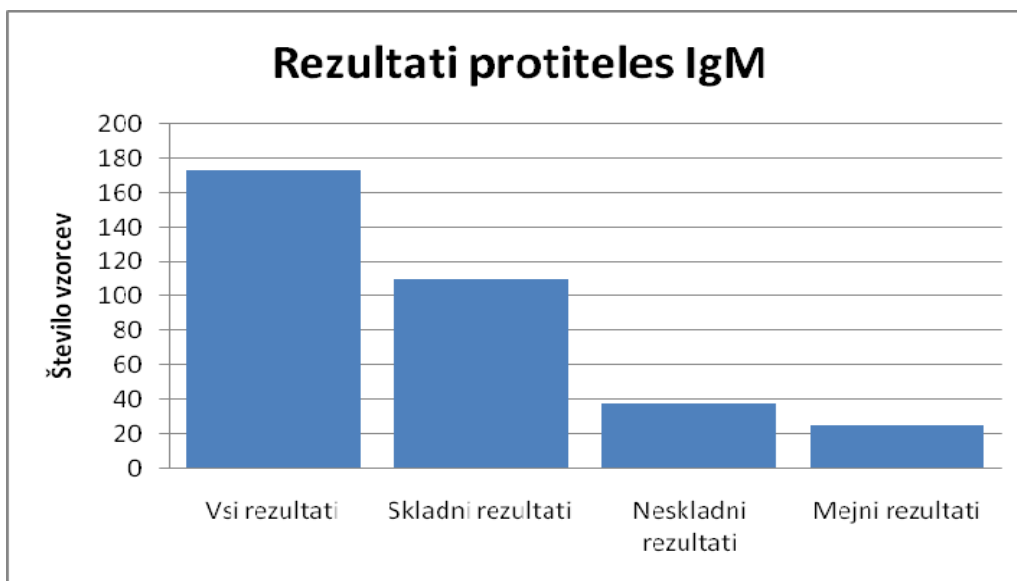
4.4 Protitelesa IgM proti *Toxoplasma gondii*

Za podrobnejšo primerjavo obeh metod smo tudi rezultate dokazovanja specifičnih protiteles IgM primerjalno prikazali v tabeli 4.5 in grafu 4.5.

Preglednica 4. 10: Primerjava rezultatov testiranj na specifična protitelesa IgM proti *T. gondii*.

IgM		cobas IgM			Skupna vsota
		-	+	+/-	
Liaison IgM	-	85	34	7	126
	+	4	25	4	33
	+/-	7	5	2	14
Skupna vsota		96	64	13	173

Slika 4: Primerjava rezultatov testiranj na specifična protitelesa IgM proti *T. gondii*.



Rezultati testiranj na specifična protitelesa razreda IgM so se ujemali le pri 112 vzorcih (64,7 %). Z obema metodama smo ugotovili pozitiven rezultat pri 25 vzorcih (14,5 %), negativen pri 85 vzorcih (49,1 %) in mejnega pri 2 vzorcih (1,2 %).

Rezultati se niso ujemali pri 61 testiranih vzorcih (35,2 %). Od tega je bila pri 25 vzorcih določena mejna vrednost. Vzorce z mejnim rezultatom smo izključili iz analize.

Pri 38 vzorcih (22 %) se rezultati niso ujemali. 34 (19,7 %) je bilo takih, kjer je cobas IgM test pokazal pozitiven rezultat, Liaison IgM test pa negativen rezultat. Štirje vzorci (2,3 %) so bili negativni s testom cobas IgM in pozitivni z diagnostičnim testom Liaison IgM.

Dvanajst vzorcev od 38 neujemajočih smo razjasnili tako, da smo primerjali rezultate, ki smo jih pridobili s testiranjem parnega seruma, ki je bil odvzet vsaj 14 dni po prvem odvzemu. S primerjavo parnih serumov smo poskusili ugotoviti značilno dinamiko spreminjanja koncentracije protiteles in s tem potrditi okužbo. Glede na te rezultate smo ugotovili, da je pri 11 vzorcih cobas IgM lažno pozitiven in pri enem Liaison IgM lažno negativen.

Ostalih 26 vzorcev smo pregledali s tretjo metodo, z imunoblot testom *recomLine Toxoplasma IgM* proizvajalca Mikrogen.

Preglednica 4. 11: Primerjava rezultatov testa cobas IgM proti *T. gondii* z metodo imunoblot.

IgM		cobas IgM		
		-	+	Skupna vsota
Mikrogen IgM	-	3	9	12
	+	1	12	13
	+/-	0	1	1
	Skupna vsota	4	22	26

Preglednica 4. 12: Primerjava rezultatov testa Liaison IgM proti *T. gondii* z metodo imunoblot.

IgM		liaison IgM		
		-	+	Skupna vsota
mikrogen IgM	-	9	3	12
	+	12	1	13
	+/-	1	0	1
	Skupna vsota	22	4	26

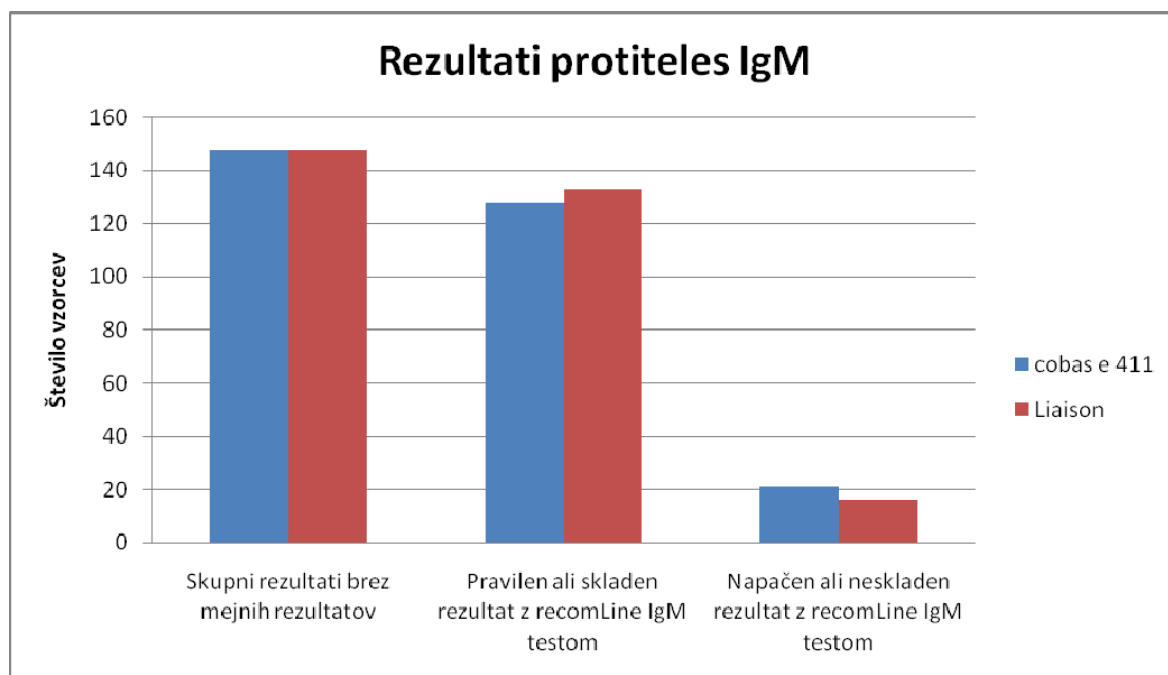
Z imunoblot testom *recomLine* IgM smo določili 13 pozitivnih, 12 negativnih in 1 mejni rezultat pri testiranju na specifična protitelesa IgM.

Imunoblot test je potrdil rezultate cobas IgM test v 15 primerih; 12-krat je bil cobas IgM pravilno pozitiven in 3-krat pravilno negativen. Glede na rezultate testiranja imunoblot IgM ocenjujemo, da so bili rezultati cobas IgM testov 9-krat lažno pozitivni in 1-krat lažno negativni.

Imunoblot test IgM je potrdil Liaison IgM test v 10 primerih; 1-krat je bil Liaison IgM pravilno pozitiven in 9-krat pravilno negativen. Po rezultatih testiranja imunoblot IgM sklepamo, da bil Liaison IgM test trikrat lažno pozitiven in dvanajstkrat lažno negativen.

En vzorec je ostal nerazjasnjen, saj smo z imunoblot testom IgM določili mejni rezultat.

Slika 5: Rezultati specifičnih protiteles IgM proti *T. gondii*



Rezultati testa *recomLine* IgM in pregledi parnih serumov (Slika 3) so pokazali, da je bil Cobas Toxo IgM ECLIA test od skupno 173 vzorcev pravilen ali skladen z *recomLine* IgM testom pri 128 vzorcih (74,0 %), napačen oz. neskladen pa pri 21 vzorcih (12,1 %).

Liaison Toxo IgM CLIA test je bil od 173 vzorcev skladen pri 133 vzorcih (76,9 %), neskladen pri 16 vzorcih (9,2 %).

Nejasnih je ostalo 24 vzorcev (13,9 %). En vzorec je imel mejen rezultat s testom *recomLine*. 23 vzorcev je imelo mejen rezultat s samo enim od uporabljenih testov za določanje specifičnih protiteles IgM. Teh vzorcev nismo dodatno testirali in jih v analizi nismo upoštevali.

4.4.1 Občutljivost in specifičnost metod za določevanje protiteles IgM

Iz rezultatov smo izračunali občutljivost in specifičnost testov.

$$\text{Občutljivost (\%)} \quad (\text{cobas e 411}) = \frac{38}{38 + 1} \times 100 \% = 97,4 \%$$

$$\text{Občutljivost (\%)} \quad (\text{Liaison}) = \frac{25}{25 + 13} \times 100 \% = 65,8 \%$$

Aparat cobas e 411 je imel 38 pravilno pozitivnih in 1 lažno negativnen rezultat, zato je imel občutljivost 97,4 %. Diagnostični sistem Liaison je imel 25 pravilno pozitivnih in 13 lažno negativnih rezultatov, zato je imel občutljivost 65,8 %.

$$\text{Specifičnost (\%)} \quad (\text{cobas e 411}) = \frac{88}{88 + 20} \times 100 \% = 81,5 \%$$

$$\text{Specifičnost (\%)} \quad (\text{Liaison}) = \frac{105}{105 + 3} \times 100 \% = 97,2 \%$$

Aparat cobas e 411 je imel 88 pravilno negativnih in 20 lažno pozitivnih rezultatov, zato je imel specifičnost 81,5 %. Diagnostični sistem Liaison je imel za test Liaison Toxo IgG CLIA 105 pravilno negativnih in 3 lažno pozitivne rezultate, zato je imel specifičnost 97,2 %.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Parazit *Toxoplasma gondii* povzroča pogosto zoonozo toksoplazmozo. Primarna okužba v nosečnosti, t.i. kongenitalna toksoplazmoza, lahko povzroči hude poškodbe ploda ali celo njegovo smrt. Zaradi resnosti bolezni je pomembno učinkovito presejalno testiranje nosečnic.

V diplomski nalogi smo primerjali dva serološka testa ECLIA (electrochemiluminescence immunoassay) oz. CLIA (chemiluminescence immunoassay) za presejalno testiranje na protitelesa proti parazitu *Toxoplasma gondii* dveh različnih proizvajalcev (Roche, Švica in DiaSorin, Italija). Poskušali smo ugotoviti, katera metoda je bolj občutljiva in specifična ter tako najbolj primerna za presejalno testiranje

Metodi sta si precej podobni. Pri obeh metodah so antigeni vezani na magnetne delce, kar omogoča hitre in natančne meritve. Pomembna razlika med sistemoma je pri zadnji svetlobni reakciji. Pri metodi CLIA oddajanje svetlobe povzroči kemijska reakcija, pri ECLIA pa električna napetost. ECLIA torej omogoča nadzor nad trajanjem in lokacijo oddane svetlobe, kar bi lahko pripomoglo k še večji občutljivosti testa. Oba diagnostična sistema sta hitra in enostavna .

V nedavni raziskavi so raziskovalci (Petersen in sod., 2005) ovrednotili diagnostični sistem Liaison italijanskega proizvajalca Diasorin. Ta sistem smo v diplomski nalogi preskusili tudi sami. Študija je potekala v več evropskih referenčnih laboratorijih. Cilj študije je bil ovrednotenje avtomatskih meritev avidnosti protiteles IgG *T. gondii*.

V raziskavi so sodelovali laboratoriji iz Španije, Nemčije, Belgije, Danske, Francije, Italije in Velike Britanije. Skupno so zbrali 1488 vzorcev. Vzorce so analizirali s sistemi Liaison, AXSYM, VIDAS, testom Platelia proizvajalca Bio-Rad, ISAGA testom IgM in z barvanjem po Sabin-Feldmanu.

Barvanje po Sabin-Feldmanu meri oz. ugotavlja celokupna toksoplazemska protitelesa, zato se rezultata tega testa ne da neposredno primerjati z rezultati posameznih IgG in IgM testov, temveč le z rezultati testov, ki ugotavljajo tako IgG in IgM protitelesa. Raziskovalci so predpostavili, da je Sabin-Feldmanov test referenčni standard. Na podlagi te predpostavke so izračunali, da ima Liaison sistem občutljivost 99,3 %, specifičnost 96,8 %, pozitivno napovedno vrednost 98,9 % in negativno napovedno vrednost 98,1 %. Ujemanje med kombiniranimi rezultati IgG in IgM Liaison sistema in z rezultati barvanja po Sabin-Feldmanu je bilo 99 %. To je zelo dobra korelacija in kaže na to, da je sistem Liaison zmožen zaznati nizke koncentracije protiteles IgM na začetku okužbe.

Primerjave rezultatov IgM in IgG protiteles so predstavili v križni tabeli. Ugotovili so ujemanje Liaison testa IgM z ISAGA testom IgM v 96 %, ujemanje z AXSYM IgM in Platelia IgM testom v 95 % ter z VIDAS IgM testom v 97 %. Devet vzorcev je bilo negativnih z Liaison sistemom toda pozitivnih z ISAGA IgM testom. Slednji je torej bolj občutljiv.

Liaison IgG test se je z AXSYM IgG testom ujema v 91 % ter z Platelia IgG in VIDAS IgG testoma v 100 %.

V raziskavi na Nizozemskem (Diepersloot in sod., 2001) so raziskovalci med seboj primerjali dva aparata (AxSYM Abbott in DPC Immulite), s katerima pregledujejo serumske vzorce in ugotavljajo prisotnost različnih mikroorganizmov. Vsebina raziskave je podobna vsebini naše diplomske naloge, kjer smo tudi primerjali rezultate dveh aparatov. S pomočjo obeh aparatov so iskali protitelesa proti *T. gondii*, protitelesa proti virusu rdečk in površinski antigen virusa hepatitis B. Aparat AxSYM (Abbot Laboratories, Abbott Park, ZDA) temelji na tehnologiji encimskih imunskih testov z mikrodelci. Je popolnoma avtomatiziran sistem. Drugi aparat je DPC Immulite (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, ZDA), ki za zaznavanje protiteles ali antigenov uporablja encimsko pomnoženo kemiluminiscenčno kemijo. Neskladne vzorce *T. gondii* so poslali v referenčni laboratorij, kjer so jih za protitelesa IgM, IgG in avidnost testirali z VIDAS sistemom (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija).

Zbrali so serumske vzorce 497 nosečnic in jih analizirali z obema sistemoma. Ugotovili so, da se sistema ujemata od 97,4 % do 100 %. Za *T. gondii* so ugotovili 98 % ujemanje. Za en *T. gondii* IgG vzorec, ki je bil potrjen kot pozitiven, je Immulite sistem pokazal negativno. Pet *T. gondii* IgG vzorcev, ki jih je AxSYM sistem pokazal kot pozitivne in sistem Immulite kot negativne, referenčni laboratorij ni mogel potrditi kot negativne ali pozitivne. Za vse vzorce razen enega, ki so bili pozitivni ali mejni za *T. gondii* protitelesa IgM, so ugotovili, da ne kažejo nedavne okužbe.

V naši raziskavi smo ugotovili, da so se rezultati 153 vzorcev na obeh aparatih ujemali v 88,4 %. Sedemnajst (11,6 %) vzorcev je bilo takih, kjer se rezultati niso ujemali; s sistemom cobas e 411 so bili pozitivni, z aparatom Liaison pa negativni.

Z aparatom cobas e 411 se rezultati z vrednostmi, višjimi ali enakimi 3 IU/mL, štejejo kot pozitivni. Teh 17 vzorcev je imelo z aparatom cobas e 411 vrednosti od 3,9 IU/mL do 50,3 IU/mL. Povprečna vrednost teh vzorcev je bila 19,8 IU/mL. Rezultati 17 serumov diagnostičnega sistema Liaison so bili jasno negativni, slabi dve tretjini vzorcev pa je imelo koncentracije protiteles IgG celo pod spodnjo mejo zaznavanja.

Za pojasnitev neujemajočih vzorcev smo 15 serumov pregledali še s tretjo metodo, imunoblot (*recomLine Toxoplasma IgG* proizvajalca Mikrogen). Zaradi uporabe različnih rekombinantnih antigenov smo s testom dobili natančne informacije o specifičnih protitelesih, ki so povezani z različnimi fazami okužbe s *T. gondii*.

Ta test je v dveh primerih od 17 serumov dal mejen rezultat, v 15 primerih pa negativen rezultat. Vzorca, ki sta bila z imunoblot testom mejna, sta na aparatu cobas e 411 imela pozitivne vrednosti (41 IU/mL in 36 IU/mL). Pri teh dveh vzorcih je tudi aparat Liaison pokazal merljive vrednosti, ki so bile višje od spodnje meje zaznavanja tega aparata a nižje od postavljenih mejnih vrednosti. Pri ostalih vzorcih, testiranih z imunoblot testom, je aparat cobas e 411 očitno pokazal lažno pozitivne rezultate. Ti vzorci so bili popolnoma negativni tako z Liaison diagnostičnim sistemom kot tudi z imunoblot testom.

Pri meritvah protiteles IgG proti *T. gondii* se je diagnostični sistem Liaison odrezal bolje kot aparat cobas e 411. Glede na rezultate imunoblot testa, je bil od vseh pregledanih

serumov Liaison test pravilen kar v 97,1 %. To je za skoraj 9 % boljše od aparata cobas e 411, ki je dal pravilen rezultat v 88,4 %.

Iz rezultatov obeh metod smo izračunali občutljivost in specifičnost testov; 100 % občutljivost za oba testa, 68,1 % specifičnost za cobas e 411 in 100 % specifičnost za Liaison. Do razlik v specifičnosti je morda prišlo, ker smo v nalogo vključili več serumov z nejasnimi vrednostmi (blizu mejnih vrednosti). Pri diagnostičnem sistemu Liaison nismo dobili nobenega lažno pozitivnega rezultata, tako da je bila specifičnost 100 %. To odlično specifičnost tega testa je potrdil tudi Petersen s sodelavci (Petersen in sod., 2004).

Rezultati kažejo, da je imel cobas e 411 zelo nizko postavljeno pozitivno mejo in da je zato večkrat kot sistem Liaison kazal pozitivne rezultate. Proizvajalec aparata predlaga, da se za presejalno testiranje ob istočasnem testiranju na protitelesa IgG in IgM, pozitivna meja za protitelesa IgG dvigne na 30 IU/mL. Ob upoštevanju te dvignjene meje se je cobas e 411 test v primerjavi z imunoblot testom ujemal pri 159 vzorcih oz. v 91,9 %. Le 11 (8,1 %) vzorcev je bilo takih, kjer ni bilo ujemanja. Pri tako postavljeni meji na aparatu cobas e 411 sta se metodi ujemali 3,5 % bolje in toliko manj je bilo tudi neujemajočih vzorcev. Enajst vzorcev je bilo z eno metodo pozitivnih, z drugo pa negativnih. Pri začetno postavljeni pozitivni (3 IU/mL) meji je bilo takih vzorcev 17.

Za pojasnitev neujemajočih vzorcev smo s tretjo metodo, imunoblot testom *recomLine Toxoplasma IgG* proizvajalca Mikrogen, lahko pregledali le 4 vzorce. Test je dal v dveh primerih mejen rezultat, v dveh primerih pa negativen rezultat. Dva vzorca sta ostala nejasna, pri dveh pa je glede na rezultate Mikrogen *recomLine IgG* testa, aparat cobas e 411 pokazal lažno pozitivna rezultata.

Pri pozitivni meji aparata cobas, postavljeni pri 3 IU/mL, je 7 vzorcev na obeh aparatih pokazalo pozitiven rezultat. Ob dvigu pozitivne mejne vrednosti na aparatu cobas e 411 na 30 IU/mL pa so ti vzorci na tem aparatu postali oz. pokazali negativno, ter se niso več ujemali z meritvami aparata Liaison. Možno je, da je, da je ta pozitivna mejna vrednost pretirano dvignjena, tako da so ti vzorci na aparatu cobas e 411 postali lažno negativni.

Pri pozitivni meji na aparatu cobas e 411, postavljeni pri 30 IU/mL, sta se oba aparata odrezala približno enako dobro. Glede na rezultate imunoblot testa je bil aparat Liaison pravilen pri 93,1 % vseh vzorcev, aparat cobas e 411 pa pri v 91,9 % vzorcev.

Ker pri nobenem aparatu nismo dokazali lažno negativnih rezultatov, smo za oba testa ugotovili 100 % občutljivost. Aparat cobas e 411 je imel 45 pravilno negativnih in 2 lažno pozitivna rezultata, zato je imel 95,7 %. Pri diagnostičnem sistemu Liaison nismo dokazali nobenega lažno pozitivnega rezultata, zato je bila specifičnost, ki smo jo ugotovili s tem aparatom, 100 %.

Z dvigom pozitivne meje na aparatu cobas e 411 smo dobili bistvene razlike v specifičnosti tega testa in veliko manj lažno pozitivnih rezultatov.

Protitelesa IgM se pojavijo in upadejo hitreje kot protitelesa IgG. So znak sveže okužbe.

S sistemom cobas e 411 smo ugotovili 31 oz. 17,9 % pozitivnih serumov več in 30 oz. 17,3 % negativnih serumov manj kot z diagnostičnim sistemom Liaison. S cobas e 411 smo dokazali kar dvakrat več pozitivnih IgM rezultatov kot s sistemom Liaison.

S primerjavo rezultatov smo ugotovili, da sta se metodi ujemali pri 112 vzorcih oz. v 64,7 %. To je precej nižje ujemanje kot pri IgG protitelesih. Kar 35,2 % vzorcev je bilo takih, kjer sta aparata pokazala različen rezultat. Popolno neujemanje je predstavljalo 38 vzorcev oz. 22 % vseh vzorcev. 34 vzorcev je bilo takih, ki so bili z aparatom cobas e 411 spoznani kot pozitivni, z aparatom Liaison pa kot negativni. Rezultati aparata cobas e 411 so bili pozitivni, toda vrednosti večinoma niso presegle dvakratne mejne vrednosti. Štirje vzorci so bili taki, ki so bili na aparatu cobas e 411 negativni in z diagnostičnim sistemom Liaison pozitivni. Tudi ti vzorci so kazali nizke pozitivne vrednosti; dve sta bili blizu mejni vrednosti aparata Liaison, dve pa sta bili približno enaki dvakratni mejni vrednosti tega aparata.

Za dokazovanje nedavnih okužb je poleg testiranja na specifična protitelesa IgM možno tudi testiranje avidnosti protiteles IgG. Če je avidnost protiteles IgG nizka to kaže na svežo okužbo. Dokaz specifičnih protiteles IgM in nizke avidnosti protiteles IgG je dovolj za potrditev akutne toksoplazmoze.

Od vzorcev, ki jih je cobas e 411 spoznal kot pozitivne, smo le pri enem ugotovili nizko avidnost protiteles IgG. Pri vseh ostalih je bila avidnost protiteles visoka in sveža okužba ni bila verjetna. Pozitivne rezultate aparata cobas e 411 bi lahko opredelili kot lažno pozitivne ali kot posledico kronične okužbe, ki jo omenjajo nekateri avtorji (Montoya in sod., 2002). Od štirih vzorcev, pozitivnih z diagnostičnim sistemom Liaison, je imel en nizko avidnost. Vzroki za pozitivne rezultate pri ostalih vzorcih bi lahko bili taki kot pri aparatu cobas e 411.

Dvanajst neujemajočih vzorcev smo pojasnili takoj, saj smo imeli parne serume. Glede na primerjavo parnih vzorcev, smo ugotovili v obeh vzorcih enake oz. primerljive vrednosti protiteles IgM in odsotnost protiteles IgG. Glede na stabilne vrednosti protiteles IgM brez pojava protiteles IgG pri drugem testiranju smo lahko izključili akutno okužbo. Glede na ta podatek so bila protiteles IgM ugotovljena s cobas e 411 kar 11-krat lažno pozitivna.

Da bi pojasnili še preostale neujemajoče vzorce, smo preskusili še tretjo metodo, imunoblot test *recomLine Toxoplasma IgM* proizvajalca Mikrogen.

Z imunoblot testom smo dokazali 13 pozitivnih rezultatov, 12 negativnih in en mejen rezultat. Imunoblot test je potrdil cobas IgM test v 15 primerih, Liaison IgM test pa v 10 primerih.

Pri merjenju protiteles IgM proti *T. gondii* sta se oba aparata izkazala približno enako dobro. Cobas test IgM je bil od 173 vzorcev pravilen pri 128 vzorcih oziroma pri 74,0 %, Liaison IgM test pa je bil pravilen pri 133 vzorcih oz. 76,9 %.

Tudi pri testu za odkrivanje protiteles IgM smo izračunali občutljivost in specifičnost. Toda pri teh izračunih so se med aparatoma pokazale večje razlike, kot bi pričakovali glede na podatke v zgornjem odstavku. Aparat cobas e 411 je imel občutljivost IgM testa 97,4 % in specifičnost 81,5 % (veliko višjo, kot pri IgG protitelesih). Za diagnostični sistem Liaison smo dobili 65,8 % občutljivost in 97,2 % specifičnost. Občutljivost je bila precej nizka. Za uporabo v presejalnem testiranju je aparat verjetno dobil kar preveč lažno negativnih rezultatov. Toda specifičnost je bila spet odlična, podobno kot že pri odkrivanju protiteles IgG.

Znano je, da imajo testi za določevanje protiteles IgM ponavadi nizko specifičnost (Montoya in sod., 2002). Zaradi tega v laboratorijih za natančnejšo določitev prve sveže okužbe uporabljajo t.i. parno testiranje serumov in določajo IgG protitelesa avidnosti.

5.2. Sklepi

- V nalogi smo si zadali cilj, da preskusimo in ovrednotimo dve metodi oz. testa (aparata cobas e 411 in Liaison) za ugotavljanje toksoplazemskih protiteles IgG in IgM. Serume, ki se z obema metodama niso ujemali, smo pregledali še s tretjo metodo (imunoblot *recomLine Toxoplasma IgG in IgM*).
- Z obema metodama smo pregledali 173 serumov nosečnic z dokazano akutno toksoplazemsko okužbo in serume, kjer so bili rezultati aparata cobas e 411 blizu mejnih vrednosti.
- Rezultati na specifična protitelesa IgG so se z obema metodama ujemali pri 153 (88,4 %) vzorcih, rezultati na specifična protitelesa IgM pa pri 112 (64,7 %) vzorcih.
- Občutljivost testov na protitelesa IgG je bila pri obeh testih oz. aparatih 100 %. Specifičnost aparata Liaison na protitelesa IgG je bila 100 %, aparata cobas e 411 pa 68,1 %. Za protitelesa IgM smo pri aparatu cobas e 411 ugotovili 97,4 % občutljivost in 81,5 % specifičnost, pri sistemu Liaison pa 65,8 % občutljivost in 97,2 % specifičnost.
- Če smo pri ugotavljanju IgG protiteles na aparatu cobas e 411 po navodilih proizvajalca upoštevali dvignjeno pozitivno vrednost na 30 IU/ml, sta se obe metodi v primerjavi z imunoblot testom ujemali v 93,1 % in 91,9 %.
- Z dodatnim imunoblot testiranjem na protitelesa IgG smo ugotovili, da je dal aparat Liaison od vseh pregledanih vzorcev pravilen rezultat v 97,1 %, aparata cobas e 411

pa v 88,4 %. Cobas IgM test je bil pri 173 pregledanih vzorcih pravilen pri 128 vzorcih (74,0 %), Liaison IgM test pa je bil pravilen pri 133 vzorcih (76,9 %).

- Menimo, da sta obe metodi zaradi dobrega ujemanja in predvsem zaradi visoke občutljivosti na protitelesa IgG in IgM, zanesljivi in primerni za presejalno testiranje na kongenitalno toksoplazmozo.

6 POVZETEK

Toksoplazmoza je pogosta parazitska zoonoza, ki jo povzroča *Toxoplasma gondii*. Pri imunsko neoslabljenih osebah okužba običajno poteka brez simptomov (Logar, 2002). Pri imunsko oslabljenih in pri nosečnicah pa bolezen navadno poteka s simptomi. Primarna toksoplazemska okužba v nosečnosti lahko povzroči t.i. kongenitalno toksoplazmozo. Posledice bolezni so hude poškodbe ploda ali celo njegova smrt. Kongenitalno toksoplazmozo je delno mogoče preprečiti s seznanjanjem žensk o načinu okužbe in s presejalnim testiranjem nosečnic na to okužbo. Presejalno serološko testiranje mora biti hitro in zanesljivo, da lahko nosečnico zdravimo dovolj zgodaj, ter tako preprečimo poškodbe ploda. Vendar si glede učinka zdravljenja toksoplazmoze strokovnjaki še vedno niso enotni (Thiebaut in sod., 2007). Obvezno serološko pregledovanje nosečnic na kongenitalno toksoplazmozo je bilo v Sloveniji uvedeno konec leta 1995 (Logar in sod., 2002). V diplomski nalogi smo primerjali dve metodi (na aparatu Liaison (DiaSorin, Saluggia, Italija) in cobas e 411 (Roche, Basel, Švica)) za dokazovanje protiteles IgG in IgM proti *T. gondii*. Aparat cobas e 411 omogoča izvajanje imunskih testov, ki temeljijo na elektrokemiluminescenci, diagnostični sistem Liaison pa izvajanje imunskih testov, ki temeljijo na kemiluminiscenci. Obe metodi sta v uporabi na različnih oddelkih Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. V obdobju od septembra 2007 do januarja 2008 smo z obema metodama pregledali 173 serumov nosečnic na okužbo s *Toxoplasma gondii*. Osredotočili smo se na vzorce pacientk z dokazano akutno toksoplazemsko okužbo in vzorce, kjer so bili rezultati blizu mejnih vrednosti. Rezultate obeh metod smo primerjali in ugotavljali odstotek ujemanja ali neujemanja testov. Vzorce z rezultati, ki se niso ujemali, smo dodatno testirali z metodo imunoblot *recomLine Toxoplasma IgG in IgM* (Mikrogen, Neuried, Nemčija). Rezultati na specifična protitelesa IgG so se z obema metodama ujemali pri 153 (88,4 %) vzorcih. Z dodatnim imunoblot testiranjem na protitelesa IgG smo ugotovili, da je dal aparat Liaison od vseh pregledanih vzorcev pravilen rezultat v 97,1 %, aparata cobas e 411 pa v 88,4 %. Občutljivost testov na protitelesa IgG je bila pri obeh testih oz. aparatih 100 %. Specifičnost aparata Liaison je bila 100 %, aparata cobas e 411 pa 68,1 %. Pri testiranju protiteles IgM sta se metodi ujemali pri 112 vzorcih oz. v 64,7 %. Cobas IgM test je bil pri 173 pregledanih vzorcih pravilen pri 128 vzorcih (74,0 %), Liaison IgM test pa je bil pravilen pri 133 vzorcih (76,9

%). Glede protiteles IgM, smo pri aparatu cobas e 411 ugotovili 97,4 % občutljivost in 81,5 % specifičnost, pri sistemu Liaison pa 65,8 % občutljivost in 97,2 % specifičnost. Če smo pri ugotavljanju IgG protiteles na aparatu cobas e 411 upoštevali dvignjeno pozitivno vrednost na 30 IU/ml sta se obe metodi (Liaison, cobas e-411) v primerjavi z imunoblot testom ujemali v 93,1 % in 91,9 %. Do podobnih rezultatov so prišli tudi raziskovalci, ki so v vseevropski raziskavi poskusili ovrednotiti diagnostični sistem Liaison (Petersen in sod., 2005). Menimo, da sta obe metodi glede ujemanja in predvsem zaradi visoke občutljivosti na protitelesa IgG in IgM, zanesljivi in primerni za testiranje na kongenitalno toksoplazmozo.

7 VIRI

Diepersloot R. J. A., Dunnewold-Hoekstra H., Kruit-Den Hollander J., Vlaspolder F.. 2001. Antenatal screening for hepatitis B and antibodies to *Toxoplasma gondii* and Rubella Virus: Evaluation of two commercial immunoassay systems. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8, 4: 785-787

Gordis L. 2004. *Epidemiology*. 3rd ed. Philadelphia, Elsevier Saunders: 335 str.

Jones J. L., Lopez A., Wilson M., Schulkin J., Gibbs R. 2001. Congenital toxoplasmosis: A review. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 56, 5:296-305

Kodym P., Machala L., Roháčova H., Širocka M., Maly M. 2007. Evaluation of a commercial IgE ELISA in comparison with IgA and IgM ELISAs, IgG avidity assay and complement fixation for the diagnosis of acute toxoplasmosis. *Clinical Microbiology and Infection*. 13, 1: 40-47

Kur J., Holec L., Hyszczynska-Sawicka E., Gasior A., Brillowska-Dabrowska A. 2006. Use of MAG1 recombinant antigen for diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14, 3: 220-225

Logar J., Novak-Antolič Ž., Zore A. 1995. Serological screening for toxoplasmosis in pregnancy in Slovenia. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 27: 163-164

Logar J. 1999. *Parazitologija v medicini*. 1. izd. Ljubljana, DZS: 64-74

Logar J. 2002. *Protozoologija*. 1. izd. Ljubljana, Študentska založba: 65-75

Logar J., Petrovec M., Novak-Antolič Ž., Premru-Sršen T., Čižman M., Arnež M., Kraut A. 2002. Prevention of congenital toxoplasmosis in Slovenia by serological screening of pregnant women. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 34: 201-204

Logar J., Soba B., Premru-Srsen T., Novak-Antolic Z. 2005. Seasonal variations in acute toxoplasmosis in pregnant women in Slovenia. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 11, 10: 852-855

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

Montoya J. G. 2002. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *Journal of Infectious Diseases*, 185, 1: 73–82

Montoya J. G., Kovacs J. A., Remington J. S. 2005. *Toxoplasma gondii*. V: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Mandell G. L., Douglas R. G., Bennet J. E., Dolin R. (eds.). 6th ed. Philadelphia, MD Consult LLC: 3170-3193

Murray P. R., Rosenthal K. S., Pfaller M. A. 2005. *Medical microbiology*. 5th ed. Philadelphia, Elsevier Mosby: 867-869

Myjak P., Pietkiewicz H., Hiszczyńska-Sawicka E., Kur J., Petersen E., Nielsen H. V., Stankiewicz M., Andrzejewska I. 2004. Usefulness of *Toxoplasma gondii*-specific recombinant antigens in serodiagnosis of human toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 4: 1779-1781

Petersen E., Borobio M. V., Guy E., Liesenfeld O., Meroni V., Naessens A., Spranzi E., Thulliez P. 2005. European multicenter study of the LIAISON automated diagnostic system for determination of *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM and the IgG avidity index. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 4:1570-1574

Pfrepper K. I., Enders G., Gohl M., Krczal D., Hlobil H., Wassenberg D., Soutschek E. 2005. Seroreactivity to and avidity for recombinant antigens in toxoplasmosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12, 8: 977-982

Sibley L. D., Khan A., Su C., German M., Storch G. A., Clifford D. B. 2005. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 12: 5881-5887

Thiebaut R., Leproust S., Chene G., Gilbert R. 2007. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. *Lancet*, 369: 115-122

Wilson J. M. G., Jungner G. 1968. Principles and practice of screening for disease. *WHO Chronicle*, 22, 11: 473-473

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorju prof. dr. Jerneju Logarju, ki me je s svojim spodbudnim in sproščenim pristopom vodil skozi izdelavo diplomske naloge.

Somentorju doc. dr. Miroslavu Petrovcu se zahvaljujem za nasvete in pomoč pri pisanju diplome.

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

Osebjem Laboratorija za parazitologijo in Laboratorija za diagnostiko virusnih infekcij se zahvaljujem za prijaznost in pomoč pri praktičnem delu v obeh laboratorijih.

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

PRILOGE

Priloga A: Seznam vzorcev in rezultatov vzorcev, ki smo jih testirali z metodami cobas Toxo IgG in IgM ECLIA, Liaison Toxo IgG in IgM CLIA in Mikrogen *recomLine* Toxoplasma IgG, IgM na specifična protitelesa proti *T. gondii*.

VZOREC	Št.	cobas IgG	cobas IgG	liaison IgG	liaison IgG	cobas IgM	cobas IgM	liaison IgM	liaison IgM	technogenetics avi	technogenetics avi	mikrogen IgG	mikrogen IgM
8815	1	201	+	45,9	+	8,11	+	16,7	+	15.5%, 15.4%	M		
8943	2	3578	+	> 400	+	8,83	+	18,6	+	26,60%	V		
9008	3	64,68	+	55,1	+	13,28	+	> 160	+	4,33%	N		
9075	4	0,13	-	< 3	-	0,779	-	< 3	-	/			
9103	5	0,13	-	< 3	-	0,934	+/-	< 3	-	/			
9112	6	30,92	+	< 3	-	0,145	-	< 3	-	/		-	
9126	7	193,3	+	26	+	1,54	+	< 3	-	35.8%, 38.5%	V		-
9156	8	460,9	+	86,9	+	1,67	+	10	+	31%	V		
9206	9	329,8	+	34,5	+	0,528	-	< 3	-	/			
9215	10	0,13	-	< 3	-	1,2	+	4,4	-	/			
9323	11	0,13	-	< 3	-	1,54	+	3,8	-	/			+
9369	12	2624	+	350	+	1,13	+	10,7	+	48%	V		
9383	13	0,13	-	< 3	-	1,06	+	< 3	-	/			
9388	14	14,01	+	7,3	+/-	0,149	-	< 3	-	/			
9389	15	13,43	+	< 3	-	0,149	-	< 3	-	/		-	
9390	16	50,31	+	4,3	-	0,156	-	< 3	-	/		-	
9395	17	1532	+	80,3	+	0,16	-	4,3	-	/			
9429	18	984,5	+	314	+	1,73	+	14,5	+	8,90%	N		
9444	19	85,85	+	14,3	+	0,171	-	< 3	-	/			
9469	20	1368	+	63,8	+	0,188	-	< 3	-	/			
9479	21	633,1	+	118	+	0,274	-	7,8	+/-	51,22%	V		
9548	22	73,49	+	9,6	+	1,73	+	< 3	-	37,90%	V		+
9645	23	3511	+	> 400	+	7,91	+	32,2	+	18,90%	M		
8879	24	161,5	+	53,6	+	0,605	-	17,8	+	10,31%	N		-
9513	25	1542	+	108	+	0,256	-	< 3	-	/			
9522	26	1768	+	95,2	+	0,302	-	< 3	-	/			
9540	27	0,13	-	< 3	-	0,973	+/-	< 3	-	/			
9580	28	5,65	+	< 3	-	0,157	-	< 3	-	/		-	
9582	29	147,9	+	77,8	+	1,05	+	14,1	+	5,74%	N		
9604	30	38,26	+	7,9	+/-	0,14	-	< 3	-	/			
9624	31	0,223	-	< 3	-	1,45	+	8,9	+	/			
9625	32	1,14	-	< 3	-	0,431	-	< 3	-	/			
9676	33	0,13	-	< 3	-	0,851	+/-	< 3	-	/			
9692	34	14,93	+	5,6	-	0,222	-	< 3	-	/		-	
9702	35	86,58	+	28,8	+	0,671	-	< 3	-	/			
9727	36	0,13	-	< 3	-	1,23	+	< 3	-	/			
9754	37	2472	+	205	+	0,625	-	4,7	-	/			
9761	38	0,13	-	< 3	-	1,2	+	4,7	-	/			
8985	39	248,7	+	28,8	+	0,526	-	4,2	-	33% 36%	V		
9061	40	216,5	+	56,9	+	1,56	+	4,4	-	92%	V		-

Nadaljevanje priloge A: Seznam vzorcev in rezultatov vzorcev, ki smo jih testirali z metodami cobas Toxo IgG in IgM ECLIA, Liaison Toxo IgG in IgM CLIA in Mikrogen recomLine Toxoplasma IgG, IgM na specifična protitelesa proti *T. gondii*.

VZOREC	Št.	cobas IgG	cobas IgG	liaison IgG	liaison IgG	cobas IgM	cobas IgM	liaison IgM	liaison IgM	technogenetics avi	technogenetics avi	mikrogen IgG	mikrogen IgM
9085	41	3192	+	333	+	0,976	+/-	12,9	+	17,60%	M		
9125	42	0,13	-	< 3	-	1,54	+	< 3	-	/			-
9145	43	287,4	+	23	+	0,929	+/-	5	-	49%	V		
9164	44	569,9	+	49,8	+	1,11	+	6,1	+/-	45%	V		
9543	45	136	+	51,2	+	26	+	116	+	3,70%	N		
9652	46	295,6	+	69	+	1,31	+	5,1	-	33%	V		-
9655	47	474,1	+	47	+	0,87	+/-	< 3	-	50%	V		
9689	48	1417	+	112	+	0,526	-	5,2	-	40%	V		
9770	49	21,62	+	< 3	-	0,152	-	< 3	-	/		-	
9802	50	181	+	18,1	+	1,25	+	5,8	-	32%	V		+
9816	51	94,39	+	8,9	+	0,145	-	< 3	-	/			
9821	52	232,2	+	58,3	+	0,485	-	3,1	-	/			
9825	53	6407	+	> 400	+	0,168	-	< 3	-	51%,49%,45%	V		
9842	54	1242	+	83	+	0,498	-	< 3	-	/			
9849	55	433	+	44	+	0,436	-	< 3	-	/			
9875	56	11,93	+	20,4	+	0,145	-	< 3	-	/			
9878	57	0,147	-	< 3	-	1,16	+	< 3	-	/			+
9899	58	0,135	-	< 3	-	0,69	-	< 3	-	/			
9903	59	3749	+	284	+	0,302	-	< 3	-	73%,47%	V		
9909	60	2904	+	185	+	0,14	-	< 3	-	/			
9917	61	2666	+	264	+	0,252	-	< 3	-	49%			
9918	62	1109	+	260	+	1,87	+	7,2	+/-	/			
9928	63	31,92	+	12,5	+	0,211	-	< 3	-	/			
9954	64	10575	+	> 400	+	0,356	-	5,2	-	/			
9959	65	274,8	+	53	+	4,16	+	9,1	+	17,2%,21,8%	M		
10019	66	1737	+	125	+	0,38	-	< 3	-	/			
10020	67	155,1	+	75,5	+	4,25	+	72,1	+	4,60%	N		
10068	68	0,13	-	< 3	-	1,77	+	< 3	-	/			
10093	69	6993	+	134	+	0,203	-	< 3	-	43%,42%	V		
10125	70	372,3	+	66,3	+	2,06	+	5,7	-	33%	V		+
8606 K	72	55,26	+	11,4	+	0,208	-	< 3	-	/			
8607 K	73	415,5	+	28,3	+	0,183	-	4,3	-	/			
8609 K	74	363,9	+	34,5	+	0,239	-	< 3	-	/			
8610 K	75	1445	+	67,6	+	0,17	-	< 3	-	/			
8612 K	76	166,7	+	68,2	+	8,48	+	31,7	+	6,71%	N		
8613 K	77	125,9	+	20,6	+	0,646	-	< 3	-	/			
8614 K	78	96,45	+	51	+	5,04	+	40,5	+	6,70%	N		
8615 K	79	120,7	+	20,7	+	0,178	-	< 3	-	/			
8983	80	650	+	93,7	+	0,388	-	4,3	-	42%	V		
10139	81	3726	+	> 400	+	1,12	+	14,5	+	67%	V		
10147	82	2905	+	212	+	0,172		< 3	-	/			
10150	83	16,29	+	< 3	-	0,142	-	3,4	-	/			
10157	84	13000	+	> 400	+	0,241	-	4,3	-	78%	V		

Nadaljevanje priloge A: Seznam vzorcev in rezultatov vzorcev, ki smo jih testirali z metodami cobas Toxo IgG in IgM ECLIA, Liaison Toxo IgG in IgM CLIA in Mikrogen recomLine Toxoplasma IgG, IgM na specifična protitelesa proti *T. gondii*.

VZOREC	Št.	cobas IgG	cobas IgG	liaison IgG	liaison IgG	cobas IgM	cobas IgM	liaison IgM	liaison IgM	technogenetics avi	technogenetics avi	mikrogen IgG	mikrogen IgM
10165	85	17,44	+	< 3	-	0,191	-	< 3	-	/		-	
10232	86	1108	+	92,8	+	1,16	+	5,5	-	40,70%	V		+
10270	87	175,7	+	34,6	+	0,724	-	18,2	+	17,53%	M		+
10276	88	505,7	+	103	+	0,607	-	6,4	+/-	29,19%	V		
10281	89	3209	+	< 400	+	0,489	-	7,3	+/-	21,80%	M		
10288	90	13000	+	> 400	+	0,266	-	< 3	-	50,30%	V		
10324	91	109,3	+	46,9	+	0,599	-	8,7	+	37,40%	V		-
10345	92	1,42	-	< 3	-	0,142	-	< 3	-	/			
10351	93	0,13	-	< 3	-	0,759	-	< 3	-	/			
10353	94	18,13	+	3,8	-	0,246	-	< 3	-	/		-	
10388	95	208,3	+	41,5	+	2,43	+	4,8	-	44%	V		-
10395	96	1700	+	330	+	4,17	+	15,9	+	17,86%	M		
10431	97	604,6	+	84,5	+	1,97	+	4,5	-	45%	V		+
10434	98	39,62	+	18,9	+	0,275	-	3,6	-	/			
10442	99	1106	+	316	+	12,28	+	26,1	+	30%	V		
10453	100	57,2	+	55,2	+	0,271	-	3,5	-	/			
10545	101	1323	+	> 400	+	10,16	+	90,2	+	11,30%	N		
10574	102	0,13	-	< 3	-	1,85	+	< 3	-	/			
10599	103	198,7	+	47,6	+	1,25	+	3,3	-	18,50%	M		+
10600	104	1371	+	256	+	21,54	+	13,5	+	56%	V		
10616	105	3907	+	> 400	+	2,09	+	5,3	-	70%	V		+
10593	106	94,42	+	42,5	+	0,256	-	10,3	+	20%	M		-
10639	107	5758	+	> 400	+	0,352	-	6,2	+/-	46%	V		
10636	108	35,77	+	4,9	-	0,173	-	< 3	-	/		+/-	
10672	109	8,24	+	22,5	+	0,986	+/-	9	+	ni rezultata			
10685	110	313,6	+	45,9	+	0,837	+/-	6,2	+/-	40%	V		
10692	111	189,9	+	61,6	+	2,13	+	7,1	+/-	23,30%	M		
10747	112	505,6	+	72,9	+	1,41	+	5,7	-	32%	V		
10756	113	138,5	+	51,5	+	1,05	+	4,9	-	29%	V		+
10761	114	121,9	+	38,2	+	18,28	+	53,2	+	< 0.01%	N		
10769	115	3335	+	> 400	+	0,141	-	< 3	-	/			
10777	116	1,32	-	< 3	-	0,154	-	< 3	-	/			
10800	117	41,01	+	3,7	-	0,184	-	< 3	-	/		+/-	
10805	118	3064	+	> 400	+	0,35	-	< 3	-	/			
10824	119	346,4	+	95,5	+	0,207	-	3,5	-	85%	V		
10872	120	0,13	-	< 3	-	0,721	-	< 3	-	/			
10885	121	1273	+	172	+	0,544	-	5,7	-	/			
10907	122	0,13	-	< 3	-	1,05	+	< 3	-	/			
10922	123	488,1	+	84,5	+	0,822	+/-	5,5	-	71%	V		
10928	124	582,2	+	108	+	3,26	+	9,4	+	71%	V		
10948	125	0,13	-	< 3	-	0,671	-	< 3	-	/			
10989	126	303,3	+	88,6	+	0,62	-	6,9	+/-	29,53%	V		
11096	127	2070	+	170	+	0,169	-	< 3	-	/			

Nadaljevanje priloge A: Seznam vzorcev in rezultatov vzorcev, ki smo jih testirali z metodami cobas Toxo IgG in IgM ECLIA, Liaison Toxo IgG in IgM CLIA in Mikrogen recomLine Toxoplasma IgG, IgM na specifična protitelesa proti *T. gondii*.

VZOREC	Št.	cobas IgG	cobas IgG	liaison IgG	liaison IgG	cobas IgM	cobas IgM	liaison IgM	liaison IgM	technogenetics avi	technogenetics avi	mikrogen IgG	mikrogen IgM
11099	128	51,67	+	18,4	+	0,253	-	3,2	-	/			
11110	129	0,339	-	<3	-	1,01	+	<3	-	/			
11148	130	15,46	+	11	+	0,148	-	6,8	+/-	28,01%	V		
11166	131	6395	+	>400	+	0,142	-	<3	-	/			
11209	132	371,1	+	31,5	+	0,538	-	<3	-	/			
11210	133	1224	+	83,8	+	1,94	+	3,2	-	47%	V		-
11260	134	2,13	+	<3	-	0,163	-	<3	-	/			
11301	135	4311	+	>400	+	1,26	+	6,1	+/-	39%,40%	V		
11310	136	3649	+	>400	+	3,72	+	9,1	+	37%	V		
11095	137	105,2	+	52,3	+	0,8	+/-	7,4	+/-	7,20%	N		
11160	138	211,5	+	90,4	+	2,07	+	3,9	-	14,2%, 14,4%	N		+
11361	139	44,06	+	7,6	+/-	0,127	-	<3	-	/			
11372	140	9000	+	214	+	0,135	-	<3	-	/			
11373	141	52,24	+	18,1	+	0,194	-	<3	-	/			
11374	142	12,73	+	28,1	+	0,116	-	<3	-	/			
11395	143	627,8	+	55,3	+	1,07	+	<3	-	50%	V		-
11405	144	17,09	+	<3	-	0,208	-	<3	-	/			
11420	145	26,26	+	<3	-	0,104	-	<3	-	/		-	
11424	146	0,13	-	<3	-	0,759	-	<3	-	/			
11444	147	3,9	+	<3	-	0,12	-	<3	-	/		-	
11452	148	516,1	+	141	+	1,25	+	5,7	-	79%, 60%	V		+/-
11487	149	0,13	-	<3	-	1,42	+	<3	-	/			
11535	150	192,8	+	29,9	+	0,999	+/-	3	-	/			
11564	151	0,13	-	<3	-	0,609	-	<3	-	/			
11573	152	475	+	49,4	+	2,22	+	5,5	-	44,40%	V		+
11587	153	6,41	+	<3	-	0,101	-	<3	-	/		-	
11613	154	0,13	-	<3	-	0,609	-	<3	-	/			
11609	155	183,1	+	30	+	0,122	-	<3	-	51,80%	V		
11635	156	6,89	+	9,7	+	0,149	-	<3	-	/			
11637	157	0,13	-	<3	-	1,1	+	<3	-	/			
11665	158	0,553	-	<3	-	0,744	-	<3	-	/			
11670	159	12,24	+	6,4	-	0,124	-	<3	-	/		-	
11696	160	40,76	+	43,8	+	11,43	+	>160	+	4%	N		
11736	161	5,19	+	32,6	+	0,833	+/-	12,5	+	8,40%	N		
11739	162	4,89	+	<3	-	0,117	-	<3	-	/		-	
11743	163	4105	+	>400	+	1,34	+	3,2	-	39%	V		
11776	164	463,1	+	67,9	+	0,579	-	7,8	+/-	43,01%	V		
11764	165	513,1	+	83,8	+	0,654	-	4	-	/			
11786	166	0,13	-	<3	-	0,669	-	<3	-	/			
11883	167	2007	+	379	+	1,36	+	13,9	+	48,20%	V		
11886	168	608,7	+	245	+	0,84	+/-	15	+	17,60%	M		
11899	169	11610	+	>400	+	1,05	+	7,5	+/-	56,50%	V		
11932	170	0,13	-	<3	-	1,06	+	3,6	-	/			

Nadaljevanje priloge A: Seznam vzorcev in rezultatov vzorcev, ki smo jih testirali z metodami cobas Toxo IgG in IgM ECLIA, Liaison Toxo IgG in IgM CLIA in Mikrogen *recomLine Toxoplasma IgG, IgM* na specifična protitetelesa proti *T. gondii*.

VZOREC	Št.	cobas IgG	cobas IgG	liaison IgG	liaison IgG	cobas IgM	cobas IgM	liaison IgM	liaison IgM	technogenetics avi	technogenetics avi	mikrogen IgG	mikrogen IgM
11934	171	59,86	+	20,8	+	0,105	-	< 3	-	/			
12004	172	214,9	+	71,9	+	1,69	+	< 3	-	40,8%, 24,62%	M		-
12233	174	/		/		/		/		0,10%	N		
12139	175	23,3	+	12,3	+	0,181	-	< 3	-	/			
12139	175	/		/		/		/		54,20%	V		
12279	176	1096	+	106	+	3,74	+	4,2	-	64,60%	V		+
12364	177	/		/		/		/		5,57%	N		
12386	178	/		/		/		/		29,79%	V		
12391	179	/		/		/		/		0,07%	N		

Priloga B: Navodila za encimski test cobas Toxo IgG ECLIA.

***Toxoplasma gondii*, IgG ECLIA** **Encimski test (Toxo IgG ECLIA) za ugotavljanje toksoplazemskih protiteles IgG**

1. Namen preiskave Toxo IgG ECLIA

Imunski test za in vitro kvantitativno ugotavljanje IgG protiteles proti *Toxoplasma gondii* v človeškem serumu in plazmi.

Elektrokemiluminescenčni imunski test (electrochemiluminescence immunoassay) ECLIA je namenjena uporabi na Elecsys in **cobas e** analizatorjih imunskih testov.

2. Definicije

- Toxo IgG ECLIA - Elektrokemiluminescenčni imunski test (electrochemiluminescence immunoassay) za ugotavljanje protiteles IgG proti *Toxoplasma gondii*,
- IU/ml - mednarodne enote na mililiter.

3. Postopek

3. 1. Princip in omejitve metode

Princip sendviča. Trajanje testa: 18 minut.

- Prva inkubacija: 10 µL vzorca, biotinizirani rekombinantni *T. gondii*-specifični antigen in *T. gondii*-specifični rekombinantni antigen, označen z ruteniumovim kompleksom* tvori sendvični kompleks.
- Druga inkubacija: Po dodatku s streptavidinom obloženih mikrodolcev se kompleks veže na trdno fazo zaradi reakcije med biotinom in streptavidinom.
- V merilni celici so mikrodolci iz reakcijske mešanice magnetno ujeti na površino elektrode. Nevezana snov je zatem odstranjena s sistemskim pufrom ProCell. Dodatek električne napetosti elektrodi inducira kemiluminescenčno emisijo, ki jo meri fotopomnoževalnik.
- Rezultati so ugotovljeni s pomočjo kalibracijske krivulje, ki je ustvarjena z za inštrument specifično 2-točkovno kalibracijo in master krivuljo, ki je dobljena preko črtna koda reagenta.

* Tris(2,2'-bipiridil)rutenium(II)-kompleks (Ru(bpy)₃²⁺)

Omejitve - interference

Negativen rezultat testa ne izključi popolnoma možnosti okužbe s *T. gondii*. Ni nujno, da posamezniki v zgodnji stopnji akutne okužbe kažejo zaznavna IgG protitelesa.

Odkritje za *Toxoplasma* specifičnih IgG protiteles v enem vzorcu kaže na predhodno izpostavitve *T. gondii*, toda ni dovolj za razlikovanje med akutno in latentno infekcijo (če se ne upošteva koncentracije IgG protiteles).

Za spremljanje titra *Toxoplasma* specifičnih IgG protiteles je priporočljivo testirati serijo vzorcev s paralelnimi meritvami.

Če je zdravljenje predpisano dovolj zgodaj, se lahko izdelava protiteles ustavi. Koncentracije IgG in IgM protiteles lahko ostanejo nizke in obstajajo več let.

Elecsys Toxo IgG rezultati bi morali biti uporabljeni v povezavi z zgodovino pacientovega zdravljenja, kliničnimi simptomi in drugimi laboratorijskimi testi, na primer *Toxoplasma* specifičnimi IgM rezultati in rezultati avidnosti.

Rezultati pacientov, ki so okuženi s HIVom, pacientov, ki jemljejo imunosupresivno terapijo in pacientov z drugimi motnjami, ki vodijo do imunske supresije, bi morali biti interpretirani pazljivo.

Vzorci novorojencev, ljudi po transplantaciji organov in telesne tekočine, ki niso kri, recimo urin, slina ali amniotična tekočina, niso bili testirani.

Na test nimajo učinka ikterus(zlattenica) (bilirubin < 684 µmol/L ali < 40mg/dl), hemoliza (Hb < 1,24 mmol/L ali 2 g/dL), lipemija (Intralipid < 2000 mg/dL) in biotin < 246 nmol/L ali < 60 ng/mL.

Nadaljevanje priloge B: Navodila za encimski test cobas Toxo IgG ECLIA.

Kriterij: Srednje okrevanje pozitivnih vzorcev je med +/-20% serumske vrednosti. Pacientom, ki imajo terapijo z visokimi dozami biotina (> 5 mg/dan), se ne bi smelo vzeti vzorca vsaj 8 ur po zadnjem vnosu biotina.

Nobena interferenca ni bila opažena zaradi revmatoidnega faktorja do koncentracije 6210 IU/mL. Izvedeni so bili in vitro testi na 18 pogosto uporabljenih farmacevtikah in na spiramicinu, sulfadiazinu, folni kislini in pirimetaminu. S testom niso opazili nobene interference.

V redkih primerih pride do interference zaradi ekstremno visokih titrov protiteles proti streptavidinu in ruteniumu. Test vsebuje dodatke, ki minimalizirajo te učinke.

Za namene diagnostike bi bilo potrebno rezultate testa vedno primerjati s pacientovo zgodovino zdravljenja in kliničnimi preiskavami.

Območje merjenja

0,125-650 IU/mL (definirano s spodnjo mejo zaznavanja in z maksimumom master krivulje). Vrednosti pod mejo zaznavanja so označene kot < 0,125 IU/mL. Vrednosti nad področjem merjenja so označeni kot > 650 IU/mL (ali do 13000 IU/mL za 20-krat redčene vzorce).

3.2. Zbiranje in priprava vzorcev

Samo spodaj naštetih vzorcev so bili testirani v zadostnem številu in spoznani za primerne.

Za zbiranje seruma se uporablja standardne epruvete za vzorčenje ali epruvete, ki vsebujejo ločitveni gel.

Li-heparin, K₃-EDTA in Na-citrat plazma.

Kriterij: Srednje okrevanje pozitivnih vzorcev med 80-120% serumske vrednosti.

Stabilno 3 tedne pri 2-8°C, 3 dneve pri 25°C, 3 mesece pri -20°C. Vzorcev so lahko zmrznjeni 6-krat. Vzorcev so bili testirani z zbirko epruвет za zbiranje vzorcev, ki so bile tisti čas komercialno dostopne. Vse dostopne epruvete niso bile testirane. Sistemi za zbiranje vzorcev različnih proizvajalcev lahko vsebujejo različne materiale, ki bi v določenih primerih lahko vplivali na rezultat. Med obdelavo vzorca v primarnih epruветah je potrebno upoštevati navodilo proizvajalca. Vzorcev, ki vsebujejo precipitate, in zmrznjene vzorcev je potrebno pred izvajanjem testa centrifugirati. Liofilizirane vzorcev, z vročino inaktivirane vzorcev in kontrole, stabilizirane z azidom (do 0,1%) se lahko uporabi. Poskrbeti je potrebno, da imajo pred merjenjem pacientovi vzorcev, kalibratorji in kontrole sobno temperaturo (20-25°C).

Zaradi možnosti izhlapevanja je potrebno vzorcev in kalibratorje izmeriti v roku dveh ur.

3.3. Oprema, reagenti in testni kompleti

Reagenti- delavne raztopine

- **M** - s streptavidinom oblečeni mikrodelci (prozoren pokrovček), 1 steklenička, 6,5 mL: s streptavidinom oblečeni mikrodelci 0,72 mg/mL, konzervans.
- **R1** - Toksoplasma-Ag ~ biotin (siv pokrovček), 1 steklenička, 9 mL: Biotiniliran *T.gondii* specifični antigen (rekombinanten, *E. coli*) > 400 µg/L, TRIS pufer 50 mmol/L, pH 7,5, konzervans.
- **R2** - Toksoplasma-Ag ~ Ru(bpy)₃²⁺ (črn pokrovček), 1 steklenička, 9 mL: *T. gondii* specifičen antigen (rekombinanten, *E. coli*) označen z ruteniumovim kompleksom > 400 µg/L, TRIS pufer 50 mmol/L, pH 7,5, konzervans.
- **Cal1** - negativni kalibrator 1 (bel pokrovček), 2 steklenički po 1,0 mL vsaka: Človeški serum, nereaktiven za anti-Toksoplasma IgG; pufer, konzervans.
- **Cal2** - pozitivni kalibrator 2 (črn pokrovček), 2 steklenički po 1,0 mL vsaka: Človeški serum, reaktiven za anti-Toksoplasma IgG, približno 100 IU/mL; pufer, konzervans.

Nadaljevanje priloge B: Navodila za encimski test cobas Toxo IgG ECLIA.

Ostala potrebna oprema

- PreciControl Toxo IgG, 8 x 1 mL vsaka od PreciControl Toxo IgG 1 in 2
- Diluent Universal, 2 x 18 mL ali 2 x 40 mL za redčenje vzorcev
- CalSet Vials, 2 x 56 praznih stekleničk
- splošna laboratorijska oprema
- Elecsys SysClean, 5 x 100 mL raztopine za čiščenje sistema

Oprema za aparat cobas e 411:

- Procell, 6 x 380 mL systemskega pufra
- CleanCell, 6 x 380 mL raztopine za čiščenje merilne celice
- Elecsys SysWash, 1 x 500 mL dodatka za vodo za spiranje
- Adapter za SysClean
- Elecsys 2010 AssayCup, 60 x 60 reakcijskih posod
- Elecsys 2010 AssayTip, 30 x 120 tipsov za pipete

3.4. Postopek metode, vključno s kalibracijo

MODULAR ANALYTICS E170, Elecsys 2010 in **cobas e** aparati: Reagente ohladi na približno 20°C in jih daj v aparat na ploščo za reagente. Izogni se nastanku pene. Sistem avtomatično regulira temperaturo reagentov in odpiranje/zapiranje stekleničk. Postavi kalibratorja Cal1 in Cal2 v prostor za vzorce v aparatu. Odprto pusti samo med kalibracijo. Vse potrebne informacije za kalibracijo so kodirane na črtnih kodah na nalepkah na stekleničkah in so prebrane avtomatično. Po opravljeni kalibraciji Cal1 in Cal2 shrani na 2-8°C ali zavrzi (aparata MODULAR ANALYTICS E170 in cobas e 601).

Kalibracija

Sledljivost: Ta metoda je bila standardizirana po 3. Mednarodnem standardu za anti-Toxoplasma serum (TOXM) od NIBSC, VB.

Vsak Elecsys Toxo IgG reagent ima nalepko s črtno kodo, ki vsebuje specifične informacije za kalibracijo določenega lota reagentov. Vnaprej definirana glavna (master) krivulja je sprejeta v aparat z uporabo Elecsys Toxo IgG Cal1 in Cal2.

Pogostost kalibracije: Kalibracija se mora izvesti enkrat na lot reagentov z uporabo Elecsys Toxo IgG Cal1, Cal2 in svežih reagentov (ne več kot 24 ur po tem, ko je aparat prepoznal kit reagentov).

Ponovna kalibracija je priporočljiva v sledečih primerih:

- po enem mesecu (28 dni) uporabe istega lota reagentov
- po 7 dneh (če se uporablja isti kit reagentov)
- po potrebi: če je kvaliteta rezultatov kontrol s Elecsys PreciControl Toxo IgG izven določenih mej
- bolj pogosto, če je to potrebno zaradi ustreznih predpisov

3.5. Kontrolni postopki in njihova pogostost

Za kontrolo kvalitete uporabi Elecsys PreciControl Toxo IgG.

Postopek s kontrolama 1 in 2 je potrebno izvesti vsaj enkrat na 24 ur, če je test v uporabi, enkrat na kit reagentov in po vsaki kalibraciji. Intervali in meje kontrol bi morali biti prilagojeni za potrebe posameznega laboratorija. Rezultati morajo biti med definiranimi mejami. Vsak laboratorij bi moral vzpostaviti ukrepe za korigiranje, če vrednosti padejo izven teh meja. Če je potrebno, se meritve s kontrolami lahko ponovi.

3.6. Vrednotenje rezultatov

Aparat avtomatično izračuna koncentracije vsakega vzorca v IU/mL.

Rezultati, dobljeni z Elecsys Toxo IgG testom, se interpretirajo tako:

Nereaktivno: < 1 IU/mL

Nedoločno: ≥ 1 - < 3 IU/mL

Reaktivno: ≥ 3 IU/mL

Nadaljevanje priloge B: Navodila za encimski test cobas Toxo IgG ECLIA.

Vzorci s koncentracijami < 1 IU/mL se s testom Elecsys Toxo IgG smatra za nereaktivne. Vzorci s koncentracijami med 1 IU/mL in < 3 IU/mL so nedoločni. Vzorci morajo biti ponovno testirani. Če je rezultat še vedno nedoločen, je potrebno v roku 2 tednov zbrati drugi vzorec. Vzorci s koncentracijami ≥ 3 IU/mL so pozitivni za IgG protitelesa proti *T. gondii* in kažejo na akutno ali latentno okužbo. Diagnozo akutne okužbe s Toksoplazmo se potrdi z značilnim povečanjem titra Toxo IgG protiteles od prvega do drugega odvzetega vzorca v roku 2 tednov in z rezultati Toksoplasma specifičnih IgM protiteles.

Nedoločen ali nizek pozitiven rezultat lahko kaže na zgodnjo akutno okužbo s Toksoplazmo. (tudi v odsotnosti Toxo IgM protiteles). Rezultat Toksoplasma IgG protiteles v določenem vzorcu, če se primerja s testi različnih proizvajalcev, se lahko razlikuje zaradi različnih metod. Torej bi moral rezultat, poslan zdravniku, vključevati: »Sledeči rezultati so bili pridobljeni s testom Elecsys Toxo IgG. Rezultati drugih testov drugih proizvajalcev ne smejo biti medsebojno zamenljivi.«

3.7. Redčenje

Vzorci s koncentracijami Toxo IgG protiteles nad območjem merjenja se lahko redči z Elecsys Diluent Universal. Priporočljivo redčenje je 1:20 (avtomatično ali ročno). Koncentracija redčenega vzorca mora biti ≥ 3 IU/mL. Po ročnem redčenju je potrebno rezultat pomnožiti s faktorjem redčenja. Po avtomatičnem redčenju z aparatom programska oprema samodejno izračuna koncentracijo v vzorcu.

Ročno redčenje je možno tudi s človeškim serumom, negativnim za Toxo IgG.

Protitelesa proti *Toxoplasma gondii* so heterogena. To lahko vodi do nelinearnega obnašanja redčitve.

3.8. Varnostni ukrepi

Za in vitro diagnostično uporabo.

Drži se običajnih varnostnih ukrepov za ravnanje z vsemi laboratorijskimi reagenti.

Odstranitev vsega odpadnega materiala je potrebno izvršiti z lokalnimi predpisi.

List z varnostnimi podatki je na razpolago na zahtevo poklicnega uporabnika.

Ves človeški material se smatra za potencialno kužnega. Vsi produkti, ki izhajajo iz človeške krvi (Cal1, Cal2), so pripravljene samo iz krvi darovalcev, ki so bili posamezno testirani in ki so bili brez HBsAg in brez protiteles proti HCV in HIV.

Metode testiranja so odobrene s strani FDA ali v skladu z Evropsko direktivo 98/79/EC, Annex II, List A.

Serum, ki vsebuje anti-Toxo IgG (Cal2), je bil sterilno filtriran.

Kakorkoli, ker nobena metoda testiranja ne more stoddostno izničiti tveganja možne okužbe, je potrebno z vsemi materiali ravnati kot z vzorci pacientov. V primeru izpostavljenosti je potrebno upoštevati direktive odgovornega zdravstvenega urada.

Reagenti se ne bi smeli uporabljati po preteku roka veljavnosti.

Izogibaj se tvorjenja pene pri vseh reagentih in tipih vzorcev (vzorci, kalibratorji in kontrole).

Nadaljevanje priloge B: Navodila za encimski test cobas Toxo IgG ECLIA.

3.9. Reference

1. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004;363:1965-1976.
2. Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis* 1992;15:211-222.
3. Khalifa KES, Roth A, Roth B, Arasteh KN, Janitschke K. Value of PCR for Evaluating Occurrence of Parasitemia in Immunocompromised Patients with Cerebral and Extracerebral Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2813-2819.
4. Remington JS, McLeod R & Desmonts G 2001, Toxoplasmosis, 205-346, in J.S. Remington & J.O. Klein (ed.), *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*, 5th ed. W.B.Saunders, Philadelphia, Pa.
5. Thulliez P. Maternal and foetal infection: in Toxoplasmosis (eds D.H.M. Joynton, T.G. Wreghitt) Cambridge University Press, 2001:193-213 ISBN 0521 44328 8.
6. Wong SY, Remington JS. Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin Infect Dis* 1994;18:853-862.
7. Occupational Safety and Health Standards: bloodborne pathogens. (29 CFR Part 1910.1030). *Fed. Register*. July 1, 2001;17:260-273.
8. Council Directive (2000/54/EC). *Official Journal of the European Communities* No. L262 from Oct. 17, 2000.

Priloga C: Navodila za encimski test cobas Toxo IgM ECLIA.

***Toxoplasma gondii*, IgM ECLIA** **Encimski test (Toxo IgM ECLIA) za ugotavljanje toksoplazemskih protiteles IgM**

1. Namen preiskave Toxo IgM ECLIA

Imunski test za in vitro kvantitativno ugotavljanje IgM protiteles proti *Toxoplasma gondii* v človeškem serumu in plazmi.

Elektrokemiluminescenčni imunski test (electrochemiluminescence immunoassay) ECLIA je namenjena uporabi na Roche Elecsys 2010 in MODULAR ANALYTICS E170 (Elecsys modul) analizatorjih imunskih testov.

2. Definicije:

- Toxo IgM ECLIA - Elektrokemiluminescenčni imunski test (electrochemiluminescence immunoassay) za ugotavljanje protiteles IgM proti *Toxoplasma gondii*,
- Vrednosti testa so izražene v t. i. absorpcijskih enotah (absorbance units)

3. Postopek

3. 1. Princip in omejitve metode

Princip testa je μ -Capture. Trajanje testa: 18 minut.

- 1. inkubacija: 10 μ L vzorca je avtomatsko razredčeno v razmerju 1:20 z Elecsys Diluent Universal. Dodan je *T. gondii* specifični rekombinantni antigen, označen z ruteniumovim kompleksom.* Anti-Toxo IgM protitelesa, prisotna v vzorcu, reagirajo z z ruteniumom označenim *T. gondii* specifičnim antigenom.
- 2. inkubacija: Dodana so biotinizirana monoklonska h-IgM specifična protitelesa in s streptavidinom oblečeni mikrodelci. Kompleks se veže na trdno fazo zaradi interakcije med biotinom in streptavidinom.
- V merilni celici so mikrodelci iz reakcijske mešanice magnetno ujeti na površino elektrode. Nevezana snov je zatem odstranjena s sistemskim pufrom ProCell. Dodatek električne napetosti elektrodi inducira kemiluminescenčno emisijo, ki jo meri fotopomnoževalnik.
- Rezultati so dobljeni avtomatično z Elecsys programsko opremo, ki primerja elektrokemiluminescenčni signal, pridobljen od reakcijskega produkta vzorca, in signal cutoff vrednosti, ki je bila predhodno dobljena s Toxo IgM kalibracijo.

* Tris(2,2'-bipiridil)rutenium(II)-kompleks (Ru(bpy)₃²⁺)

Omejitve - interference

Negativen rezultat Toxo IgM testa, tudi v kombinaciji s pozitivnim Toxo IgM rezultatom, ne izključi popolnoma možnosti akutne okužbe s *Toxoplasma gondii*.

- Posamezniki v zgodnji fazi akutne okužbe morda ne kažejo zaznavne količine Toxo IgM protiteles. Pri nekaterih teh posameznikih je možen mejen ali nizek pozitiven rezultat z Elecsys Toxo IgM testom in kaže na zgodnjo akutno okužbo. Drugi vzorec je potrebno testirati v roku dveh tednov. Detekcija Toxo IgM in/ali pomembno povečanje Elecsys Toxo IgG titra protiteles v drugem vzorcu podpira diagnozo akutne okužbe s *Toxoplasma gondii*.
- V nekaterih posameznikih se lahko *Toxoplasma* IgM specifična protitelesa vrnejo v nereaktivne koncentracije v nekaj tednih po okužbi s *T. gondii*.

Zaznanje IgM protiteles proti *T. gondii* v enem samem vzorcu ni dovolj za dokaz akutne okužbe s *T. gondii*, saj povišane koncentracije IgM protiteles lahko ostanejo več let po začetni okužbi. Za razjasnitev je potrebno izvesti dodatne teste ali kombinacijo testov. Pomembno povečanje titra Toxo IgG protiteles od prvega do drugega vzorca podpira diagnozo akutne okužbe s *T. gondii*.

Če je zdravljenje predpisano dovolj zgodaj, se lahko izdelava protiteles ustavi. Koncentracije IgG in IgM protiteles lahko ostanejo nizke in obstajajo več let.

Nadaljevanje priloge C: Navodila za encimski test cobas Toxo IgM ECLIA.

Elecsys Toxo IgM rezultati bi morali biti uporabljeni v povezavi z zgodovino pacientovega zdravljenja, kliničnimi simptomi in drugimi laboratorijskimi testi, na primer Toksoplasma specifičnimi IgG.

Rezultati pacientov, ki so okuženi s HIVom, pacientov, ki jemljejo imunosupresivno terapijo in pacientov z drugimi motnjami, ki vodijo do imunske supresije, bi morali biti interpretirani pazljivo.

Vzorci novorojencev, ljudi po transplantaciji organov in telesne tekočine, ki niso kri, recimo urin, slina ali amniotična tekočina, niso bili testirani.

Na test nimajo učinka ikterus(zlatenica) (bilirubin < 684 μ mol/L ali < 40mg/dl), hemoliza (Hb < 1,24 mmol/L ali 2 g/dL), lipemija (Intralipid < 2000 mg/dL) in biotin < 246 nmol/L ali < 60 ng/mL.

Kriterij: Srednje okrevanje pozitivnih vzorcev je med +/-20% serumske vrednosti. Pacientom, ki imajo terapijo z visokimi dozami biotina (> 5 mg/dan), se ne bi smelo vzeti vzorca vsaj 8 ur po zadnjem vnosu biotina.

Nobena interferenca ni bila opažena zaradi revmatoidnega faktorja do koncentracije 3720 IU/mL.

Efekt kljuge zaradi visokega odmerka (high-dose hook effect) ne vodi do lažno negativnih rezultatov pri Elecsys Toxo IgM testu.

Izvedeni so bili in vitro testi na 18 pogosto uporabljenih farmacevtikah in na spiramicinu, sulfadiazinu, folni kislini in pirimetaminu. S testom niso opazili nobene interference.

Kot pri veliko μ -capture testih je bila opažena interferenca z nespecifičnimi IgM protitelesi. Povečane količine IgM lahko vodijo do zmanjšanja povračila pozitivnih vzorcev z Elecsys Toxo IgM testom.

Kot pri vseh testih, ki vsebujejo mišja monoklonska protitelesa, se tudi tu lahko pridobijo napačni rezultati iz vzorcev pacientov, ki kot terapijo prejemajo mišja monoklonska protitelesa ali so ta protitelesa prejeli za namene diagnoze.

Za namene diagnostike bi bilo potrebno rezultate testa vedno primerjati s pacientovo zgodovino zdravljenja in kliničnimi preiskavami.

3. 2. Zbiranje in priprava vzorcev

Samo spodaj naštetih vzorcev so bili testirani v zadostnem številu in spoznani za primerne.

Za zbiranje seruma se uporablja standardne epruvete za vzorčenje ali epruvete, ki vsebujejo ločitveni gel.

Li-heparin, K₃-EDTA in Na-citrat plazma.

Kriterij: Srednje okrevanje pozitivnih vzorcev med 80-120% serumske vrednosti.

Stabilno 3 tedne pri 2-8°C, 3 dneve pri 25°C, 3 mesece pri -20°C. Vzorcev so lahko zmrznjeni 6-krat.

Vzorci so bili testirani z zbirko epruvet za zbiranje vzorcev, ki so bile tisti čas komercialno dostopne. Vse dostopne epruvete niso bile testirane. Sistemi za zbiranje vzorcev različnih proizvajalcev lahko vsebujejo različne materiale, ki bi v določenih primerih lahko vplivali na rezultat. Med obdelavo vzorca v primarnih epruvetah je potrebno upoštevati navodilo proizvajalca. Vzorcev, ki vsebujejo precipitate, in zmrznjene vzorcev je potrebno pred izvajanjem testa centrifugirati. Liofilizirane vzorcev, z vročino inaktivirane vzorcev in kontrole, stabilizirane z azidom (do 1%) se lahko uporabi. Poskrbeti je potrebno, da imajo pred merjenjem pacientovi vzorcev, kalibratorji in kontrole sobno temperaturo (20-25°C).

Zaradi možnosti izhlapevanja je potrebno vzorcev in kalibratorje izmeriti v roku dveh ur.

Nadaljevanje priloge C: Navodila za encimski test cobas Toxo IgM ECLIA.

3. 3. Oprema, reagenti in testni kompleti

Reagenti- delavne raztopine

- **M** - s streptavidinom oblečeni mikrodelci (prozoren pokrovček), 1 steklenička, 6,5 mL: s streptavidinom oblečeni mikrodelci, 0,72 mg/mL.; konzervans.
- **R1** - Toksoplasma-Ag ~ Ru(bpy)₃²⁺ (siv pokrovček), 1 steklenička, 9 mL: Z ruteniumom označen Toksoplasma antigen > 1 mg/L, MES pufer 50 mmol/L, pH 6; konzervans.
- **R2** - Anti-h-IgM-Ab ~ biotin (črn pokrovček), 1 steklenička, 9 mL: Biotinilirano monoklonsko anti-h-IgM protitelo (miš) > 500 µg/L, HEPES pufer 50 mmol/L, pH 7,2; konzervans.
- **Cal1** - negativni kalibrator 1 (bel pokrovček), 2 steklenički po 0,67 mL vsaka: Človeški serum, negativen za anti-Toksoplasma IgM; pufer, konzervans.
- **Cal2** - pozitiven kalibrator 2 (črn pokrovček), 2 steklenički po 0,67 mL vsaka: Anti-Toxo IgM (človeški) približno 130 U/mL (Roche enote) v človeškem serumu; konzervans.

Ostala potrebna oprema

- PreciControl Toxo IgM, 8 x 0,67 mL vsaka od PreciControl Toxo IgM 1 in 2
- Diluent Universal, 2 x 18 mL ali 2 x 40 mL za redčenje vzorcev
- CalSet Vials, 2 x 56 praznih stekleničk
- splošna laboratorijska oprema
- Elecsys SysClean, 5 x 100 mL raztopine za čiščenje sistema

3.4. Postopek metode, vključno s kalibracijo

MODULAR ANALYTICS E170 in Elecsys 2010 aparata: Reagente ohladi na približno 20°C in jih daj v aparat na ploščo za reagente. Izogni se nastanku pene. Sistem avtomatično regulira temperaturo reagentov in odpiranje/zapiranje stekleničk. Postavi kalibratorja Cal1 in Cal2 v prostor za vzorce v aparatu. Odprto pusti samo med kalibracijo. Vse potrebne informacije za kalibracijo so kodirane na črtnih kodah na nalepkah na stekleničkah in so prebrane avtomatično. Po opravljeni kalibraciji Cal1 in Cal2 shrani na 2-8°C ali zavrzi (aparata MODULAR ANALYTICS E170).

Kalibracija

Sledljivost: Ta metoda je bila standardizirana po Roche-jevem standardu. Enote so bile izbrane poljubno.

Pogostost kalibracije: Kalibracija se mora izvesti enkrat na lot reagentov z uporabo Elecsys Toxo IgM Cal1, Cal2 in svežih reagentov (ne več kot 24 ur po tem, ko je aparat prepoznal kit reagentov).

Ponovna kalibracija je priporočljiva v sledečih primerih:

- po enem mesecu (28 dni) uporabe istega lota reagentov
- po 7 dneh (če se uporablja isti kit reagentov)
- po potrebi: če je kvaliteta rezultatov kontrol s Elecsys PreciControl Toxo IgM izven določenih mej
- bolj pogosto, če je to potrebno zaradi ustreznih predpisov

Razpon za elektrokemiluminescenčne signale za kalibratorje: Negativni kalibrator (Cal1): 400-2500 (aparata Elecsys 2010 in MODULAR ANALYTICS E170), pozitiven kalibrator (Cal2): 4500-35000 (aparata Elecsys 2010 in MODULAR ANALYTICS E170).

3.5. Kontrolni postopki in njihova pogostost

Za kontrolo kvalitete uporabi Elecsys PreciControl Toxo IgM.

Postopek s kontrolama 1 in 2 je potrebno izvesti vsaj enkrat na 24 ur, če je test v uporabi, enkrat na kit reagentov in po vsaki kalibraciji. Intervali in meje kontrol bi morali biti prilagojeni za potrebe posameznega laboratorija. Rezultati morajo biti med definiranimi mejami. Vsak laboratorij bi moral vzpostaviti ukrepe za korigiranje, če vrednosti padejo izven teh meja. Če je potrebno, se meritev s kontrolami lahko ponovi.

Nadaljevanje priloge C: Navodila za encimski test cobas Toxo IgM ECLIA.

3.6. Vrednotenje rezultatov

Aparat avtomatično izračuna cutoff vrednosti glede na meritve kalibratorjev Cal1 in Cal2. Rezultat vzorca je podan kot reaktivno, nereaktivno in v obliki cutoff indeksa (signal vzorca/cutoff).

Rezultati, dobljeni z Elecsys Toxo IgM testom, se interpretirajo tako:

Nereaktivno: $< 0,8$ COI

Nedoločno: $\geq 0,8 - < 1$ COI

Reaktivno: $\geq 1,0$ COI

Vzorci s cutoff indeksom $< 0,8$ so po Elecsys Toxo IgM testu smatra za nereaktivne.

Vzorci s cutoff indeksom med $\geq 0,8 - < 1$ so nedoločni. Vzorci morajo biti ponovno testirani. Če je rezultat še vedno nedoločen, je potrebno v roku 2 do 3 tednov zbrati drugi vzorec.

Vzorci s cutoff indeksom : $\geq 1,0$ so reaktivni po Elecsys Toxo IgM testu.

Obseg izmerjenih rezultatov nad cutoff vrednostjo ni pokazatelj skupne količine protiteles prisotnih v vzorcu.

Rezultat Toksoplasma IgM protiteles v določenem vzorcu, če se primerja s testi različnih proizvajalcev, se lahko razlikuje zaradi različnih metod in testov.

3.7. Varnostni ukrepi

Za in vitro diagnostično uporabo.

Drži se običajnih varnostnih ukrepov za ravnanje z vsemi laboratorijskimi reagenti.

Odstranitev vsega odpadnega materiala je potrebno izvršiti z lokalnimi predpisi.

List z varnostnimi podatki je na razpolago na zahtevo poklicnega uporabnika.

Ves človeški material se smatra za potencialno kužnega. Vsi produkti, ki izhajajo iz človeške krvi (Cal1, Cal2), so pripravljene samo iz krvi darovalcev, ki so bili posamezno testirani in ki so bili brez HBsAg in brez protiteles proti HCV in HIV.

Metode testiranja so odobrene s strani FDA ali v skladu z Evropsko direktivo 98/79/EC, Annex II, List A.

Serum, ki vsebuje anti-Toxo IgM (Cal2), je bil sterilno filtriran.

Kakorkoli, ker nobena metoda testiranja ne more stotodstno izničiti tveganja možne okužbe, je potrebno z vsemi materiali ravnati kot z vzorci pacientov. V primeru izpostavljenosti je potrebno upoštevati direktive odgovornega zdravstvenega urada.

Reagenti se ne bi smeli uporabljati po preteku veljavnega roka.

Izogibaj se tvorjenja pene pri vseh reagentih in vzorcih (vzorci, kalibratorji in kontrole).

Nadaljevanje priloge C: Navodila za encimski test cobas Toxo IgM ECLIA.

3.8. Reference

9. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet 2004;363:1965-1976.
10. Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clin Infect Dis 1992;15:211-222.
11. Khalifa KES, Roth A, Roth B, Arasteh KN, Janitschke K. Value of PCR for Evaluating Occurrence of Parasitemia in Immunocompromised Patients with Cerebral and Extracerebral Toxoplasmosis. J Clin Microbiol 1994; 32:2813-2819.
12. Remington JS, McLeod R & Desmonts G 2001, Toxoplasmosis, 205-346, in J.S. Remington & J.O. Klein (ed.), Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant, 5th ed. W.B.Saunders, Philadelphia, Pa.
13. Thulliez P. Maternal and foetal infection: in Toxoplasmosis (eds D.H.M. Joynton, T.G. Wreghitt) Cambridge University Press, 2001:193-213 ISBN 0521 44328 8.
14. Wong SY, Remington JS. Toxoplasmosis in pregnancy. Clin Infect Dis 1994;18:853-862.
15. Occupational Safety and Health Standards: bloodborne pathogens. (29 CFR Part 1910.1030). Fed. Register. July 1, 2001;17:260-273.
16. Council Directive (2000/54/EC). Official Journal of the European Communities No. L262 from Oct. 17, 2000.
17. Meek B, van Gool T, Gilis H, Peek R. Dissecting the IgM antibody response during the acute and latent phase of toxoplasmosis. Diagn Microbiol Infect Dis 2001;41:131-137.
18. Bobic B, Sibalic D, Djurkovic-Djakovic O. High level of IgM Antibodies Specific for *Toxoplasma gondii* in Pregnancy 12 Years after Primary *Toxoplasma* Infection. Gynecol Obstet Invest 1991;31:182-184.

Priloga D: Navodila za encimski test Liaison Toxo IgG CLIA.

***Toxoplasma gondii*, IgG CLIA Encimski test (Toxo IgG II LIAISON) za ugotavljanje toksoplazemskih protiteles IgG**

1. Namen preiskave Toxo IgG ECLIA

LIAISON Toxo IgG test uporablja tehnologijo kemiluminescenčnih imunskih testov (CLIA) za kvantitativno določitev specifičnih IgG protiteles proti *Toxoplasma gondii* v človeškem serumu ali v vzorcih plazme nosečnic.

2. Definicije

- Toxo IgG CLIA - Kemiluminescenčni imunski test (chemiluminescence immunoassay) za ugotavljanje protiteles IgG proti *Toxoplasma gondii*,
- IU/ml - mednarodne enote na mililiter.

3. Postopek

3. 1. Princip in omejitve metode

Ta metoda za kvantitativno določanje specifičnih IgG protiteles proti *T. gondii* je indirektni kemiluminescenčni test (CLIA). Za test se uporabljajo magnetni delci, ki so obdani s *T. gondii* (trdna faza), in mišja monoklonska protitelesa, ki so povezana z derivatom izoluminola (konjugat izoluminol-protitelo). Med prvo inkubacijo se proti *T. gondii* specifična protitelesa, ki so prisotna v kalibratorjih, vzorcih ali kontrolah, vežejo na trdno fazo. Med drugo inkubacijo konjugat izoluminol-protitelo reagira z anti *Toxoplasma gondii* IgG protitelesi, ki so vezana na trdni fazi. Po vsaki inkubaciji je nevezan material odplaknjen z »wash« ciklom. Nazadnje so dodani starterski reagenti, ki povzročijo svetlobno kemiluminescenčno reakcijo. Svetlobni signal, katerega jakost je odvisna od količine konjugata izoluminol-protitelo, meri fotopomnoževalnik v relativnih svetlobnih enotah (RLU). Te so sorazmerne s koncentracijo *T. gondii* IgG protiteles v kalibratorjih, vzorcih ali kontrolah.

Omejitve

Za zanesljive rezultate laboratorij potrebuje tehnika, ki je večš svojega dela in ki je dobro seznanjen z napravo. Na rezultate lahko vpliva bakterijska kontaminacija ali toplotna inaktivacija.

Varnostni ukrepi

Za in vitro diagnostično uporabo.

Vse enote seruma in plazme, uporabljene za izdelavo komponent tega kita, so bile pregledane na prisotnost HBsAg ter anti-HCV, anti-HIV-1 in anti-HIV-2 protiteles. Vendar nobena testna metoda ne more zagotoviti popolne odsotnosti patogenov. Zato je potrebno z vsem materialom človeškega izvora rokovati previdno in ga smatrati kot potencialno kužnega.

Priprava integrala reagentov

Preden odpreš posodo, previdno in nežno pretresi celoten integral v vodoravni smeri. Izogni se tvorjenju pene. Odstrani čep z vsake posodice in obračaj kolešček na dnu posodice z magnetnimi delci naprej in nazaj, da usedlina postane rjave barve. Ta proces povzroči ponovno raztopitev magnetnih delcev. Zatem postavi integral v prostor za reagente v aparat. Črtni kode morajo biti obrnjene levo. Pred uporabo pusti stati 30 minut. Aparat avtomatično sam premeša in dokončno resuspendira magnetne delce. Poglej v navodila aparata za pravilno vstavljanje vzorcev. Zatem zaženi aparat.

Nadaljevanje priloge D: Navodila za encimski test Liaison Toxo IgG CLIA.

Shranjevanje in stabilnost integrala reagentov

Integral z reagenti mora biti shranjen pokončno, da se ohrani pravilno stanje magnetnih delcev. Če je shranjen integral zaprt in postavljen pokonci, so reagenti stabilni pri 2-8°C do izteka roka uporabe. Integral se ne sme zamrzovati. Ne sme biti uporabljen po izteku roka uporabe, ki je označen na nalepkah na reagentih in kitu. Ko je integral enkrat odprt, ostane stabilen 8 tednov pri temperaturi 2-8°C ali na plošči aparata.

Zbiranje in priprava vzorcev

Uporabi se lahko človeški serum ali človeška plazma. Antikoagulanti citrat, EDTA in heparin so bili testirani in se lahko uporabljajo s tem testom. Kri mora biti zbrana aseptično. Ko se kri strdi, mora biti serum čimprej ločen od strdka. Vzorci, ki so motni ali vsebujejo ostanke eritrocitov, je morda potrebno pred testom filtrirati ali centrifugirati. Močno hemolizirane, lipemične ali z bakterijami kontaminirane vzorce se ne sme testirati. Pred samo izvedbo testa je potrebno odstraniti zračne mehurčke. Če se test izvede šele nekaj dni po zbiranju vzorcev, je potrebno vzorce hraniti na temperaturi 2-8°C ali pa zmrzniti pri temperaturi -20°C. Če so bili vzorci zmrznjeni, jih je potrebno pred uporabo dobro premešati. Minimalni volumen, potreben za test, je 170 µL vzorca.

Kalibracija

Aparat mora biti kalibriran, če pride do sledečih situacij:

- uporabi se nov lot integrala reagentov ali Starter Kit
- prejšnja kalibracija se je izvedla pred več kot 4 tedni
- aparat je bil servisiran
- kontrolne vrednosti ležijo izven pričakovanega območja

Postopek testa

Strogo upoštevanje navodil aparata zagotavlja pravilen učinek testa. Vsak parameter testa je prepoznan preko črtnih kod na nalepki integrala reagentov. Če se pokvari čitalec črtnih kod se lahko vrednosti vnese ročno.

Operacije aparata so sledeče:

1. Razdelitev kalibratorjev, kontrol ali vzorcev po reakcijskem modulu
2. Razdelitev oblečenih magnetnih delcev
3. Razdelitev razredčila za vzorce
4. Inkubacija
5. Spiranje s tekočino Wash/System
6. Razdelitev konjugata po reakcijskem modulu
7. Inkubacija
8. Spiranje s tekočino Wash/System
9. Dodatek Starter Kit-a in merjenje emitirane svetlobe

Kontrolni postopki

Kontrolo kvalitete je priporočeno opraviti enkrat na dan uporabe aparata. Če lokalna priporočila ali zahteve priporočajo drugače, se je potrebno ravnati v skladu z njimi.

LIAISON kontrole so dostopne za notranjo kontrolo kvalitete. Če rezultati kontrol ležijo izven pričakovanega območja, je potrebno izvesti kalibracijo in ponoviti kontrolo kvalitete.

Nadaljevanje priloge D: Navodila za encimski test Liaison Toxo IgG CLIA.

Vrednotenje rezultatov

Aparat avtomatično izračuna koncentracije IgG protiteles parazita *T. gondii* (izražene v IU/mL) in oceni rezultate.

Območje merjenja. 0 do 400 IU/ml *Toxoplasma gondii* IgG.

Vzorci, ki imajo večjo koncentracijo protiteles kot je merilno območje aparata, se lahko razredči s funkcijo Dilute (priporočljivo redčenje je 1:20) in ponovno izmeri. Aparat rezultate zatem avtomatično pomnoži s faktorjem redčitve, da se dobi pravilna vrednost. Količina redčila v integralu omogoča redčitev 18 vzorcev.

Rezultate vzorcev s IgG protitelesi parazita *T. gondii* se interpretira sledeče:

-Vzorci s koncentracijo IgG protiteles pod 7,2 IU/mL se ocenijo kot negativni.

-Vzorci s koncentracijo IgG protiteles med 7,2 in 8,8 IU/mL se ocenijo kot mejni.

-Vzorci s koncentracijo IgG protiteles 8,8 IU/mL ali več se ocenijo kot pozitivni.

Negativen rezultat kaže, da oseba še ni imuna, toda ne izključi akutne okužbe. Potrebno je poudariti, da aparat ponavadi pokaže negativen rezultat pri okuženih pacientih med inkubacijsko dobo in v zgodnjih fazah okužbe. Če se sumi na okužbo s *T. gondii* kljub negativnemu rezultatu, je potrebno zbrati drugi vzorec in testirati v roku enega ali dveh tednov.

Pozitiven rezultat kaže nedavno ali preteklo izpostavljenost patogenu. Če je rezultat pozitiven in vzorec vsebuje tudi IgM protitelesa, se sklepa na nedavno infekcijo. Dodatni serološki podatki drugih testov lahko prispevajo koristne informacije za lažjo klinično interpretacijo rezultatov.

Rezultati so prikazani kvantitativno kot pozitivni ali negativni na prisotnost *T. gondii* IgG protiteles. Diagnoza nalezljive bolezni ne bi smela biti postavljena na osnovi enega samega rezultata testa. Ugotovljena bi morala biti v povezavi s kliničnimi znaki, ostalimi diagnostičnimi postopki in zdravnikovo presojo.

Priloga E: Navodila za encimski test Liaison Toxo IgM CLIA.

***Toxoplasma gondii*, IgM CLIA** **Encimski test (Toxo IgM LIAISON) za ugotavljanje toksoplazemskih protiteles IgM**

1. Namen preiskave Toxo IgM CLIA

LIAISON Toxo IgM test uporablja tehnologijo kemiluminescenčnih imunskih testov (CLIA) za kvantitativno določitev specifičnih IgM protiteles proti *Toxoplasma gondii* v človeškem serumu ali v vzorcih plazme nosečnic.

2. Definicije

- Toxo IgM CLIA - Kemiluminescenčni imunski test (chemiluminescence immunoassay) za ugotavljanje protiteles IgM proti *Toxoplasma gondii*,
- AU/ml – absorpcijske enote (absorbance units) na mililiter.

3. Postopek

3. 1. Princip in omejitve metode

Ta metoda za kvantitativno določanje specifičnih IgG protiteles proti *T. gondii* je indirektni capture kemiluminescenčni test (CLIA). Za test se uporabljajo magnetni delci, ki so obdani z IgG protitelesi (mišja, monoklonska), ki se vežejo na človeška IgM protitelesa (trdna faza), in mišja monoklonska protitelesa (vežejo se na *T. gondii*), ki so povezana z derivatom izoluminola (konjugat izoluminol-protitelo). Med prvo inkubacijo se proti *T. gondii* specifična IgM protitelesa, ki so prisotna v kalibratorjih, vzorcih ali kontrolah, vežejo na trdno fazo. Med drugo inkubacijo konjugat izoluminol-protitelo reagira s prej dodanimi *Toxoplasma gondii* antigeni. Ta imunski kompleks reagira z IgM protitelesi, ki so vezana na trdni fazi. Po vsaki inkubaciji je nevezan material odplaknjen z »wash« ciklom. Nazadnje so dodani starterski reagenti, ki povzročijo svetlobno kemiluminescenčno reakcijo. Svetlobni signal, katerega jakost je odvisna od količine konjugata izoluminol-protitelo, meri fotopomnoževalnik v relativnih svetlobnih enotah (RLU). Te so sorazmerne s koncentracijo *T. gondii* IgM protiteles v kalibratorjih, vzorcih ali kontrolah.

Omejitve

Za zanesljive rezultate laboratorij potrebuje tehnika, ki je večš svojega dela in ki je dobro seznanjen z napravo. Na rezultate lahko vpliva bakterijska kontaminacija ali toplotna inaktivacija.

Varnostni ukrepi

Za in vitro diagnostično uporabo.

Vse enote seruma in plazme, uporabljene za izdelavo komponent tega kita, so bile pregledane na prisotnost HBsAg ter anti-HCV, anti-HIV-1 in anti-HIV-2 protiteles. Vendar nobena testna metoda ne more zagotoviti popolne odsotnosti patogenov. Zato je potrebno z vsem materialom človeškega izvora rokovati previdno in ga smatrati kot potencialno kužnega.

Priprava integrala reagentov

Preden odpreš posodo, previdno in nežno pretresi celoten integral v vodoravni smeri. Izogni se tvorjenju pene. Odstrani čep z vsake posodice in obračaj kolešček na dnu posodice z magnetnimi delci naprej in nazaj, da usedlina postane rjave barve. Ta proces povzroči ponovno raztopitev magnetnih delcev. Zatem postavi integral v prostor za reagente v aparat. Črtne kode morajo biti obrnjene levo. Pred uporabo pusti stati 30 minut. Aparat avtomatično sam premeša in dokončno resuspendira magnetne delce. Poglej v navodila aparata za pravilno vstavljanje vzorcev. Zatem zaženi aparat.

Nadaljevanje priloge E: Navodila za encimski test Liaison Toxo IgM CLIA.

Shranjevanje in stabilnost integrala reagentov

Integral z reagenti mora biti shranjen pokončno, da se ohrani pravilno stanje magnetnih delcev. Če je shranjen integral zaprt in postavljen pokonci, so reagenti stabilni pri 2-8°C do izteka roka uporabe. Integral se ne sme zamrzovati. Ne sme biti uporabljen po izteku roka uporabe, ki je označen na nalepkah na reagentih in kitu. Ko je integral enkrat odprt, ostane stabilen 8 tednov pri temperaturi 2-8°C ali na plošči aparata.

Zbiranje in priprava vzorcev

Uporabi se lahko človeški serum ali človeška plazma. Antikoagulanti citrat, EDTA in heparin so bili testirani in se lahko uporabljajo s tem testom. Kri mora biti zbrana aseptično. Ko se kri strdi, mora biti serum čimprej ločen od strdka. Vzorci, ki so motni ali vsebujejo ostanke eritrocitov, je morda potrebno pred testom filtrirati ali centrifugirati. Močno hemolizirane, lipemične ali z bakterijami kontaminirane vzorce se ne sme testirati. Pred samo izvedbo testa je potrebno odstraniti zračne mehurčke. Če se test izvede šele nekaj dni po zbiranju vzorcev, je potrebno vzorce hraniti na temperaturi 2-8°C ali pa zmrzniti pri temperaturi -20°C. Če so bili vzorci zmrznjeni, jih je potrebno pred uporabo dobro premešati. Minimalni volumen, potreben za test, je 170 µL vzorca.

Kalibracija

Aparat mora biti kalibriran, če pride do sledečih situacij:

- uporabi se nov lot integrala reagento ali Starter Kit
- prejšnja kalibracija se je izvedla pred več kot 4 tedni
- aparat je bil servisiran
- kontrolne vrednosti ležijo izven pričakovanega območja

Postopek testa

Strogo upoštevanje navodil aparata zagotavlja pravilen učinek testa. Vsak parameter testa je prepoznan preko črtnih kod na nalepki integrala reagentov. Če se pokvari čitalec črtnih kod se lahko vrednosti vnese ročno.

Operacije aparata so sledeče:

10. Razdelitev kalibratorjev, kontrol ali vzorcev po reakcijskem modulu
11. Razdelitev oblečenih magnetnih delcev
12. Razdelitev razredčila za vzorce
13. Inkubacija
14. Spiranje s tekočino Wash/System
15. Razdelitev antigena *T. gondii* po reakcijskem modulu
16. Razdelitev konjugata po reakcijskem modulu
17. Inkubacija
18. Spiranje s tekočino Wash/System
19. Dodatek Starter Kit-a in merjenje emitirane svetlobe

Kontrolni postopki

Kontrolo kvalitete je priporočeno opraviti enkrat na dan uporabe aparata. Če lokalna priporočila ali zahteve priporočajo drugače, se je potrebno ravnati v skladu z njimi.

LIAISON kontrole so dostopne za notranjo kontrolo kvalitete. Če rezultati kontrol ležijo izven pričakovanega območja, je potrebno izvesti kalibracijo in ponoviti kontrolo kvalitete.

Vrednotenje rezultatov

Aparat avtomatično izračuna koncentracije IgM protiteles parazita *T. gondii* (izražene v AU/mL) in oceni rezultate.

Območje merjenja. 0 do 160 AU/ml *Toxoplasma gondii* IgM.

Vzorci, ki imajo večjo koncentracijo protiteles kot je merilno območje aparata, se lahko razredči s funkcijo Dilute (priporočljivo redčenje je 1:20) in ponovno izmeri. Rezultate aparat zatem avtomatično pomnoži s faktorjem redčitve, da se dobi pravilna vrednost. Količina redčila v integralu omogoča redčitev 15 vzorcev.

Nadaljevanje priloge E: Navodila za encimski test Liaison Toxo IgM CLIA.

Rezultate vzorcev s IgM protitelesi parazita *T. gondii* se interpretira sledeče:

- Vzorci s koncentracijo IgM protiteles pod 6 AU/mL se ocenijo kot negativni.
- Vzorci s koncentracijo IgM protiteles med 6 in 8 AU/mL se ocenijo kot mejni. Za zanesljivo klinično interpretacijo je priporočljivo dodatno testiranje.
- Vzorci s koncentracijo IgM protiteles 8 AU/mL ali več se ocenijo kot pozitivni.

Negativen rezultat ne izključi vedno akutne okužbe. Če se sumi na okužbo s *T. gondii* kljub negativnemu rezultatu, je potrebno zbrati drugi vzorec in testirati v roku enega ali dveh tednov.

Pozitiven rezultat kaže prisotnost IgM protiteles zaradi akutne okužbe ali preteklo okužbo z dolgo obstojno koncentracijo IgM protiteles.

Diagnoza nalezljive bolezni ne bi smela biti postavljena na osnovi enega samega rezultata testa. Ugotovljena bi morala biti v povezavi s kliničnimi znaki, ostalimi diagnostičnimi postopki in zdravnikovo presojo.

Dodatno:

LIAISON Toxo IgM kit je narejen za merjenje koncentracije IgM protiteles *T. gondii* z največjo občutljivostjo, da zazna protitelesa že zelo na začetku akutne okužbe. Ker včasih *T. gondii* IgM protitelesa vztrajajo v krvi dolgo časa, so lahko rezultati vzorcev s takimi protitelesi pozitivni. V takih primerih mora laboratorij uvesti dodatne teste (na primer merjenje avidnosti IgG protiteles ali dodaten test za merjenje IgM protiteles), da je interpretacija testov enostavnejša. Laboratorij lahko prevzame tudi višjo mejno (cut-off) vrednost, da se poveča diagnostična specifičnost LIAISON Toxo IgM kita. Koncentracija toksoplazemskih IgM protiteles se močno poveča v zgodnjih faza okužbe, toda dolgo vztrajajoča IgM protitelesa ponavadi vztrajajo v nizkih koncentracijah preden izginejo: okno IgM pozitivnosti je med okužbo raztegnjeno do zgodnje faze okužbe. Tveganje za neodkritje akutne okužbe je malenkostno in še dodatno zmanjšano z zbiranjem drugih vzorcev en ali dva tedna po prvem od negativnih pacientov.

Če je izbrana ta druga možnost, se rezultate interpretira sledeče:

- Vzorci s koncentracijo IgM protiteles pod 10 AU/mL se ocenijo kot negativni.
- Vzorci s koncentracijo IgM protiteles 10 AU/mL ali več se ocenijo kot pozitivni.