

ROZPOZNAWANIE TOKSOPLAZMOZY WRODZONEJ *IN UTERO* ZA POMOCĄ BADANIA PŁYNU OWODNIOWEGO METODĄ REAKCJI ŁAŃCUCHOWEJ POLIMERAZY

ELŻBIETA GOŁĄB¹, DOROTA NOWAKOWSKA², MARIA WALOCH¹,
TADEUSZ H. DZBEŃSKI¹, KRZYSZTOF SZAFLIK³ I JAN WILCZYŃSKI²

¹Zakład Parazytologii Lekarskiej, PZH, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa;

²Klinika Medycyny Matczyno-Płodowej, ICZMP, ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź;

³Zakład Ultrasonografii, ICZMP, ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź

ABSTRACT. Detection of congenital toxoplasmosis *in utero* with a polymerase chain reaction on amniotic fluid. To establish a prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis the PCR test was done on amniotic fluids from 47 women suspected of primary *Toxoplasma* infection during pregnancy. Fragments of *Toxoplasma* B1 gene were found in 5 examined samples. Positive tests were confirmed by mouse inoculation or by serologic testing of newborns. It was concluded that the PCR performed on amniotic fluid should be recommended for the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis, however, negative results of the test can not rule out congenital infection.

Key words: amniotic fluid, diagnosis, PCR, *Toxoplasma gondii*.

WSTĘP

Toksoplazmoza jest jedną z najczęściej występujących inwazji pasożytniczych. Przebieg toksoplazmozy u osób immunokompetentnych jest na ogół bezobjawowy, jednak u płodów (Foulon i wsp. 1999b) oraz u pacjentów z niedoborami immunologicznymi (Ambroise-Thomas 2001) toksoplazmoza stanowi przyczynę groźnych następstw. Inwazja pierwotna u kobiety we wczesnym okresie ciąży rzadko prowadzi do zarażenia płodu, powodując jednak poważne powikłania ze strony ośrodkowego układu nerwowego i narządu wzroku oraz opóźnienie rozwoju psychoruchowego. Zarażenie płodu w ostatnim trymestrze ciąży jest natomiast w przeważającej liczbie przypadków początkowo bezobjawowe, ale u około 80% zarażonych dzieci, w ciągu pierwszych lat życia rozwija się zapalenie siatkówki i naczyńówki, prowadzące niekiedy do ślepoty. Wczesne rozpoznanie zarażenia płodu jest bardzo istotne, ponieważ leczenie ciężarnej zmniejsza ryzyko powikłań toksoplazmozy wrodzonej u dziecka (Foulon i wsp. 1999b). Izolacja pasożyta z płynu owodniowego pozwala na pewne rozpoznanie toksoplazmozy wrodzonej, procedura izolacyjna wymaga jednak kilkutygodniowego okresu oczekiwania na wynik,

dlatego próby biologiczne są zastępowane reakcją łańcuchową polimerazy (PCR). PCR, oparta na zasadzie wielokrotnego powielania materiału genetycznego *in vitro*, pozwala na wykrywanie nawet pojedynczych fragmentów genomu *Toxoplasma gondii* w czasie 24 godzin, z czułością wyższą od uzyskiwanej przy zastosowaniu metod izolacyjnych (Hohlfeld i wsp. 1994).

W ramach współpracy pomiędzy Zakładem Parazytologii Lekarskiej PZH w Warszawie a Kliniką Medycyny Matczyno-Płodowej ICZMP w Łodzi, od roku 1999 prowadzone są badania dotyczące wykrywania przypadków toksoplazmozy wrodzonej *in utero* z wykorzystaniem metody PCR, prób biologicznych oraz badań serologicznych i klinicznych.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiło 47 próbek płynu owodniowego uzyskanych w trakcie zabiegu amniopunkcji pod kontrolą ultrasonografii. W 32 przypadkach wskazaniem do zabiegu było stwierdzenie serologicznych markerów pierwotnej inwazji toksoplazmowej, tj. obecności przeciwciał toksoplazmowych klasy M i/lub A w surowicy krwi matki albo niskiej awidności przeciwciał toksoplazmowych klasy G (Dzbeński 1999). U pozostałych 15 ciężarnych amniopunkcję wykonano z innych wskazań medycznych.

W próbkach surowicy krwi wszystkich badanych pacjentek wykazano obecność przeciwciał klasy G stosując odczyn immunofluorescencji pośredniej (OIF). Toksoplazmowe IgM wykryto w surowicy 32 spośród 47 badanych pacjentek (Abbott IMX), natomiast swoiste IgA wykryto w 22 z 39 przebadanych próbek (Platelia Toxo IgA, Bio-Rad). Spośród 22 zbadanych próbek surowicy krwi w 5 stwierdzono niski, a w 2 graniczny indeks awidności toksoplazmowych IgG (Vidas Toxo IgG Avidity, bioMérieux).

Wykonano 20 prób biologicznych. Procedura próby polegała na inokulowaniu 1 ml płynu owodniowego do jamy otrzewnowej niezarażonych myszy. Zwierzęta przetrzymywano przez 6 tygodni, po czym pobierano im krew z serca dla oznaczenia poziomu przeciwciał toksoplazmowych (test Toxo-ScreenDA, bioMérieux). We wszystkich przypadkach do inokulacji wykorzystywano po 2 myszy szczepu CFW/Pzh. Każdy przypadek serokonwersji u myszy przyjmowano za dodatnią próbę biologiczną.

Płyny owodniowe badano metodą PCR dla wykrycia fragmentu genu B1 *T. gondii* o wielkości 461 par zasad, wykorzystując startery T15 T15-5'-ACC TAG TAT CGT GCG GCA ATG TGC C-3' i T16-5'-TGG TGC GAC GGG AGT GAA GTC ATC C-3'.

DNA, niezbędne do reakcji PCR, izolowano z osadu płynu owodniowego uzyskanego po wirowaniu próbek o objętości 3ml przez 15 min przy $1750 \times g$. Osad zawieszano w 1 ml PBS i dzielono na 200 μ l porcje, które trawiono proteinazą K w stężeniu 20 mg/ml buforu o składzie: 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,1 mg/ml żelatyna, 0,5% Tween 20, w temp.

55°C przez 1 godz. Po inaktywacji proteiny K przez ogrzewanie w temp. 95°C w czasie 15 min, próbkę wirowano przy $10\,000 \times g$ przez 10 min, a powstały supernatant wykorzystywano do reakcji PCR (Gołąb i Waloch 2002).

Amplifikacja DNA przebiegała, po wstępnej aktywacji polimerazy (HotStarTaq DNA Polymerase, Qiagen), w czasie 15 min przy 95°C, w 35 kolejnych cyklach, według schematu: 1 min/94°C, 1 min/55°C, 2 min/72°C z końcowym etapem wydłużania łańcucha przeprowadzanym w 72°C przez 5 min. Mieszanka reakcyjna o objętości 50 µl zawierała: 1 × PCR Buffer (Qiagen), 1 × Q-Solution (Qiagen), 0,2 mM każdego z dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5 µM każdego ze starterów, 2,5U Taq DNA Polymerase i 10 µl DNA próbki. Wyniki reakcji PCR odczytywano w świetle UV, po wykonaniu elektroforetycznego rozdzielania produktu reakcji w 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny.

WYNIKI

DNA *Toxoplasma gondii* wykryto w 5 płynach owodniowych. W 3 przypadkach wynik PCR potwierdzono pozytywnym rezultatem próby biologicznej. W pozostałych dwóch przypadkach zarażenie potwierdzono po urodzeniu, wykrywając w surowicy krwi dzieci swoiste przeciwciała klasy M lub M i A (Tabela 1).

Tabela 1. Zestawienie wyników badań w kierunku toksoplazmozy w przypadkach obecności DNA *T. gondii* w płynie owodniowym

Nr próbki	Wynik badania serologicznego matki	Amniopunkcja (tydzień ciąży)	Wynik próby biologicznej	Wynik badania serologicznego noworodka
1/99	IgG + (409jm (IU) OIF), IgM +, IgA +	38	nie wykonywano	IgM +
23/99	IgG + (1638jm (IU) – OIF), IgM +, IgA + wysoka awidność IgG (0,372)	34	nie wykonywano	IgM +
18/00	IgG + (128jm (IU) – OIF), IgM +, IgA +, wysoka awidność IgG (0,327)	33	+	IgM –
64/01	IgG + (25jm (IU) – OIF), IgM +, IgA + niska awidność IgG (0,058)	26	+	IgM –, IgA –
60/01	IgG + (1638jm (IU) – OIF), IgM +, IgA + wysoka awidność IgG (0,353)	29	+	IgM +, IgA +

We wszystkich obserwowanych przypadkach, pomimo ujemnych wyników badania płynu owodniowego, przeprowadzono postnatalne badania serologiczne, stwierdzając u jednego z noworodków przeciwciała toksoplazmowe klasy A w surowicy krwi pępowinowej. W próbce krwi pobranej od tego dziecka w trzeciej dobie życia wynik dla toksoplazmowych IgA był wątpliwie dodatni.

DYSKUSJA

W nowoczesnej diagnostyce toksoplazmozy wrodzonej, wykrywanie fragmentów DNA *T. gondii* w próbkach płynu owodniowego wykorzystuje się w celu wczesnego stwierdzenia i terapii zarażenia *in utero*. Gratzl i wsp. (1998) wykazywali 100% czułość metody PCR przy badaniu płynu owodniowego, natomiast Romand i wsp. (2001), badając grupę 270 ciężarnych z pierwotną inwazją *T. gondii*, określili czułość PCR dla analogicznego materiału na 64%. Foulon i wsp. (1999a) w przeprowadzonych badaniach wielośrodkowych wykazali 81% czułość i 96% swoistość próby biologicznej. Autorzy stwierdzili ponadto, że skojarzenie PCR do wykrywania *T. gondii* w płynie owodniowym z metodą inokulacji myszy, zwiększa do 91% czułość obu metod w wykrywaniu zarażenia płodowego.

Według Romand i wsp. (2001), czułość badania PCR jest najwyższa, gdy do zarażenia dochodzi w drugim trymestrze ciąży. Wniosek ten wyciągnięto na podstawie obserwacji, że większość wyników fałszywie ujemnych uzyskuje się podczas badania próbek pobieranych od pacjentek zarażonych przed 17 albo po 21 tygodniu ciąży. W omawianym przez nas przypadku podejrzenia toksoplazmozy wrodzonej u noworodka, u którego uzyskano negatywny wynik badania metodą PCR płynu owodniowego oraz stwierdzono po urodzeniu swoiste IgA, próbkę płynu owodniowego pobrano w warunkach aseptycznych w trakcie porodu. Wyniki badań serologicznych matki, wykazujące obecność swoistych przeciwciał IgA, IgM i IgG o niskim indeksie awidności (0,075) wskazywały, że do zarażenia mogło dojść w ostatnim trymestrze ciąży, kiedy prawdopodobieństwo uzyskania wyniku fałszywie ujemnego przy badaniu płynu owodniowego było wysokie. Należy ponadto nadmienić, że badanie serologiczne noworodka wykonywano przed upływem 10 doby życia za pomocą testu Platelia Toxo IgA, który nie pozwala na różnicowanie przeciwciał matki i dziecka, nie można więc wykluczyć, że wykryte IgA były pochodzenia matczynego (Pinon i wsp. 2001). W omawianym przypadku nie ustalono rozpoznania toksoplazmozy wrodzonej, ponieważ w czasie składania pracy do druku nie zebrano kompletu badań monitorujących.

Badania kontrolne będą również przeprowadzone u pozostałych noworodków, u których nie potwierdzono podejrzenia toksoplazmozy wrodzonej badaniem płynu owodniowego lub badaniem serologicznym w okresie poporodowym. We krwi badanych noworodków nie stwierdzono wprawdzie serologicznych markerów inwazji, jednak ich matki otrzymywały w czasie ciąży leki przeciwtoksoplazmowe, które mogły wpłynąć na obraz swoistej odpowiedzi immunologicznej dzieci (Remington i Desmots 1990). Według Foulon i wsp. (1999a) wartość prognostyczna ujemnego wyniku badania w kierunku swoistych IgM i IgA u noworodka zarażonego *in utero* wynosi odpowiednio 84% i 83%, a badania przesiewowe noworodków wykrywają od 70% do 80% przypadków toksoplazmozy wrodzonej (Remington i wsp. 2001). Uważa się, że

im wcześniej doszło do zarażenia w okresie ciąży, tym rzadziej można wykryć swoiste IgM i IgA u noworodka (Foulon i wsp. 1999a). Ostateczne rozpoznanie lub wykluczenie zarażenia jest możliwe po przeprowadzeniu kontrolnych badań serologicznych podejmowanych do ukończenia pierwszego roku życia.

Podsumowując uzyskane dotychczas wyniki można stwierdzić że:

- metoda PCR wykorzystana do amplifikacji DNA *T. gondii* w płynach owodniowych pozwala na rozpoznanie większości przypadków toksoplazmozy wrodzonej i powinna być polecana jako badanie prenatalne u kobiet ciężarnych z podejrzeniem pierwotnej inwazji toksoplazmowej;
- negatywny wynik PCR z płynu owodniowego nie wyklucza toksoplazmozy wrodzonej u dziecka.

LITERATURA

- Ambrose-Thomas P. 2001 Parasitic diseases and immunodeficiencies. *Parasitology* 122 Suppl: S65–71.
- Dzbeński T.H. 1999. Zasady diagnostyki laboratoryjnej toksoplazmozy. W: *Toksoplazmoza*. (Red. B. Mlewska-Bobula). Biuro Gamma Chris-Comp, Warszawa, 31–39.
- Foulon W., Pinon J.M., Stray-Pedersen B., Pollak A., Lappalainen M., Decoster A., Villena I., Jenum P.A., Hayde M., Naessens A. 1999a. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: a multicenter evaluation of different diagnostic parameters. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 181: 843–847.
- Foulon W., Villena I., Stray-Pedersen B., Decoster A., Lappalainen M., Pinon J.M., Jenum P.A., Hedman K., Naessens A. 1999b. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: A multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 180: 410–415.
- Gołąb E., Waloch M. 2002. Łańcuchowa reakcja polimerazy w diagnostyce toksoplazmozy ośrodkowego układu nerwowego: wpływ metody izolacji DNA z próbek płynu mózgowo-rdzeniowego na wynik reakcji. *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia* 54: 87–91.
- Gratzl R., Hayde M., Kohlhauser C., Hermon M., Burda G., Strobl W., Pollak A. 1998. Follow-up of infants with congenital toxoplasmosis detected by polymerase chain reaction analysis of amniotic fluid. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17: 853–858.
- Hohlfeld P., Daffos F., Costa J.M., Thulliez P., Forestier F., Vidaud M. 1994. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with polymerase chain reaction test on amniotic fluid. *The New England Journal of Medicine* 331: 695–699.
- Pinon J.M., Dumon H., Chemla C., Franck J., Petersen E., Lebech M., Zufferey J., Bessieres M.H., Marty P., Holliman R., Johnson J., Luyasu V., Lecolier B., Guy E., Joynson D.H.M., Decoster A., Enders G., Pelloux H., Candolfi E. 2001. Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M, and A antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 2267–2271.
- Remington J.S., Desmonts G. 1990. Toxoplasmosis. In: *Infectious diseases of the fetus and newborn infant* (Eds. J. S. Remington and J. O. Klein). W.B. Saunders Company Philadelphia, 89–195.
- Remington J.S., McLeod R., Thulliez P., Desmonts G. 2001. Toxoplasmosis. In: *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. (Eds. J.S. Remington and J. O. Klein) 5th Ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 207–320.
- Romand S., Wallon M., Franck J., Thulliez P., Peyron F., Dumon H. 2001. Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. *Obstetrics & Gynecology* 97: 296–300.