

ZASTOSOWANIE AWIDNOŚCI SWOISTYCH PRZECIWCIAŁ IgG DLA RÓŻNICOWANIA AKTYWNEGO I PRZEWLEKŁEGO OKRESU ZARAŻENIA *TOXOCARA CANIS*

WITOLD RYCHLICKI

Katedra i Klinika Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych, Akademia Medyczna,
ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań

ABSTRACT. Use of specific immunoglobulin G antibody avidity in the differential diagnosis of active and chronic *Toxocara canis* infections. To differentiate between acute and past *Toxocara canis* infections, a modified enzyme-linked immunosorbent assay, based on the dissociation of antigen-antibody complex with 6 M urea solution was used to measure levels of avidity of specific immunoglobulin G antibody against *Toxocara canis* excretory-secretory antigen. IgG avidity index was determined in the sera of 212 patients, divided into two groups with various stages of *Toxocara* infection. Patients were classified according to time period, from the onset of clinical symptoms or first positive serology result. Low IgG avidity index was found in the sera of 6.6% of patients in the acute phase, and all samples from the chronic stage of infection were characterized by high avidity values above 0.5 (mean 0.74). It was documented, that the avidity test for specific IgG antibodies is a valuable diagnostic method that helps to distinguish the early from the later phase of *Toxocara canis* infection. Indications for anti-parasitic treatment according to immunological activity of *Toxocara* infection were discussed.

Key words: IgG avidity, stages of infection, *Toxocara canis*, toxocarosis.

WSTĘP

Toksokaroza uważana jest obecnie za jedną z najbardziej rozpowszechnionych chorób pasożytniczych w krajach uprzemysłowionych. Wynika to z faktu stałego wzrostu liczby zwierząt domowych, większej inwazyjności szczepów pasożyta oraz słabszych czynników obronnych żywiciela. Ustalenie rozpoznania klinicznego jest zwykle trudne z uwagi na brak charakterystycznych objawów choroby. Dodatkowo, ze względu na możliwość wystąpienia ciężkich powikłań narządowych w trakcie przebiegu zarażenia pod postacią zespołu larwy wędrującej trzewnej (VLM), jest ona stosunkowo niebezpieczna. Większość rozpoznawanych przypadków VLM nie wykazuje jednak pełnych kryteriów zespołu. Aktualnie obserwuje się wyraźny wzrost częstości występowania infekcji *Toxocara* spp. w postaci skąpoobjawowej bądź utajonej, nie tylko wśród dzieci i młodzieży, ale także u dorosłych (Pawłowski 2001). To niepokojące zjawisko potwierdza zwiększona w ostatnich latach licz-

ba pacjentów hospitalizowanych w Klinice Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych Akademii Medycznej w Poznaniu z podejrzeniem aktywnej toksokarozy. W ostatnich latach, wśród polskiej populacji zamieszkującej zarówno tereny miejskie jak i obszary wiejskie, zarejestrowano istotny odsetek seropozytywności w kierunku *Toxocara* spp. (Mizgajska i wsp. 2001). Długotrwałe utrzymywanie się dodatnich poziomów swoistych przeciwciał po zarażeniu, przy braku pełnej ekspresji klinicznej (Taylor i wsp. 1988), powoduje konieczność różnicowania wczesnego, aktywnego procesu, wymagającego zastosowania swoistego leczenia przeciw pasożytniczego z już nieaktywnym procesem przewlekłym. Dzięki zastosowaniu coraz doskonalszych metod diagnostycznych, w tym również testów immunoenzymatycznych o wysokiej swoistości, ta niebezpieczna antropozoonoza może być wcześniej rozpoznawana już na etapie aktywnego zarażenia (Pawłowski i Mizgajska 2002).

Główne cele przedstawianej pracy badawczej powstały w związku z potrzebą wprowadzenia nowego parametru laboratoryjnego dla różnicowania odmiennych stadiów choroby i obejmują one: (i) ocenę klinicznej i immunologicznej aktywności zarażenia *Toxocara canis* poprzez wykorzystanie pomiaru awidności swoistych przeciwciał klasy IgG, (ii) określenie częstości występowania przypadków we wczesnym, aktywnym stadium procesu chorobowego oraz (iii) ustalenie racjonalnych wskazań do prowadzenia swoistego leczenia przeciw pasożytniczego w zależności od oceny profilu immunologicznego pacjenta.

MATERIAŁ I METODY

Badania epidemiologiczno-kliniczne i serologiczne przeprowadzono w latach 2002-2003 u wybranych 212 pacjentów hospitalizowanych w Klinice Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych w Poznaniu z powodu toksokarozy. Wśród badanych były 82 kobiety (38,7%) i 69 mężczyzn (32,5%) w wieku od 14 do 71 lat (średnio 45,2 lat) oraz 61 dzieci (28,8%) od 1 do 14 lat (średnio 7,2 lat).

Badani pacjenci pochodzili z różnych środowisk: (i) z miast województwa wielkopolskiego – 45 osób (21,2%), (ii) z miasta Poznania i terenów podmiejskich – 22 osoby (10,4%), (iii) z obszarów wiejskich województwa wielkopolskiego – 120 osób (56,7%), (iv) spoza regionu Wielkopolski – 25 osób (11,7%). Pacjenci zostali podzieleni na dwie grupy w oparciu o kryterium czasu, jaki upłynął od wystąpienia pierwszych objawów toksokarozy i/lub od pierwszego oznaczenia miana swoistych przeciwciał IgG dla *Toxocara canis* w związku z podejrzeniem o tę chorobę. Do grupy A – z wczesnym okresem zarażenia – zakwalifikowano 182 pacjentów hospitalizowanych w okresie do 5 miesięcy od wystąpienia objawów klinicznych i/lub dodatnich odczynów swoistych przeciwciał. W tej grupie badanych znalazły się również 32 osoby (13 kobiet, 9 mężczyzn, 10 dzieci) z terenów o udokumentowanym, szczególnie silnym skażeniu gleby jajami *Toxocara* spp. Grupę B – w późnym etapie zarażenia – stanowiło 30 chorych z (i) długotrwałe utrzymujący-

mi się dodatnimi wartościami swoistych przeciwciał IgG i z co najmniej rocznym czasem trwania zarażenia od momentu rozpoznania lub (ii) osoby wielokrotnie leczone z powodu toksokarozy (grupa kontrolna).

Wszyscy hospitalizowani poddani zostali przy przyjęciu rutynowym badaniom serologicznym za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA (Bordier Affinity Products, Crissier, Szwajcaria) w celu wykrycia lub weryfikacji dodatnich odczynów w kierunku *Toxocara* spp. Test wykrywał dodatnie poziomy swoistych immunoglobulin klasy G (IgG), skierowanych przeciwko antygenom ekskrecyjno-sekrecyjnym larw *Toxocara canis*. W dalszej diagnostyce seroimmunologicznej u badanych osób wykluczono możliwość występowania niespecyficznych reakcji krzyżowych z antygenami *Trichinella spiralis*, *Echinococcus granulosus* oraz *Taenia solium*.

W badaniach doświadczalnych wykorzystano test immunoenzymatyczny ELISA (TEST-LINE Clinical Diagnostics, Brno, Republika Czeska) celem oznaczenia wskaźnika awidności (AI) z wykorzystaniem 6 M roztworu mocznika oraz wyznaczenia współczynnika pozytywności (PI). Test wykonywano zgodnie z zaleceniami producenta. Do odpowiednich dołków polistyrenowych płytki mikrotitracyjnej, opłaszczonych uprzednio antygenem pasożyta, zostały dodane surowice kontrolne – negatywna, wysoko dodatnia i graniczna (cut-off) oraz badane surowice pacjentów rozcieńczone w stosunku 1:200, po 100 μ l na studzienkę. Analizowane surowice były testowane w dwóch niezależnych rzędach płytki titracyjnej. Po pierwszym etapie 60 min. inkubacji w temperaturze 37°C i związaniu swoistych immunoglobulin z antygenami *T. canis*, pierwsza część studzienek była płukana 4 razy w buforze płuczającym i pozostawiana pusta. Do drugiej części płytki dodawano po 200 μ l roztworu 6 M mocznika i poddawano inkubacji przez 20 minut w temp. 27°C, doprowadzając do oddzielenia części swoistych przeciwciał słabo związanych z antygenem. Po 4-krotnym płukaniu płytek, jak poprzednio, swoiste przeciwciała IgG związane z antygenem zostały uwidocznione przez zastosowanie enzymatycznego substratu, w ilości po 100 μ l do każdego dołka płytki. Po 12 min. inkubacji w ciemności, w temperaturze pokojowej, reakcję zatrzymywano przez dodanie po 100 μ l 1 M roztworu NaOH uzyskując żółte zabarwienie zawartości studzienek. Gęstość optyczną barwnego produktu reakcji (OD) mierzono względem pustego substratu, za pomocą automatycznego spektrofotometru Humareader Single (Human GmbH, Wiesbaden, Niemcy) przy pojedynczej długości fali 405 nm.

Pomiar gęstości optycznej obejmował zarówno studzienki inkubowane z dodatkiem mocznika jak i bez zawartości czynnika osłabiającego połączenie przeciwciała z antygenem. Wyniki pomiaru były przedstawiane jako stosunek gęstości optycznej (OD₄₀₅) próbki surowicy inkubowanej z 6M roztworem mocznika, w odniesieniu do próbki płukanej w standardowym buforze, pomnożony przez 100 i określony jako indeks awidności (AI). W interpretacji wyników przyjęto 3 zakresy wartości indeksu awidności: (1) poniżej 0,40 – niska awidność, (2) od 0,40 do 0,50 – rezultat graniczny oraz (3) powyżej 0,50 – wysoki indeks awidności.

Wielkość absorbancji każdej próbki była dodatkowo porównywana z gęstością optyczną kontrolnych surowic – dodatniej i ujemnej, dołączonych do zestawu. Średnie wartości OD_{405} dla negatywnych próbek kontrolnych, dostarczonych przez producenta wynosiły $0,218 \pm 0,014$ (zakres 0,176-0,312), natomiast dla dodatnich $2,226 \pm 0,021$ (zakres 1,750-2,640). Wartość odcięcia (cut-off) badanej serii testu, jako średnia arytmetyczna gęstości optycznej z 6 niezależnych oznaczeń kontrolnej surowicy granicznej wynosiła $0,889 \pm 0,084$. Dla pełnej interpretacji wyników badań immunodiagnostycznych wyznaczono trzy zakresy pomiarów. Wyniki były interpretowane jako dodatnie, jeżeli wartość gęstości optycznej analizowanej próbki była wyższa od średniej wartości OD kontrolnej surowicy słabo dodatniej (granicznej) dołączonej do zestawu i wynosiła powyżej 0,889. Za wynik ujemny (cut-off – 2 SD) przyjęto wartości absorbancji poniżej 0,721, natomiast za wynik graniczny (od cut-off – 2SD do cut-off) wartości OD od 0,721 do 0,889.

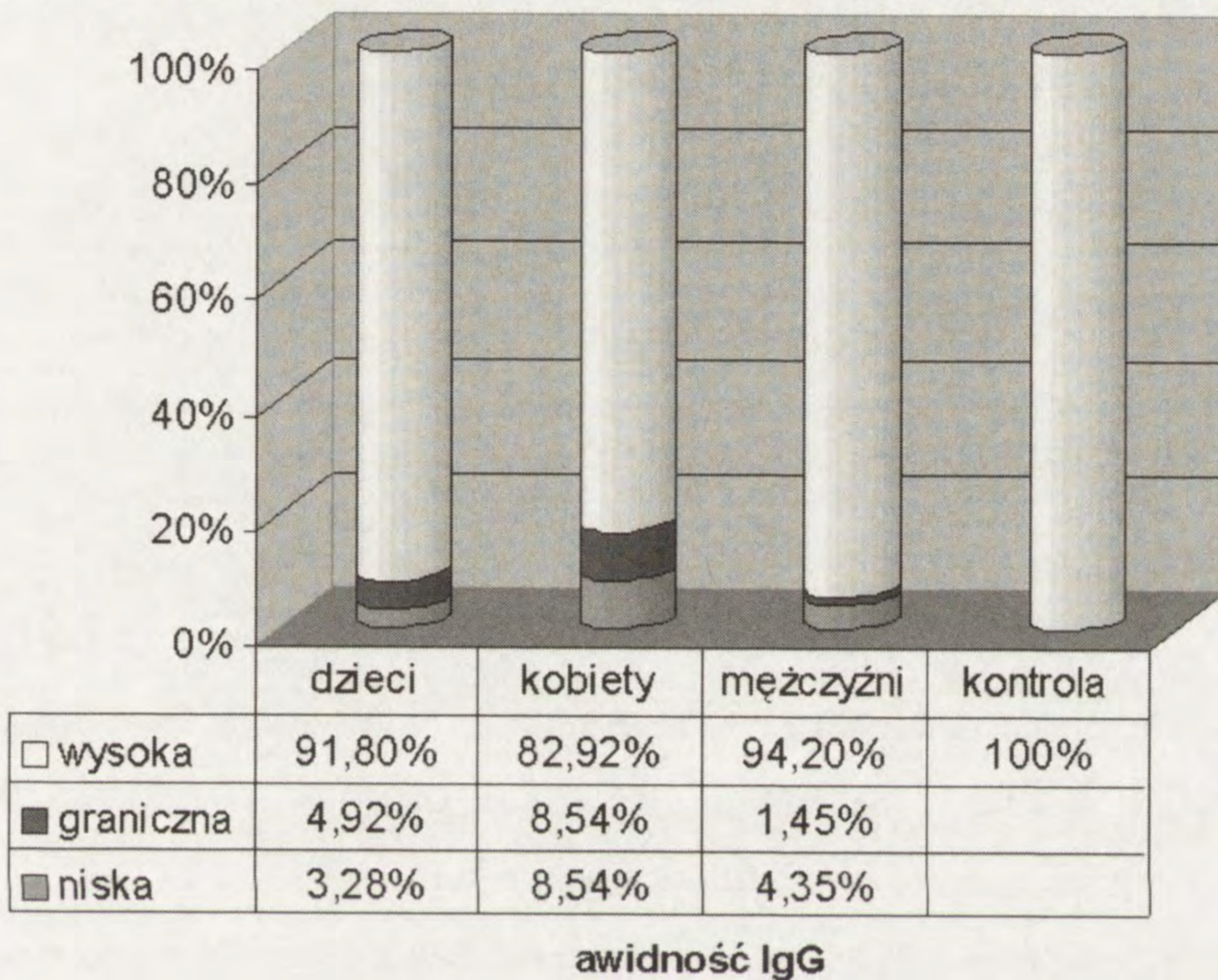
Wszystkie analizowane surowice wykazywały dodatni indeks seropozytywności (IP) obliczany jako stosunek gęstości optycznej badanej próbki do średniej wartości OD kontrolnej surowicy granicznej. IP wynosił średnio $1,881 \pm 0,576$ (zakres 1,003-3,282), co korelowało z obecnością dodatnich poziomów swoistych przeciwciał we wszystkich analizowanych próbkach, wykazaną w rutynowym badaniu referencyjnym testem firmy Bordier Affinity Products.

Ocenę statystyczną wyników badań przeprowadzono w oparciu o test niezależności χ^2 oraz test T-Studenta posługując się komputerową analizą danych przy użyciu programu Microsoft Excel 7.0, uznając za statystycznie istotne wartości $p < 0,05$.

WYNIKI I DYSKUSJA

Spośród 182 pacjentów we wczesnym etapie zarażenia, niski indeks awidności IgG w zakresie od 0,18 do 0,39 (średnio 0,32) stwierdzono tylko u 12 osób (6,6%), natomiast graniczne wartości awidności (średnio 0,46) prezentowało 11 badanych (6,0%). 159 pozostałych surowic pochodzących z prawdopodobnie wczesnego stadium inwazji (87,4%) oraz próbki pobrane od wszystkich 30 osób w późnym okresie zarażenia (100%) wykazywały wysoki indeks awidności od 0,51 do 0,99 (średnio 0,74). Procentowy rozkład wartości awidności u badanych osób przedstawiono na Rys. 1.

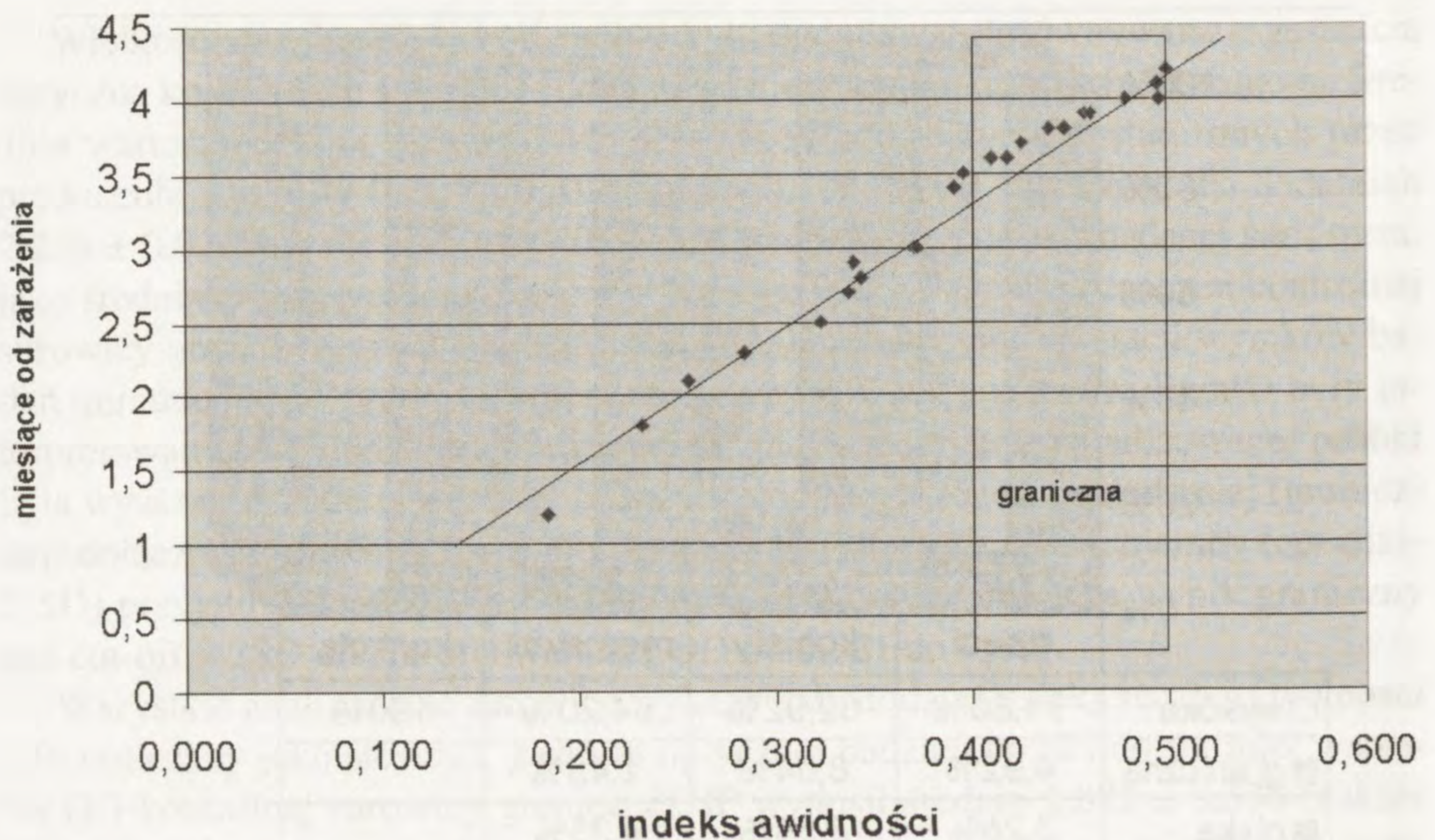
Wartości awidności IgG u chorych badanych we wczesnym okresie zarażenia wykazywały znamiennej korelację z liczbą miesięcy, które upłynęły od momentu wystąpienia pierwszych objawów klinicznych i/lub wykładników laboratoryjnych choroby ($P < 0,001$) (Rys. 2). Nie stwierdzono natomiast zależności między występowaniem niskich i granicznych wartości indeksu awidności a poziomem swoistych przeciwciał w grupie pacjentów we wczesnym okresie zarażenia ($P = 0,653$). Nie wykazano znamiennej korelacji pomiędzy aktualnym poziomem swoistych przeciwciał IgG a długością okresu, który upłynął od momentu stwierdzenia choroby



Rys. 1. Rozkład procentowy niskich, granicznych i wysokich wartości indeksu awidności przeciwciał IgG anti-*Toxocara canis* u badanych pacjentów w zależności od płci i wieku oraz w grupie kontrolnej

dla grupy osób we wczesnym i późnym etapie zarażenia ($P = 0,831$). Spośród 32 osób po silniejszej od pozostałych ekspozycji na zarażenie *Toxocara canis*, niski i graniczny indeks awidności, świadczący o aktywnym procesie, stwierdzono u 4 osób (12,5%), a pozostali badani demonstrowali wysoką awidność, co wskazuje na późny etap zarażenia. Wykazano graniczną zależność pomiędzy wysokością poziomu swoistych przeciwciał IgG w podgrupie pacjentów zamieszkujących tereny silnie skażone jajami *Toxocara canis*, a zwiększoną ekspozycją na antygeny pasożyta ($P = 0,49$). Wyniki pomiaru stężeń przeciwciał, zastosowanym w eksperymencie testem TEST-LINE, wykazywały dobrą korelację z wynikami badań uzyskanymi standardową techniką ELISA firmy Bordier Affinity Products ($r = 0,913$). Udokumentowano znaczący związek występowania toksokarozy u 32 badanych dzieci (52,5 %) z miejscem ich zamieszkania na obszarach wiejskich, gdzie istotne znaczenie odgrywają również dodatkowe czynniki, m.in. rodzaj wykształcenia rodziców, oświata medyczna, promocja zdrowia oraz poziom socjo-ekonomiczny.

Serologiczna ocena czasu trwania zarażenia *Toxocara canis* ma zasadnicze znaczenie u osób, dla których ryzyko rozwoju ciężkich powikłań choroby jest wysokie, a w następstwie braku właściwego postępowania terapeutycznego może doprowadzić do nieodwracalnych zmian w narządach wewnętrznych, szczególnie w narządzie wzroku i ośrodkowym układzie nerwowym. Istnieje zatem potrzeba prowadzenia intensywnego i racjonalnego leczenia w tym groźnym dla pacjenta okresie, w którym mogą jeszcze nie występować charakterystyczne objawy choroby, a układ



Rys. 2. Korelacja niskich i granicznych wartości indeksu awidności IgG z czasem trwania zarażenia immunologiczny tworzy już początkową, słabą odpowiedź organizmu na obecność wędrującej larwy trzewnej.

Dotychczas, w celu wczesnej diagnostyki inwazji *Toxocara* spp. próbowano wykorzystać różne parametry immunodiagnostyczne (Nunes i wsp. 1999, Loukas i wsp. 2000, Magnaval i wsp. 2001). Dane literaturowe dotyczące korelacji wartości rutynowych testów serologicznych w odniesieniu do intensywności inwazji i jej ekspresji klinicznej są fragmentaryczne (Brunello i wsp. 1986, Dubinsky i wsp. 2000). Wykrywanie immunoglobulin klas IgA i IgM nie zawsze pozwala na wiarygodną identyfikację aktualnego, wczesnego stadium zarażenia. Obecność krążących, swoistych przeciwciał klasy IgM i IgA pojawiających się w początkowej, wczesnej fazie zarażenia, nierzadko utrzymuje się przez stosunkowo długi okres czasu (Fenoy i wsp. 1992, Reiterová i wsp. 2003). W innych przypadkach, np.: różyczki i cytomegalii, swoiste przeciwciała klasy IgM mogą być również wykrywane w zarażeniach wtórnych (reinfekcjach) lub reaktywacjach przebytego w przeszłości zarażenia (Thomas i wsp. 1992, Lazzarotto 2000). Zdaniem wielu autorów, za najbardziej wartościową metodę rozróżniania tych stadiów choroby, uznaje się test oparty na pomiarze awidności specyficznej immunoglobuliny IgG (Korhonen i wsp. 1999, Hubner i wsp. 2001). Obecnie w literaturze nie wspomina się, oprócz awidności, o innych markerach immunologicznych, które mogłyby bardzo dokładnie odzwierciedlać przemianę procesu aktywnego w przewlekły.

Pomiar awidności swoistych przeciwciał IgG może być uzupełniającą, pomocniczą procedurą diagnostyczną, szczególnie w skąpoobjawowych, seropozytywnych przypadkach toksokarozy, lecz niezwykle trudnych klinicznie dla różnicowa-

nia pod względem aktywności toczącego się procesu chorobowego. W rutynowej diagnostyce metodą ELISA można wykryć przeciwciała przeciwtoksokarozowe obecne w surowicy krwi zarówno od kilku miesięcy jak i od wielu lat od momentu zarażenia (Camargo i wsp. 1992, Hubner i wsp. 2001). Ich wysokość zwykle nie koreluje ze stanem klinicznym pacjenta, ani intensywnością inwazji, skłaniając lekarza do rozpoznawania najczęściej przewlekłej postaci toksokarozy i nierzadko zaniechania dalszego leczenia. Jednakże wśród tej grupy chorych, mogą znajdować się osoby prezentujące aktywną postać toksokarozy, która nie zawsze w pełni będzie manifestowała się klinicznie, ale może się wyrażać tylko w postaci niskich wartości indeksu awidności. W takich właśnie przypadkach, pomiar awidności IgG może mieć decydujące znaczenie dla ustalenia właściwego rozpoznania oraz sposobu leczenia, co pozwoli na uniknięcie niebezpiecznych powikłań narządowych w przebiegu toksokarozy. U większości badanych, u których wykazano późny etap zarażenia, nie powinno zalecać się farmakoterapii, mimo długotrwanie utrzymujących się dodatnich poziomów swoistych przeciwciał IgG.

W przedstawianej pracy, indeks awidności swoistych przeciwciał IgG, oznaczony techniką ELISA, wykazuje porównywalną wartość diagnostyczną z poprzednimi doniesieniami innych autorów, dotyczącymi częstości występowania przeciwciał IgG charakteryzujących się niską awidnością (Korhonen i wsp. 1999, Hubner i wsp. 2001).

Ostatnie wzmianki w literaturze dotyczą propozycji zastosowania pomiaru awidności swoistych przeciwciał IgG dla odróżnienia reaktywacji od infekcji pierwotnej w szeregu ciężkich schorzeń, takich jak np.: gruźlica, zapalenie ozębnej i infekcje wirusowe (Gutierrez i Maroto. 1996).

Korzyści pacjenta wynikające z szybkiego rozpoznania wczesnego stanu zarażenia to przede wszystkim: przyspieszone rozpoczęcie swoistej terapii przeciw pasożytniczej w ramach hospitalizacji, z doborem odpowiedniej dawki leku, szansa na wyższą skuteczność podjętego leczenia mimo braku jednoznacznych wykładników klinicznych choroby oraz zmniejszenie liczby wędrujących larw trzewnych i szansy dotarcia do narządów, gdzie ich obecność jest obarczona szczególnym ryzykiem.

Ocena awidności swoistych przeciwciał IgG wydaje się być w chwili obecnej niezwykle wartościowym wskaźnikiem laboratoryjnym, pozwalającym na różnicowanie aktywnego i przewlekającego się okresu inwazji, przy użyciu pojedynczej próbki surowicy. Zastosowana metoda diagnostyczna jest jednocześnie bardzo praktyczna, ekonomicznie dostępna i łatwa w wykonaniu.

Reasumując, na podstawie przeprowadzonych badań (1) można wnioskować, że wysokość siły wiązania (awidności) swoistych przeciwciał IgG z antygenem *T. canis* jest cennym wykładnikiem diagnostycznym długości trwania inwazji pasożytniczej i oceny stopnia ryzyka groźnych powikłań narządowych; (2) niskie wartości indeksu awidności okazały się pomocne dla potwierdzenia wczesnego etapu zarażenia *T. canis* i uzasadnienia celowości włączenia leczenia przeciw pasożytniczego;

(3) uzyskanie wysokich wartości awidności pozwoliło na eliminację wielokrotnego leczenia przypadków przebytej ekspozycji lub przewlekłej immunizacji z długotrwanie utrzymującymi się dodatnimi odczynami serologicznymi.

LITERATURA

- Brunello F., Falagiani P., Genchi C. 1986. Enzyme immunoassay (ELISA) for the detection of specific IgG antibodies to *Toxocara canis* ES antigens. *Bollettino dell Istituto Sieroterapico Milanese* 65: 54-60.
- Camargo E.D., Nakamura P.M., Vaz A.J., da Silva M.V., Chieffi P.P., de Melo E.O. 1992. Standardization of dot-ELISA for the serological diagnosis of toxocariasis and comparison of the assay with ELISA. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 34: 55-60.
- Dubinsky P., Akao N., Reiterova K., Konakova G. 2000. Comparison of the sensitive screening kit with two ELISA sets for detection of anti-*Toxocara* antibodies. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 31: 394-398.
- Fenoy S., Cuellar C., Aguila C., Guillen J.L. 1992. Persistence of immune response in human toxocariasis as measured by ELISA. *International Journal for Parasitology* 22: 1037-1038.
- Gutierrez J., Maroto C. 1996. Are IgG antibody avidity assays useful in the diagnosis of infectious diseases? *Microbios* 87: 113-121.
- Hubner J., Uhlikova M., Leissova M. 2001. Diagnosis of the early phase of larval toxocariasis using IgG avidity. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Immunologie* 50: 67-70.
- Korhonen M.H., Brunstein J., Haario H., Katnikov A., Rescaldani R., Hedman K. 1999. A new method with general diagnostic utility for the calculation of immunoglobulin G avidity. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 6: 725-728.
- Lazzarotto T. 2000. Maternal IgG Avidity and IgM detected by blot as diagnostic tools to identify pregnant women at risk of transmitting cytomegalovirus. *Viral Immunology* 13: 137-141.
- Loukas A., Doedens A., Hintz M., Maizels R.M. 2000. Identification of a new C-type lectin, TES-70, secreted by infective larvae of *Toxocara canis*, which binds to host ligands. *Parasitology* 121: 545-554.
- Magnaval J.F., Berry A., Fabre R., Morassin B. 2001. Eosinophil cationic protein as a possible marker of active human *Toxocara* infection. *Allergy* 56: 1096-1099.
- Mizgajska H. 2001. Eggs of *Toxocara* spp. in the environment and their public health implications. *Journal of Helminthology* 75: 147-51.
- Mizgajska H., Jarosz W., Rejmenciak A. 2001. Rozmieszczenie źródeł inwazji *Toxocara* spp. w środowisku miejskim i wiejskim w Polsce. *Wiadomości Parazytologiczne* 47: 399-404.
- Nunes C.M., Tundisi R.N., Heinemann M.B., Ogassawara S., Richtzenhain L.J. 1999. Toxocariasis: serological diagnosis by indirect antibody competition ELISA. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 41: 95-100.
- Pawłowski Z.S. 2001. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. *Journal of Helminthology* 75: 299-305.
- Pawłowski Z.S., Mizgajska H. 2002. Toksokaroza w Wielkopolsce w latach 1990-2000. *Przegląd Epidemiologiczny* 56: 559-565.
- Reiterová K., Tomasovicová O., Dubinský P. 2003. Influence of maternal infection on offspring immune response in murine larval toxocariasis. *Parasite Immunology* 25: 361-368.
- Taylor M.R., O'Connor P., Keane C.T. 1988. The expanded spectrum of toxocaral disease. *Lancet* 1: 692-694.
- Thomas H.I.J., Morgan-Capner P., Enders G., O'Shea S., Caldicott D., Best J.M. 1992. Persistence of specific IgM and low avidity specific IgG1 following primary rubella. *Journal of Virological Methods* 39: 149-155.