

NIEKTÓRE PROBLEMY DIAGNOSTYKI LABORATORYJNEJ INWAZJI *TOXOPLASMA GONDII**

HENRYKA DŁUGOŃSKA

Zakład Immunoparazytologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Uniwersytet Łódzki,
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; E-mail: hdlugo@biol.uni.lodz.pl

ABSTRACT. Selected problems in laboratory diagnostics of *Toxoplasma gondii* infections. The article presents chosen problems concerning laboratory recognition of *Toxoplasma gondii* infections.

Key words: diagnostics, infection, *Toxoplasma gondii*.

Inwazje *T. gondii* mogą być wykryte pośrednio metodami serologicznymi lub bezpośrednio przez stwierdzenie obecności samego pasożyta (histologia, izolacja) lub jego DNA. Metody serologiczne, chociaż obciążone wieloma wadami, są nadal podstawą rutynowej diagnostyki toksoplazmozy. Wykrycie przeciwciał IgM, najwcześniejszego produktu pierwotnej humoralnej odpowiedzi immunologicznej, jest uznawane za wskaźnik niedawnego zarażenia i serokonwersji. Testy do oznaczania IgM cechuje zróżnicowana i zmienna wiarygodność. Ich czułość waha się od 93,3 do 100%, a swoistość – od 49,2 do 99,1% (Liesenfeld i wsp. 1997, Wilson i wsp. 1997). Przyczyną niedoskonałości oznaczeń IgM i interpretacji wyników mogą być przeciwciała antytoksoplazmowe naturalne, przeciwciała IgM typu czynnika reumatoidalnego (RF-IgM) oraz swoiste antytoksoplazmowe IgM, utrzymujące się przez wiele miesięcy lub nawet lat po inwazji.

Naturalne przeciwciała występują u wszystkich dorosłych i dzieci powyżej 3. miesiąca życia, a ich repertuar jest dość zróżnicowany osobniczo. Przeciwciała te rozpoznają najczęściej antygeny toksoplazmy o M_r : 30, 48-50, 105 i 115 kDa (Potasman i wsp. 1986). Nie wiadomo dotychczas, jakie bodźce antygenowe (naturalna flora jelitowa?, antygeny środowiskowe?) wzbudzają ich wytwarzanie.

Przeciwciała IgM pojawiają się zwykle po 1-2 tygodniach od zarażenia, osiągają maksymalne stężenie po 2 miesiącach i stopniowo zanikają. Basiak i wsp. (2001) zaobserwowali pierwsze przypadki ujemnych wyników po 5 miesiącach od inwazji. U niektórych osób IgM mogą jednak utrzymywać się bardzo długo, w skrajnych przypadkach – nawet do 14 lat (Joynson i Guy 2001). Niskie miana tych przeciwciał, w parze z niskimi mianami IgG, mogą sugerować wczesne stadium zarażenia, a przez to mogą być przyczyną decyzji o aborcji (Liesenfeld i wsp. 1997). Te dłu-

*Praca finansowana z grantu KBN 2PO5A 048 26

go utrzymujące się przeciwciała IgM, zwane *clinically non-relevant*, mogą być też przyczyną niepotrzebnego wdrożenia terapii przeciw Pasożytniczej u seropozytywnych (IgG +, IgM +) pacjentów z objawami grypopodobnymi. Meek i wsp. (2003) proponują w takich przypadkach zróżnicowanie „ostrych” i „latentnych” IgM metodą immunoblotingu przeprowadzonego w warunkach nieredukujących z antygenami rekombinowanymi. Wczesne IgM rozpoznają intensywnie dwa antygeny: ROP1 (rhoptry antigen 1) i SAG1 (surface antigen 1), a późne – nie rozpoznają ROP1 i wykazują słabą reakcję z SAG1. Komercyjne dostępne testy immunoenzymatyczne ELISA nie dają możliwości takiego zróżnicowania (Meek i wsp. 2001). Nie można też zastosować dodatkowego znaczenia na awidność wykrywanych IgM, ponieważ w przeciwieństwie do IgG czy IgA, których awidność rośnie wraz z czasem trwania infekcji, przeciwciała IgM nie „dojrzewają”.

W trakcie zaawansowanej odpowiedzi immunologicznej indukowane jest wytwarzanie autoprzeciwciał skierowanych przeciw fragmentowi Fc przeciwciał IgG, są to zwykle przeciwciała izotypu IgM, określane mianem czynnika reumatoidalnego. Czynniki te mogą być usunięte z badanych surowic metodą adsorpcji na inaktywowanych termicznie przeciwciałach klasy IgG (Lindenschmidt 1986). Niektóre firmy oferują gotowe zestawy służące do tego właśnie celu (Avelino i wsp. 2003). Przeciwciała IgM, charakterystyczne dla wczesnej fazy toksoplazmozy, są skierowane głównie przeciw glikoinozitolofosfolipidom, podczas gdy wczesne IgG – przeciwko białkom o masie 30-40 kDa. Stanowi to pewną przeszkodę w przygotowywaniu nowych testów diagnostycznych do wykrywania swoistych przeciwciał IgM anty-*T. gondii*, ze względu na trudności w laboratoryjnej syntezie kompleksowych glikolipidów jako antygenów diagnostycznych (Giraldo i wsp. 2000). Można natomiast rozróżnić „wczesne” i „późne” przeciwciała IgG wykorzystując test mikroaglutynacji z zawiesinami acetonowymi lub formalinowymi (Dannemann i wsp. 1990).

W serodiagnostyce toksoplazmozy stale powraca problem wtórnych IgM, pojawiających się ponownie po dłuższej przerwie u seropozytywnych IgG „+” /IgM „-” pacjentów. Nie wiadomo, czy jest to skutek stymulacji pamięciowych limfocytów pod wpływem ponownego kontaktu z antygenami toksoplazmy (np. wskutek kolejnego egzogenego zarażenia lub reaktywacji latentnego endogenego zarażenia) czy też stymulacji dziewiczych limfocytów (pierwotna odpowiedź immunologiczna) rozpoznających jakiś nowy antygen wnoszony z komórkami kolejnego zarażającego szczepu pasożyta.

Powszechnie akceptowany jest pogląd, że pod wpływem reakcji odpornościowych pierwotne zarażenie *T. gondii* przekształca się z formy ostrej w przewlekłą. Ta przemiana wiąże się z wytworzeniem silnej odporności ochronnej, zabezpieczającej żywiciela przed reinwazją. W 1997 roku Araujo i wsp. zakwestionowali ten pogląd wykazując, że zarażenie myszy z przewlekłą toksoplazmozą szczepem pasożyta innego genotypu prowadzi do rozwoju ostrej toksoplazmozy, oznaczającej

się wysoką śmiertelnością. Cztery lata później Dao i wsp. (2001) potwierdzili możliwość reinwazji u myszy, przy użyciu toksoplazm transfekowanych β -galaktozydazą, umożliwiającą odróżnienie metodą cytochemiczną cyst powstałych po pierwotnym i wtórnym zarażeniu. Obserwacje te mają duże znaczenie z punktu widzenia medycyny ludzkiej i weterynaryjnej oraz diagnostyki, wskazują bowiem, że wytworzona po pierwotnej inwazji odporność może być przełamana. Mogą na to również wskazywać opisane ostatnio bardzo liczne przypadki mieszanych zarażeń u ludzi i zwierząt, wywołanych przez toksoplazmy należące do różnych genotypów. Aspinall i wsp. (2003) używając metody analizy restrykcyjnej produktów PCR genu kodującego antygen powierzchniowy SAG2, ampfikowanych bezpośrednio z próbek klinicznych, wykazali równoczesną obecność pasożytów typu SAG2 I i typu SAG2 II aż w 31% przebadanych materiałów. Villena i wsp. (2004) zwracają uwagę, że nigdy wcześniej nie udało się wykryć mieszanej inwazji przy stosowaniu w diagnostyce etapu wstępnego namnożenia pasożyta metodą inokulacji myszy lub hodowli tkankowych *in vitro*, co wskazuje na możliwość selekcji szczepów jeszcze przed ich genotypowaniem, np. wskutek preferencji jakiegoś żywiciela lub komórek żywicielskich *in vitro*. Sprawę komplikuje jeszcze fakt, że zarażenie niektórymi szczepami toksoplazmy tzw. niekompletnymi (niezdolnymi do tworzenia cyst tkankowych) prowadzi do sterylnej ochronnej odporności, ale tylko w stosunku do niektórych szczepów toksoplazmy określonego genotypu (Freyre i wsp. 2004).

W reakcji amplifikacji toksoplazmowego DNA wykorzystywane są najczęściej sekwencje genów: B1, SAG1 i 18S rDNA. Niewątpliwie metody molekularne znacznie polepszyły diagnozowanie toksoplazmozy wrodzonej, szczególnie *in utero*, toksoplazmozy u pacjentów z upośledzoną odpornością oraz toksoplazmozy ocznej. Czułość metod biologii molekularnej jest bardzo wysoka i w przypadku real-time PCR osiąga wartość $\leq 0,75$ pasożyta na próbkę (Costa i wsp. 2000), ale wydaje się, że ze względów technicznych jest ona w wielu przypadkach nieosiągalna, o czym świadczą wyniki wielośrodkowych badań wykonanych w ramach programu European Research Network on Congenital Toxoplasmosis (Pelloux i wsp. 1998). Potwierdzają to również wyniki polskich badań, w których stwierdzono, że negatywny wynik PCR (gen B1) nie wyklucza toksoplazmozy wrodzonej u dziecka (Gołąb i wsp. 2002). Zdarzają się też badania wskazujące na wyjątkowo niską sprawność metod molekularnych. Na przykład, przy użyciu PCR-B1 wraz z hybrydyzacją Kompalic-Cristo i wsp. (2004) uzyskali dodatnie wyniki tylko u 50% pacjentów IgM-dodatnich i 12,5% pacjentów IgG-dodatnich i IgM-ujemnych. Przy użyciu PCR nie można także zróżnicować aktywnej (tachyzoity) i latentnej (bradyzoity) toksoplazmozy, żywych i martwych oraz zjadliwych i atenuowanych pasożytów. Biorąc te mankamenty pod uwagę, podkreśla się konieczność udoskonalenia i standaryzacji używanych metod molekularnych oraz wykonywanie ich wyłącznie w wybranych specjalistycznych laboratoriach, ponieważ czynniki techniczne zna-

cząco wpływają na prawidłowość otrzymywanych wyników (Bastien 2002).

Reasumując, żadna z metod diagnostycznych toksoplazmozy nie gwarantuje 100% swoistości i czułości, konieczne jest więc stosowanie łączne 2-3 metod, zależnie od formy inwazji, wieku i stanu odpornościowego pacjenta oraz bieżącego celu badań (Joynson i Guy 2001, Robert-Gangneux 2001, Montoya i Liesenfeld 2004). Wydaje się także, że pewnym uzupełnieniem diagnozy i rokowania mogłyby być, niechętnie wykonywane w laboratoriach diagnostycznych, testy komórkowe wraz z określeniem profilu cytokinowego odpowiedzi immunologicznej pacjenta. Yamamoto i wsp. (2000) wykazali, że osoby z bezobjawową toksoplazmozą charakteryzuje wysoki poziom odpowiedzi limfocytów T na antygeny pasożyta (intensywna proliferacja i wytwarzanie IL-12 i interferonu γ oraz silna reakcja nadwrażliwości późnej), podczas gdy w toksoplazmozie ocznej obserwowany jest brak reakcji skórnej, słaba proliferacja limfocytów oraz intensywne wytwarzanie IL-1 i TNF- α .

LITERATURA

- Araujo F., Slifer T., Kim S. 1997. Chronic infection with *Toxoplasma gondii* does not prevent acute disease or colonization of the brain with tissue cysts following reinfection with different strains of the parasite. *The Journal of Parasitology* 83: 521-522.
- Aspinall T.V., Guy E.C., Roberts K.E., Joynson D.H.M., Hyde J.E., Sims P.F.G. 2003. Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications. *International Journal for Parasitology* 33: 97-103.
- Avelino M.M., Campos D., Jr, de Parada J.C.B. de Castro A.M. 2003. Pregnancy as a risk factor for acute toxoplasmosis seroconversion. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 108: 19-24.
- Basiak W., Żarnowska H., Dziubek Z., Kajfasz P. 2001. Przydatność odczynów serologicznych w rozpoznawaniu wczesnej fazy zarażenia *Toxoplasma gondii*. *Przegląd Epidemiologiczny* 55: 475-482.
- Bastien P. 2002. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96: S1/205-215.
- Costa J.-M., Pautas C., Ernault P., Foulet F., Cordonnier C., Bretagne S. 2000. Real-time PCR for diagnosis and follow-up of *Toxoplasma* reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2929-2932.
- Dannemann B.R., Vaughan W.C., Thulliez P., Remington J.S. 1990. Differential agglutination test for diagnosis of recently acquired infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 1928-1933.
- Dao A., Fortier B., Soete M., Plenat F., Dubremetz J.-F. 2001. Successful reinfection of chronically infected mice by different *Toxoplasma gondii* genotype. *International Journal for Parasitology* 31: 63-65.
- Freyre A., Falcón J., Mendez J., Correa O., Morgades D., Rodríguez A.S. 2004. An investigation of sterile immunity against toxoplasmosis in rats. *Experimental Parasitology* 107: 14-19.
- Giraldo M., Cannizzaro H., Ferguson A.J., Almeida I.C., Gazinelli R.T. 2000. Fractionation of membrane components from tachyzoite forms of *Toxoplasma gondii*: differential recognition by immunoglobulin M (IgM) and IgG present in sera from patients with acute or chronic toxoplas-

- mosis. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 1453-1460.
- Gołąb E., Nowakowska D., Waloch M., Dzbeński T.H., Szaflik K., Wilczyński J. 2002. Rozpoznawanie toksoplazmozy wrodzonej *in utero* za pomocą badania płynu owodniowego metodą reakcji łańcuchowej polimerazy. *Wiadomości Parazytologiczne* 48: 311-315.
- Joynson D.H.M., Guy E.C. 2001. Laboratory diagnosis of toxoplasma infection. In: *Toxoplasmosis. A compressive clinical guide*. (Eds. D.H.M. Joynson and T.G. Wreghitt). Cambridge University Press: 296-318.
- Kompalic-Cristo A., Nogueira S.A., Guedes A.L., Frota C., González L.F., Brandão A., Amendoeira M.R., Britto C., Fernandes O. 2004. Lack of technical specificity in the molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98: 92-95.
- Lindenschmidt E.-G. 1986. Demonstration of immunoglobulin IgM class antibodies to *Toxoplasma gondii* antigenic component p35000 by enzyme-linked antigen immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology* 24: 1045-1049.
- Liesenfeld O., Press C., Montoya J.G., Gill R., Isaac-Renton J.L., Hedman K., Remington J.S. 1997. False-positive results in immunoglobulin M (IgM) toxoplasma antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 174-178.
- Meek B., Diepersloot R.J., van Gool T., Speijer D., Peek R. 2003. IgM recognition of recombinant *Toxoplasma gondii* antigens by sera of acutely or latently infected humans. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 45: 45-52.
- Meek B., van Gool T., Gilis H., Peek R. 2001. Dissecting of IgM antibody response during the acute and latent phase of toxoplasmosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 41: 131-137.
- Montoya J.G., Liesenfeld O. 2004. Toxoplasmosis. *The Lancet* 363: 1965-1976.
- Pelloux H., Guy E., Angelici M.C., Aspöck H., Bessières M.H., Blatz R., Del Pezzo M., Girault V., Gratzl R., Holberg-Petersen M., Johnson J., Krüger D., Lappalainen N., Naessens A., Olsson M. 1998. A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. *FEMS Microbiology Letters* 165: 231-237.
- Potasman I., Araujo F.G., Remington J.S. 1986. *Toxoplasma* antigens recognized by naturally occurring human antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* 24: 1050-1054.
- Robert-Gangneux F. 2001. Contribution of new techniques for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Clinical Laboratory* 47: 135-141.
- Villena I. Marle M., Dardé M.-L., Pinon J.-M., Aubert D. 2004. *Toxoplasma* strain type and human disease: risk of bias during parasite isolation? *Trends in Parasitology* 20: 160-161.
- Wilson M., Remington J.S., Clavet C., Varney G., Press C., Ware D., the FDA Toxoplasmosis ad hoc Working Group. 1997. Evaluation of six commercial kits for detection of human immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 3112-3115.
- Yamamoto J.H., Vallochi A.L., Silveira C., Filho J.K., Nussenblatt R.B., Cunha-Neto E., Gazinelli R. T., Belfort R., Jr, Rizzo L.V. 2000. Discrimination between patients with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens. *The Journal of Infectious Diseases* 181: 2018-2022.