

Metody rozpoznawania toksoplazmozy

JACEK SROKA, IRENA ZIOMKO

Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego
– Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Sroka J., Ziomko I.

Diagnostic methods in toxoplasmosis

Summary

The paper describes examination methods used in diagnosing toxoplasmosis in humans and animals with special attention paid to serology techniques: Sabin-Feldman test, indirect fluorescent antibody test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Enzyme-Linked Fluorescent Assay (ELFA), direct agglutination test. New trends in research on toxoplasmosis using molecular biology methods are also presented.

Keywords: toxoplasmosis

U zwierząt gospodarskich inwazja *Toxoplasma gondii* ma zwykle przebieg bezobjawowy, chociaż notowano przypadki z wyraźnym przebiegiem klinicznym, m.in. u owiec, kóz, psów oraz zwierząt futerkowych (18, 19). Zwierzęta rzeźne w znacznym stopniu reagują seropozytywnie z antygenem *T. gondii*. Wykazano, że głównym źródłem zarażenia dla ludzi jest surowe lub poddane niedostatecznej obróbce termicznej mięso, zawierające cysty pierwotniaka (3, 15, 19). Zarażenie *T. gondii* u ludzi jest szczególnie groźne w przypadkach obniżonej odporności oraz dla kobiet w ciąży, ze względu na ryzyko wystąpienia poważnych zmian narządowych oraz wad wrodzonych u płodu. Podstawowym badaniem w kierunku toksoplazmozy jest badanie serologiczne, pozwalające na ujawnienie obecności swoistych przeciwciał. Wykazano powszechność występowania dodatnich odczynów serologicznych zarówno u ludzi, jak i u zwierząt, co znacznie utrudnia diagnostykę świeżych przypadków zarażeń (3, 19). Także w przypadkach osłabienia odporności lub niedostatecznego jej wykształcenia ten rodzaj badań jest niewystarczający i musi być uzupełniony o metody pozwalające na bezpośrednie lub pośrednie stwierdzenie obecności samego pasożyta, jego materiału genetycznego lub antygenów w określonych materiałach biologicznych. W związku z tym istotne znaczenie ma stałe doskonalenie metod diagnostycznych, pozwalających wykryć inwazję oraz określić jej fazę.

Metody pośrednie

W diagnostyce toksoplazmozy metody pośrednie odgrywają podstawową rolę. Najczęściej wykorzystywanym materiałem jest surowica krwi. Bada się również płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn z przedniej komory oka oraz wody płodowe. Podstawowym bada-

niem jest badanie serologiczne pozwalające różnicować ostrą lub przewlekłą fazę choroby. Duże znaczenie przy doborze testu do badań ma jego czułość i swoistość, a także powtarzalność uzyskanych wyników oraz prostota wykonania. Wprowadzony na potrzeby diagnostyki toksoplazmozy system jednostek międzynarodowych (IU/ml) ułatwił porównywanie wyników uzyskiwanych różnymi technikami.

Testem referencyjnym wykonywanym tylko przez wyspecjalizowane laboratoria jest test barwny Sabina-Feldmana (OSF), nazywany „złotym standardem” w diagnostyce serologicznej toksoplazmozy u ludzi. Zasada badania opiera się na cytolitycznym działaniu na pasożyta swoistych przeciwciał w obecności aktywatora, w wyniku czego nie dochodzi do wybarwienia cytoplazmy komórki dodanym barwnikiem. Miano surowicy dodatkowo określa jej rozcieńczenie, przy którym stosunek pasożytów zabarwionych do niezabarwionych wynosi 1 : 1 (13). Test jest również wykorzystywany w badaniu zwierząt, jednak w przypadku niektórych gatunków (m.in. bydła) wyniki okazały się mało specyficzne (3).

Kolejnym testem referencyjnym jest odczyn immunofluorescencji pośredniej (OIF). Antygenem w tym teście są tachyzoity poddane działaniu formaliny. Obecne w badanej surowicy swoiste przeciwciała wiążą się z antygenem utrwalonym na szkiełku, a następnie są wykrywane za pomocą przeciwciał antyglobulinowych znakowanych fluorogenami, np. izotiocyanianem fluoresceiny. Ocenę preparatów dokonuje się w mikroskopie fluorescencyjnym. W przypadku reakcji dodatniej występuje intensywna fluorescencja błony komórkowej tachyzoitów, cytoplazma zaś wybarwia się na czerwono pod wpływem błękitu Evansa. Surowice reagujące ujemnie nie wykazują fluorescencji, obserwuje się

jedynie czerwone zabarwienie toksoplazm. Wysoką zgodność wyników (90-96,8%) OIF oraz OSF wykazało wielu autorów (5, 12, 20). OIF charakteryzuje się dużą swoistością, jednak jego wadą jest możliwość występowania reakcji krzyżowych z czynnikiem reumatoidalnym oraz przeciwciałami przeciwjądrowymi (9).

Jednym z pierwszych testów stosowanych w diagnostyce toksoplazmozy u ludzi był odczyn wiązania dopełniacza (OWD). Czulość tego testu zależy od doboru antygeny, dopełniacza wolnego od przeciwciał, jak również od zastosowania odpowiedniej techniki odczynu. Wykazano, że ponad 9% surowic badanych w OWD wykazuje właściwości antykomplementarne, co jest związane z dużą zawartością lipoprotein w surowicy krwi (20). Przeciwciała wiążące dopełniacz pojawiają się później niż wykrywane w IFA, stąd OWD nie spełnia warunków testu przeglądowego i nie powinien być stosowany jako jedyny odczyn w diagnostyce toksoplazmozy (5, 20).

Testem dostępnym w wielu komercyjnych odmianach jest odczyn hemaglutynacji biernej (OHB), w którym krwinki czerwone opłaszczane antygenem somatycznym pierwotniaka aglutynują pod wpływem surowicy zawierającej przeciwciała anty *T. gondii*. Odczyn hemaglutynacji wykazuje jednak pewne cechy nieswoistości (5). Test wykrywa przeciwciała później niż OSF i w przypadkach toksoplazmozy wrodzonej wynik badania czasami był negatywny. U zwierząt wynik pozytywny o mianie niższym niż 128 uznawany jest za niespecyficzny (3).

Testem często wykorzystywanym do badań przeglądowych jest odczyn aglutynacji bezpośredniej (OA), wykrywający przeciwciała klasy IgG. Powszechność użycia wynika z jego wysokiej czulości i swoistości, łatwości wykonania, niskiego kosztu, a także możliwości zastosowania w badaniu krwi ludzi i zwierząt (22). W odczynie tym zawiesina utrwalonych formaliną pasożytów aglutynuje po dodaniu surowicy zawierającej przeciwciała antytoksoplazmowe, tworząc charakterystyczny osad. Modyfikacja testu przeprowadzona przez Desmonda i Remingtona, polegająca m.in. na dodaniu 2-merkaptetanolu wiążącego swoiste i naturalne przeciwciała klasy IgM znacznie zwiększyła jego czulość i swoistość (2).

Kolejnym odczynem jest test aglutynacji lateksowej, który ze względu na prostotę wykonania często wykorzystywany jest w lecznicach weterynaryjnych oraz badaniach skriningowych. Wykrywane przeciwciała antytoksoplazmowe nie są różnicowane na poszczególne klasy.

Do bardziej czułych metod należy aglutynacja immunoabsorpcyjna (ISAGA) umożliwiająca wykrycie swoistych przeciwciał klasy IgA, IgM lub IgE za pomocą aglutynacji z odpowiednio przygotowanym antygenem (10).

Obecnie w diagnostyce szeroko stosowane są techniki immunoenzymatyczne (EIA), a wśród nich meto-

da pośrednia ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), która pozwala na jakościowe i ilościowe oznaczenie przeciwciał oraz antygenów w materiale biologicznym. Test ten cechuje się wysoką czulością, wykorzystywany jest do wykrywania swoistych przeciwciał klas IgA, IgM, IgE oraz IgG. Odczyn wykonywany jest na płytkach polistyrenowych, w których dołki opłaszczane są antygenem toksoplazmowym. Po związaniu się antygeny z przeciwciałami obecnymi w badanej surowicy, kompleksy antygen-przeciwciało wykrywane są przy pomocy przeciwciał antyglobulinowych dla klas IgM, IgA, IgG lub IgE znakowanych enzymem (fosfatazą zasadową lub peroksydazą chrzastą). Rozkład substratu pod wpływem enzymu prowadzi do powstania barwnego produktu reakcji, którego intensywność zabarwienia (będąca pochodną stężenia przeciwciał w badanej surowicy) jest mierzona przy użyciu spektrofotometru.

Inną metodą serologiczną pozwalającą na wykrywanie inwazji *T. gondii* jest immunoblott, w której antygen toksoplazmowy poddawany jest rozdzielowi elektroforetycznemu w żelu poliakrylamidowym. Naniesiony na paski nitrocelulozowe rozfrakcjonowany antygen inkubowany jest z surowicą badaną. Obecne w surowicy poszczególne klasy immunoglobulin przyłączają się do odpowiednich frakcji antygenowych. Po przyłączeniu się koniugatu znakowanego enzymem do utworzonych kompleksów i dodaniu substratu, następuje reakcja barwna. Wynik reakcji odczytywany jest makroskopowo i określany jest w kilodaltonach.

W diagnostyce toksoplazmozy znajdują zastosowanie testy wykorzystujące technikę immunoenzymatyczno-fluorescencyjną (ELFA), umożliwiające wykrycie wszystkich klas przeciwciał (1). Po naniesieniu surowicy na pasek testowy wszystkie etapy badania są przeprowadzane w sposób automatyczny w aparacie VIDAS. W teście ELFA IgG fazę stałą stanowi antygen toksoplazmowy opłaszczony wewnątrz pipetki SPR. Immunoglobuliny anty *T. gondii* obecne w badanej surowicy wykrywane są przez przeciwciała monoklonalne przeciwko ludzkim IgG, połączone z fosfatazą alkaliczną. Odczyt odbywa się na zasadzie pomiaru fluorescencji końcowego produktu reakcji. Wyniki testu podawane są w jednostkach międzynarodowych na mililitr (IU/ml). Wyniki powyżej 10 IU/ml określone są jako dodatnie, zaś 8-10 IU/ml jako wątpliwe.

W teście ELFA IgM wykrywanie przeciwciał odbywa się na zasadzie metody „immunocapture”, w której poliklonalne przeciwciała kozie skierowane przeciw ludzkim łańcuchom μ , opłaszczają wnętrze pipetki, tworząc fazę stałą. Przeciwciała IgM obecne w surowicy po połączeniu z fazą stałą łączą się z inaktywowanym antygenem toksoplazm, który jest z kolei identyfikowany przez monoklonalne przeciwciała anty-toksoplazma, znakowane fosfatazą alkaliczną. Wynik końcowy odczytywany jest na podobnej zasadzie, jak w przypadku przeciwciał IgG. Próg wyników

dotadnich ustalony w formie indeksu (stosunku fluorescencji surowicy badanej do sygnału kalibratora) wynosi 0,65. Wyniki wątpliwe mieszczą się w zakresie 0,55-0,65.

Parametrem diagnostycznym pozwalającym na poznanie przybliżonego okresu zarażenia jest tzw. awidność przeciwciał, czyli siła wiązania przeciwciał anty *T. gondii* z antygenem. Awidność przeciwciał wzrasta w miarę dojrzewania odpowiedzi immunologicznej. W przewlekłej toksoplazmozie awidność przeciwciał jest wysoka i sięga > 30%, natomiast w aktywnej fazie zarażenia przeciwciała słabo wiążą się z antygenem (wykazują niską awidność < 15%). Do badania awidności wykorzystuje się techniki ELISA oraz testy ELFA (14).

Metody bezpośrednie

Materiałem do badań może być krew, szpik kostny, osad płynu mózgowo-rdzeniowego, popłuczyny oskrzelikowo-pęcherzykowe, bioptaty tkanki mózgowej (przypadki toksoplazmozy nabytej), jak również płyn owodniowy, krew płodu, łożysko, krew pępowinowa (toksoplazmoza wrodzona).

Obecność pierwotniaka *T. gondii* można wykryć, stosując badanie mikroskopowe preparatów barwionych metodą May-Grunwalda lub Giemsy. Ze względu na niewielką liczebność pasożytów, które można zaobserwować w preparatach mikroskopowych, ten rodzaj postępowania ma niewielkie znaczenie diagnostyczne. Lepsze wyniki ujawnienia bezpośredniej obecności pasożyta uzyskuje się przy wykorzystaniu metody immunofluorescencji z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych oraz metod immunohistochemicznych – reakcji peroksydaza-antyperoksydaza (PAP) oraz reakcji fosfatazy alkalicznej-antyalkalicznej fosfatazy (APAAP) (21).

Czułą metodą pozwalającą wykryć *T. gondii* nawet w niewielkiej liczebności jest próba biologiczna, polegająca na inokulacji myszy podejrzanym materiałem biologicznym. W pozytywnych przypadkach, w zależności od zjadliwości szczepu, pasożyta identyfikuje się po upływie 3-60 dni z wysięku otrzewnowego, narządów wewnętrznych lub mózgu zarażanych myszy.

Do bezpośredniej identyfikacji pierwotniaka wykorzystuje się hodowlę tkankową – ludzkie fibroblasty płodowe MRC5 lub linie monocytów (THP), które są również wykorzystywane w produkcji antygenów do testów serologicznych.

W celu bezpośredniego wykazania obecności pierwotniaka w organizmie żywiciela wykonuje się badanie na obecność antygeny krążącego *T. gondii*, który występuje w krwi w ostrej fazie pierwotnego zarażenia, jak również może pojawiać się w przypadkach wznowy zarażenia. Jego istnienie jest niezależne od obecności i klasy swoistych przeciwciał. W organizmie człowieka antygen może krążyć przez okres 2-3 tygodni. Do badań mających na celu wykrycie antygeny krążącego wykorzystuje się metody immunoenzyma-

tyczne, techniki immunoelektroforezy, podwójnej dyfuzji w żelu i metody western blot (8).

W diagnostyce ludzkiej pomocne są także badania obrazowe: USG, RTG, tomografia komputerowa, angiografia fluoresceinowa, które mogą ujawnić ogniska zwapnień oraz inne zmiany patologiczne w narządach wewnętrznych i mózgu. W limfadenopatiach o rozpoznaniu może decydować biopsja węzła.

W ostatnich latach coraz większego znaczenia nabierają metody diagnostyczne z zakresu biologii molekularnej, wśród których najczęściej stosowane są różne odmiany reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), m.in. RAPD, RFLP, Nested, Real-time. Stałej ewolucji podlegają również techniki do analizy produktów amplifikacji, takie jak hybrydyzacja (Southern-blot, dot-blot) z użyciem swoistej sondy biotynylowej (17). W procesie amplifikacji sekwencji DNA wykorzystuje się głównie powielanie genu B1 (mającego 35 powtórzeń w genomie) oraz innych, m.in. P30, rybosomalnego 18S rDNA (7, 11). Gatunek *Toxoplasma gondii* jest polimorficzny i posiada strukturę klonalną. Zastosowanie technik molekularnych (PCR-RFLP, microsatellite typing, analizy izoenzymów) umożliwiło genetyczną analizę różnych szczepów *T. gondii* i potwierdziło wcześniejszy podział na 3 linie klonalne, mogące warunkować zjadliwość. *T. gondii* jest gatunkiem wysoce konserwatywnym pod względem genetycznym, a różnice w sekwencji DNA trzech linii klonalnych wynoszą zaledwie 1-2% (4, 16). Określenie przynależności klonalnej wydaje się mieć istotne znaczenie w przypadkach chorobowych przebiegających subklinicznie, przy toksoplazmozie wrodzonej, jak również w badaniach nad potencjalnymi źródłami zarażenia *T. gondii* w środowisku. Wysoka czułość PCR pozwala teoretycznie na wykrycie nawet kilku pasożytów w badanej próbce, jednak przypadkowa obecność inhibitorów reakcji może ograniczyć wartość badania. Metody PCR nie pozwalają jednak na jednoznaczną ocenę, czy występujący proces jest procesem czynnym. Analiza produktów reakcji PCR powinna być szczególnie wnikliwa z powodu występowania nieswoiście dodatnich wyników w rozdziale elektroforetycznym; powinna być uzupełniona metodą hybrydyzacji przy użyciu swoistej sondy. Dobrym rozwiązaniem wydaje się skojarzenie technik PCR z technikami immunoenzymatycznymi w celu identyfikacji produktu amplifikacji (6).

Podsumowanie

Toksoplazmoza u zwierząt rozpatrywana jest głównie w aspekcie zagrożenia zdrowia człowieka. Większość komercyjnych testów serologicznych przeznaczona jest do badania ludzi. Uniwersalnymi testami (brak specyficzności gatunkowej) są: odczyn aglutynacji bezpośredniej, aglutynacja lateksowa oraz, z pewnymi ograniczeniami, test Sabina-Feldmana. Wykorzystanie testów IFA i ELISA wymaga zastosowania anty surowicy swoistej gatunkowo. Jednorazowe badanie

serologiczne u zwierząt ma wartość ograniczoną i powinno być stosowane głównie w celach przeglądowych. Gatunkiem będącym przedmiotem bardziej szczegółowych badań (serologicznych i koproskopowych) jest najczęściej kot, co wiąże się z przypisywaną mu rolę „siewcy oocyst”. Należy jednak zauważyć, że pojawienie się swoistych przeciwciał wykrywalnych testami serologicznymi występuje przeważnie już po okresie wydalania oocyst, stąd pozytywny wynik badania serologicznego nie może być powodem do eliminacji kota z hodowli. Wskazaniem do leczenia zwierząt powinno być wystąpienie objawów klinicznych sugerujących zarażenie toksoplazmowe (zaburzenia rozrodu, objawy ze strony układu nerwowego, pokarmowego, oddechowego, zmiany w narządzie wzroku, limfadenopatia) z towarzyszącymi objawami ogólnymi (anemia, brak apetytu, osłabienie, gorączka), potwierdzone pozytywnym wynikiem badania serologicznego. Wczesna faza zarażenia *T. gondii* może być wykryta przez stwierdzenie serokonwersji przeciwciał klasy IgG lub/i obecności przeciwciał klasy IgM, IgA lub IgE. Jednak brak patognomicznych objawów przy toksoplazmozie oraz występująca czasami słaba odpowiedź humoralna organizmu na zarażenie może znacznie utrudnić rozpoznanie. W takich przypadkach w celu potwierdzenia diagnozy należałoby stosować metody bezpośrednio wykrywające pasożyta w tkankach, co jednak może wiązać się z trudnościami ze względu na inwazyjność badania. Ze względu na ważną rolę, jaką pełnią zwierzęta w epidemiologii toksoplazmozy, ocena stopnia zarażenia *T. gondii* poszczególnych gatunków realizowana przy pomocy badań serologicznych wydaje się ważna i powinna być stale aktualizowana.

Piśmiennictwo

1. Dave J., Balfour A. H., Perkin J.: Evaluation of the Vidas toxo competition assay for the detection of antibodies specific to *Toxoplasma gondii* in human sera. *Serodiagn. Immunother. Infect. Disease* 1994, 6, 41.
2. Desmonds G., Remington J. S.: Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection. Method for increasing sensitivity and specificity. *J. Clin. Microbiol.* 1980, 11, 562-568.
3. Dubey J. P., Beattie C. P.: *Toxoplasmosis of Animals and Man*. CRC Press Inc., Boca Raton 1988.
4. Dytnerka K., Stączek P., Długońska H.: *Toxoplasma gondii* – kosmopolityczny pasożyt o małym zróżnicowaniu genetycznym. *Post. Mikrobiol.* 2004, 43, 141-154.
5. Dzbeński T. H.: Walory i wady niektórych testów serologicznych używanych w diagnostyce toksoplazmozy wrodzonej i nabytej. *Materiały IV Konferencji nt. Toksoplazmozy*, AM Poznań 1985.
6. Gołąb E.: Wykrywanie DNA *Toxoplasma gondii* w płynach ustrojowych metodą PCR. *Wiad. Parazytol.* 1995, 40, 13-18.
7. Jones C. D., Okhravi N., Adamson P., Tasker S., Lightman S.: Comparison of PCR Detection Methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor. *IOVS* 2000, 41, 634-644.
8. Malafiej E., Śpiwák E.: Laboratoryjne metody rozpoznawania toksoplazmozy. *Badanie i Diagnoza* 1999, 5, 53-62.
9. Mrozewicz B.: Rozpoznanie serologiczne toksoplazmozy. *Klin. Perinatol. Gin. Supl.* 1995, 11, 68.
10. Paul M.: Zastosowanie metody ISAGA w wykrywaniu swoistych przeciwciał IgM, IgA, IgE w nabytej i wrodzonej toksoplazmozie. *Wiad. Parazytol.* 1997, 43, 39-51.
11. Remington J. S., Thulliez P., Montoya J. G.: Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 941-945.
12. Rydzewski A., Zemburowa K.: Współczesne poglądy na interpretację wyników testów immunologicznych w toksoplazmozie. *Materiały V Konferencji nt. Toksoplazmozy*, AM Poznań 10. 1987.
13. Sabin A. B., Feldman H. A.: Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*toxoplasma*). *Science* 1948, 108, 660-663.
14. Sobieszkańska B. M.: Toksoplazmoza. *Akademia Medyczna we Wrocławiu* 1999.
15. Sroka J.: Seroepidemiology of toxoplasmosis in the Lublin region. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2001, 8, 25-31.
16. Su C., Zhang X., Dubey J. P.: Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multi-locus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. *Int. J. Parasitol.* 2006, 36, 841-848.
17. Śmiełowska-Los E., Klimentowski S., Pachoń J.: Aktualne kliniczne i diagnostyczne problemy toksoplazmozy u zwierząt mięsożernych. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 641-644.
18. Śmiełowska-Los E., Rypuła K., Dzimira S.: Badania nad toksoplazmozą psowatych. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 141-145.
19. Tenter A. M., Heckeroth A. R., Weiss L. M.: *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 2000, 30, 1217-1258.
20. Umiński J.: Toksoplazmoza u ludzi w świetle własnych badań immunologicznych. *Praca hab.*, AM Łódź 1983.
21. Walochowa M., Dzbeński T. H.: Zastosowanie metody peroksydaza-antyperoksydaza do wykrywania inwazji *Toxoplasma gondii* w ośrodkowym układzie nerwowym doświadczalnie zarażonych myszy. *Wiad. Parazytol.* 1989, 4, 277-281.
22. Zemburowa K., Rocznik M.: Wartość odczynu aglutynacji bezpośredniej w diagnostyce serologicznej toksoplazmozy. *Wiad. Parazytol.* 1979, 25, 267-279.

Adres autora: dr n. wet. Jacek Sroka, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;
e-mail: j.sroka@piwet.pulawy.pl