



Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/diagmicrobio](http://www.elsevier.com/locate/diagmicrobio)



Parasitology

Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection<sup>☆</sup>  
Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis



O. Villard<sup>a,\*</sup>, B. Cimon<sup>b</sup>, C. L'Ollivier<sup>c</sup>, H. Fricker-Hidalgo<sup>d</sup>, N. Godineau<sup>e</sup>, S. Houze<sup>f</sup>, L. Paris<sup>g</sup>,  
H. Pelloux<sup>d</sup>, I. Villena<sup>h</sup>, E. Candolfi<sup>a,\*</sup>

## ***Toxoplasma gondii* enfeksiyonunun serolojik tanısında Fransa Ulusal Referans Merkezi önerileri**

Uzm. Dr. Özlem Ulusan Bağcı

Danışman: Prof. Dr. Metin Korkmaz

## Giriş

- ▶ Avrupa ülkelerinde konjenital toksoplazmoz (KT) için uygulanan tarama stratejileri oldukça farklı
- ▶ İncelenen 28 ülkeden sadece 4 tanesinde spesifik tarama stratejileri olduğu belirlenmiş
  - ▶ Fransa
  - ▶ Hollanda
  - ▶ Almanya
  - ▶ İtalya

- Fransa'da KT prevalansını azaltabilmek amacıyla 1978 yılında ulusal bir referans merkezi kuruldu ve 1992 yılından beri özel bir tarama programı uygulanıyor
- Fransa'da gebelerde toksoplazmoz seroprevalansı 1965 yılında %83'lerden, 2010 yılında %37'lere kadar gerilemiş

Peyron F, McLeod R, Ajzenberg D, Contopoulos-Ioannidis D, Kieffer F, Mandelbrot L, et al. (2017) Congenital Toxoplasmosis in France and the United States: One Parasite, Two Diverging Approaches. PLoS Negl Trop Dis 11(2): e0005222. doi:10.1371/journal.pntd.0005222

- Fransa'da 2010 yılında duyarlı gebelerde Toxoplasma serokonversiyonu 2.1/1000, 2012 yılında 1.9/1000
- 2007 yılında KT prevalansı 2.9/10.000 canlı doğum'dan, 2012 yılında 2.58/10.000 canlı doğuma kadar gerilemiş ve 10.000 doğumda sadece 0.09'u ciddi KT vakası
- KT vakalarının %52.5'i doğumda tanı alıyor ve bu vakaların yaklaşık %90'ı asemptomatik

# Tarama yapmak gerçekten etkili mi? Fransa ve Amerika örneği

## Amerika:

- 29 haftalık gebede USG ile fetal hidrosefali
- Gebe asemptomatik
- Yapılan serolojik tetkilerle akut toksoplazmoz tanısı konuyor - enfeksiyonu yaklaşık 12. haftada aldığı saptanıyor
- Amniyosentez PZR (+)
- 31 haftalıkken primetamin/sülfodiazin tedavisi
- Bebeğe hidrosefali, kraniyal kalsifikasyon ve koryoretinit

## Fransa:

- Fransa'da tarama programları çerçevesinde seronegatif gebelere aylık düzenli serolojik kontroller
- Eğer aynı gebe Fransa'da olsaydı, daha erken serolojik tanı ve spiramisin tedavisi
- Amniyosentezdeki PZR pozitifliğinin daha önce saptanması sonucunda 8-11 hafta erken başlanan primetamin sülfadiazin tedavisi
- KT gelişmesi tamamen engellenebilir veya minimal sekel gelişimi



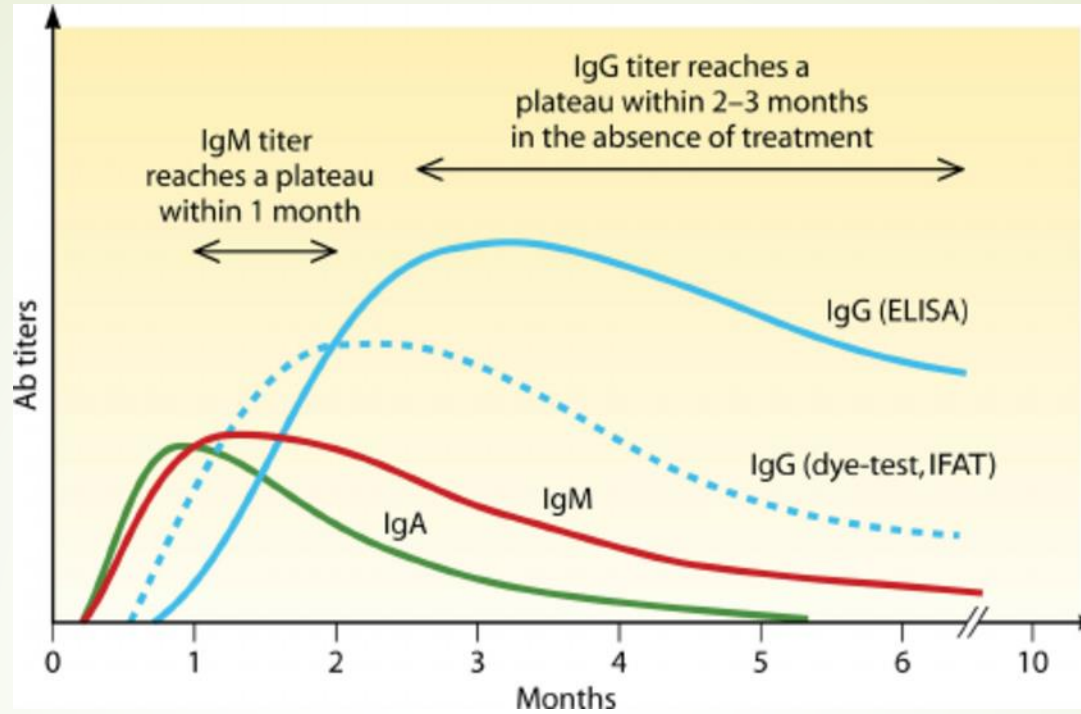
## Peki ülkemizde durum nasıl?

- ▶ Türkiye'de toksoplazmoz seroprevalansı %30-70 arasında
- ▶ Rostami ve ark. tarafından yapılan metaanalizde Türkiye'deki gebelerde akut toksoplazmoz enfeksiyonu prevalansı %0.3 olarak bildirilmiş
- ▶ Ülkemizde gebelikteki taramalar kanunen zorunlu tutulmamaktadır
- ▶ Ancak hekimler tarafından farklı tarama algoritmalarının benimsenmiş olması, bu testlerin istenmesi ve yorumlanmasında hatalara yol açmakta, gereksiz test maliyetini artırmakta, gebede gereksiz anksiyete ve kimi zaman da gereksiz küretaj yapılmasına neden olmaktadır
- ▶ Bu nedenle ortak tanı ve tarama algoritmalarının oluşturulması ile gereksiz endişe ve maliyetin önüne geçilmiş olacaktır

Rostami A, Riahi SM, Contopoulos-Ioannidis DG, Gamble HR, Fakhri Y, et al. Acute Toxoplasma infection in pregnant women worldwide: A systematic review and meta-analysis. PLOS Neglected Tropical Diseases 2019; 13(10): e0007807. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007807>

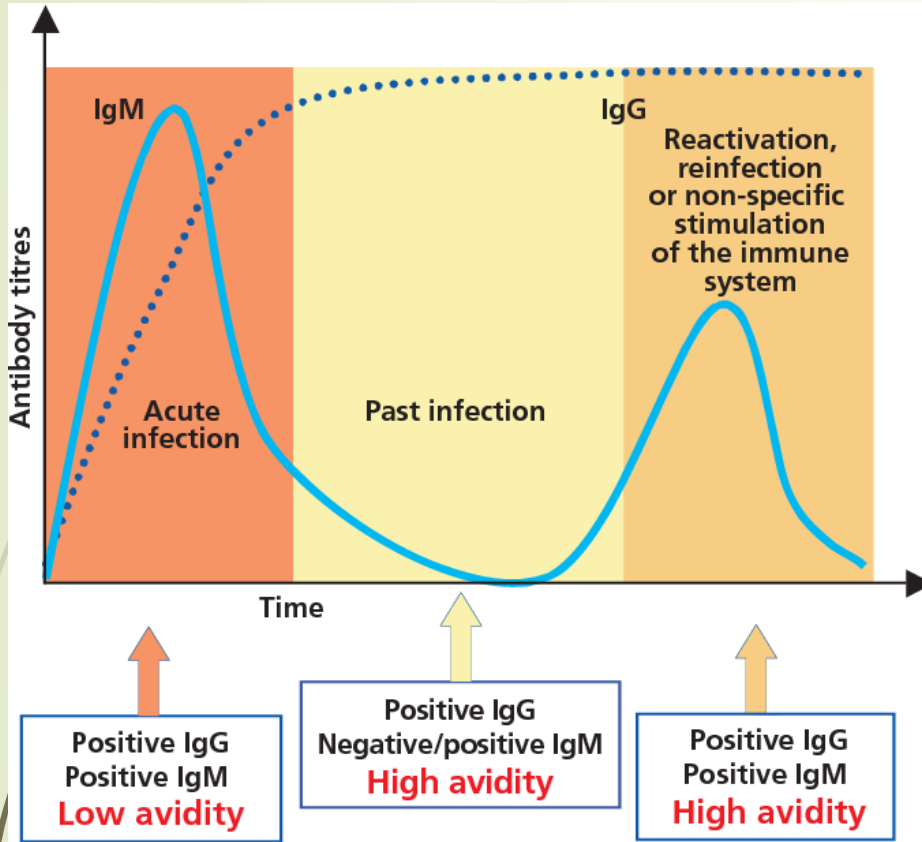
## Toxoplazma enfeksiyonuna karşı immün yanıt

- 1948 yılında hastalığın tanısı için Sabin ve Feldman isimli iki araştırmacı Dye testini geliştirmiştir
- Devamında bu iki araştırmacı toksoplazmozun dñnyada en yaygın görñlen paraziter hastalık olduğunu ancak vakaların %80'inin asemptomatik geçirdiğini keşfetmişler
- Parazit tüm çekirdekli hücreleri enfekte etme potansiyeline sahiptir, ancak genellikle doğal immñnite ve devamında gelişen edinsel immñnitenin bir parçası olan humoral immñnitenin katkısıyla (IgM, IgG, IgA, IgE türü antikörler) bir hafta içerisinde geriler
- Antikörler parazit invazyonununu bloke eder, komplemanı aktive eder ve paraziti opsonize ederek fagosite edilmesini kolaylaştırır
- Günümüzde halen toksoplazmoz tanısı serolojik testlerle antikör tespitine dayanmaktadır



- **IgM**, ilk oluşan antikordur ve enfeksiyonun 1.haftasında artmaya başlar, 1-3. aylara kadar artar (3. ayda pik yapar) ve 9. aya kadar azalır ve takiben negatifleşir. Vakaların %9-27'sinde IgM pozitifliği 2 yıl veya daha fazla devam edebilir
- **IgG**, ise enfeksiyonun 2. haftasında artmaya başlar. 3. ayda pik yapar, 6. aya kadar plato yapar ve 1. yıldan sonra azalmaya başlar ve bazal bir seviyede (bradizoit formlarına karşı gelişen antikordur) kişinin hayatının sonuna kadar saptanabilir
- **IgA**, sentezlenme kinetiği, IgM'e benzemektedir. IgA antikordur 3-4 ay kadar devam eder





### Avidite İndeksi:

- Avidite indeksi antijenlerin antikörlara bağlanma gücünü ifade eden bir terim
- Tanısal olarak kullanılan IgG avidite indeksi, enfeksiyonun ilk dört ayında artar
- Avidite indeksi yüksekse akut enfeksiyon tanısı dışlanabilir
- Ancak avidite indeksi düşük veya orta düzeyde olduğunda akut enfeksiyon tanısı dışlanamaz
  - Akut enfeksiyon olabileceği gibi avidite matürasyonu gelişmemiş eski enfeksiyon da olabilir, IgG düzeyi takip edilmelidir

## Gereç ve yöntem

- Bir tarama testi geliştirirken tanısal performansının yüksek olması ve maliyet etkin olması önemli iki kriterdir
- Tanıda kullanılan testlerin duyarlılık ve özgüllükleri birbirinden oldukça farklı olduğu için uygun testi seçmek kimi zaman için zor olabilmektedir
- Burada önemli olan duyarlılığı kabul edilebilir düzeyde olan ve görece daha ucuz bir testi tarama testi olarak kullanmak ve şüpheli sonuçlar olduğunda, duyarlılığı ve özgüllüğü daha yüksek testlerle doğrulamaya gitmektir

# Tanısal Testler

## Tarama

- Hızlı
- Otomatize
- Ucuz
- Daha az serumla çalışılabilir
- Hemaglütinasyon
- Aglütinasyon
- ELISA
- CLIA
- ELFA

## Doğrulama

- Uzun süren
- Genellikle in-house
- Pahalı
- Karmaşık testler
- Genellikle referans merkezlerde çalışılır
- Dye test
- IFAT
- Immunblot
- ISAGA

## Testlerin prensipleri

- ▶ **ELFA (Enzyme-Linked Fluorescence Assay):** Enzimatik bir sandviç methodu olup, floresan üretme prensibine dayanmaktadır.
- ▶ **ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay):** Manuel olarak veya ticari otomatize sistemlerde çalışılabilir. Antijen-antikor komplekslerini enzimsel reaksiyonla ölçme prensibine dayanır
- ▶ **ISAGA (Immunosorbent Agglutination Assay):** Toksoplazma antijeninin serumdaki antikorlarıyla birleşme prensibine dayanan bir test olup, direkt aglütinasyon ve ELISA testlerinin bileşimine dayanır.
- ▶ ELFA ve ISAGA yönteminin duyarlılığı, ELISA yöntemine göre daha fazla bulunmuş, ISAGA IgM ölçülmesinin özgüllüğü de oldukça yüksek

Gharavi, MJ, Jalali S, Khademvatan S, Heydari S. Detection of IgM and IgG anti-Toxoplasma antibodies in renal transplant recipients using ELFA, ELISA and ISAGA methods: comparison of pre- and post-transplantation status. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 2011; 105(5), 367–371.

Gharavi MJ, Oormazdi H, Roointan ES. A comparative study on sensitivity and specificity of conventional and unconventional IgG and IgM assays for diagnosis of Toxoplasmosis. *Iranian Journal of Public Health* 2008; 37:42-45.

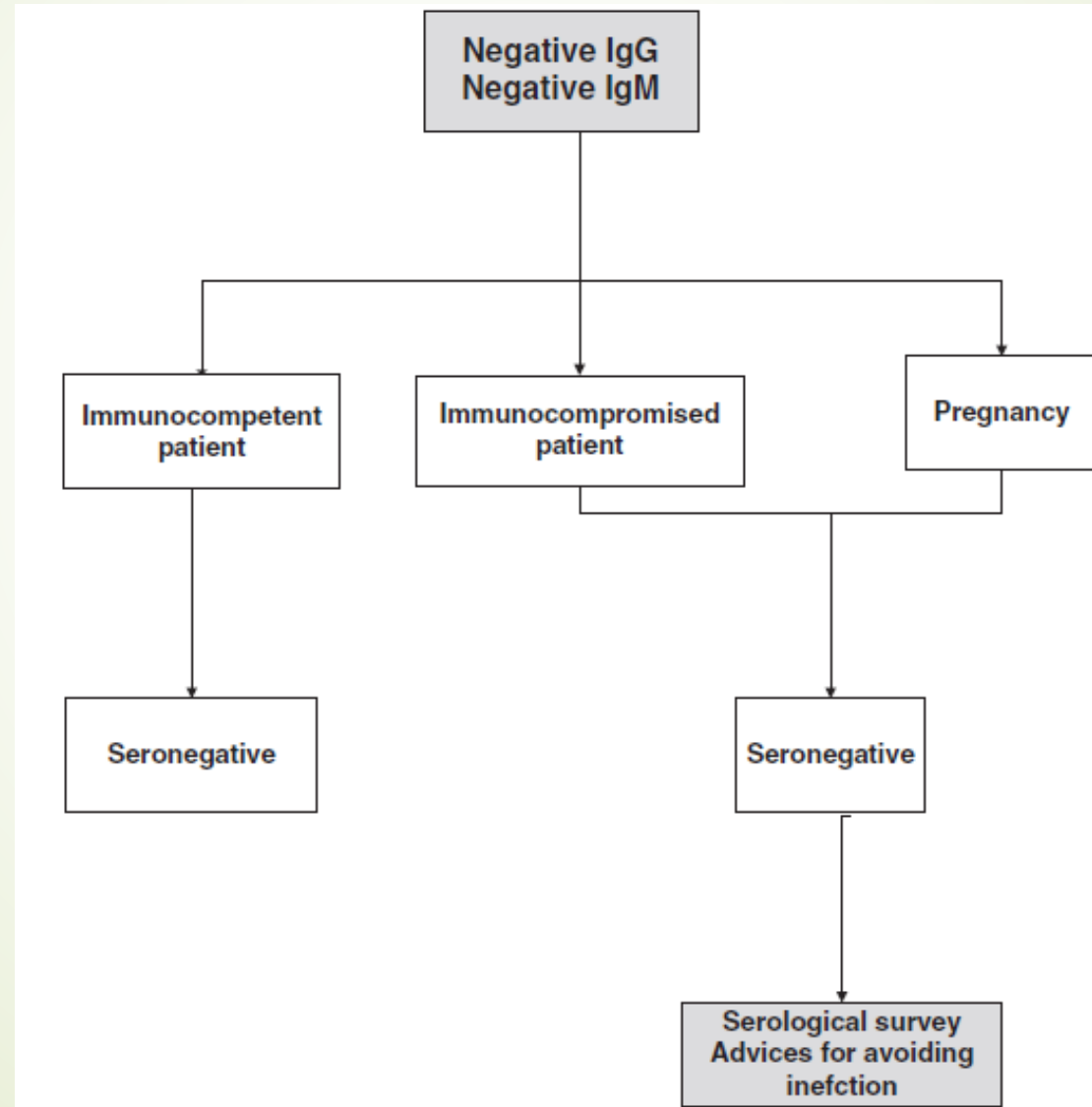
- Toksoplasma serolojisinde antikorların tespit edilmesi tanısal anlamda oldukça önemli olup, bu durum için Fransa Ulusal Tanı Merkezi tarafından tanısal şemalar oluşturulmuştur
- Bu çalışmanın amacı, immün sistemi sağlam hastalarda kullanılan akış şemalarının konjenital toksoplazmoz, immünsuprese hastalar ve oküler toksoplazmoz tanısındaki yerini araştırmaktır



# Rutin serolojik durumlar

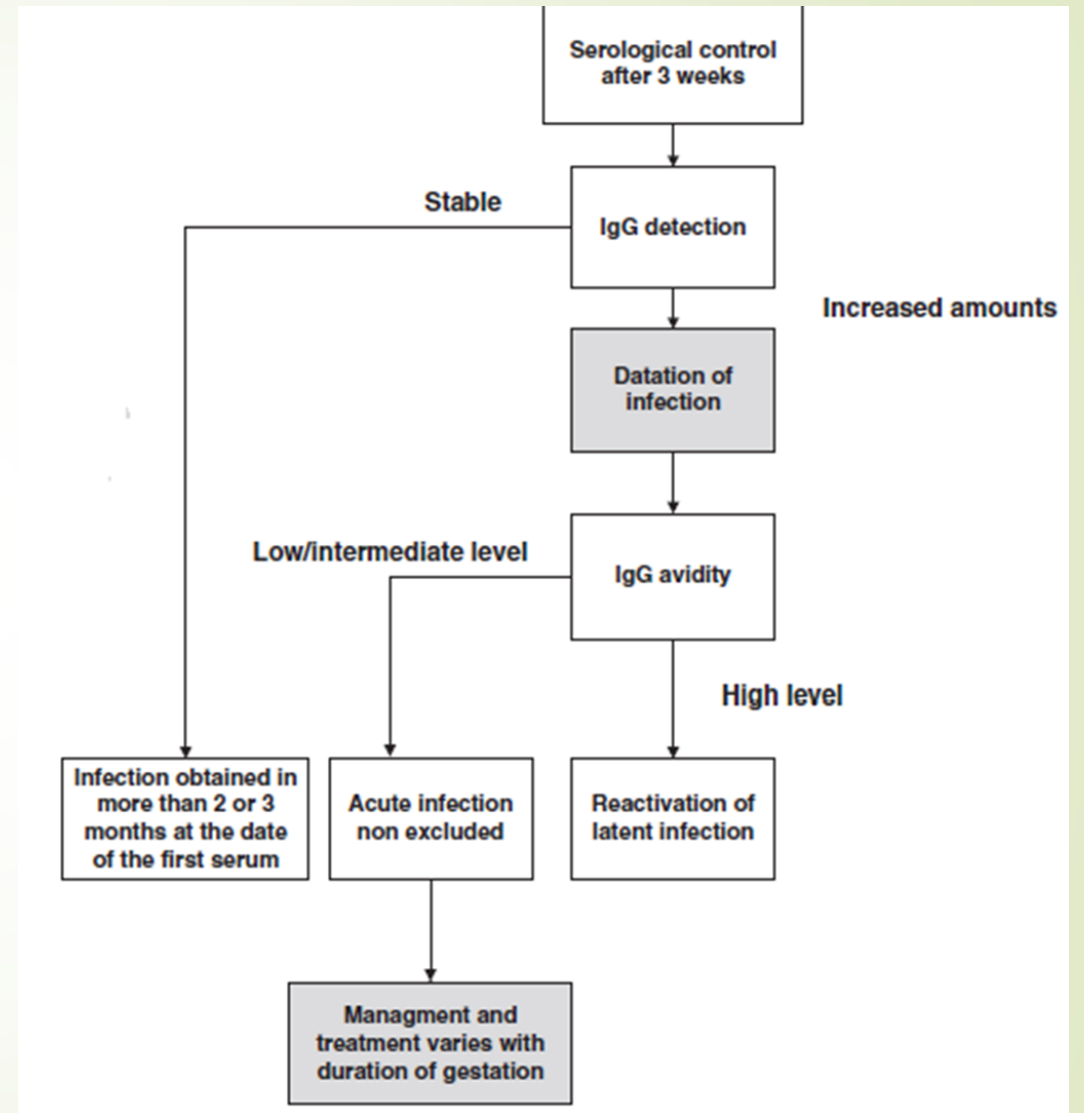
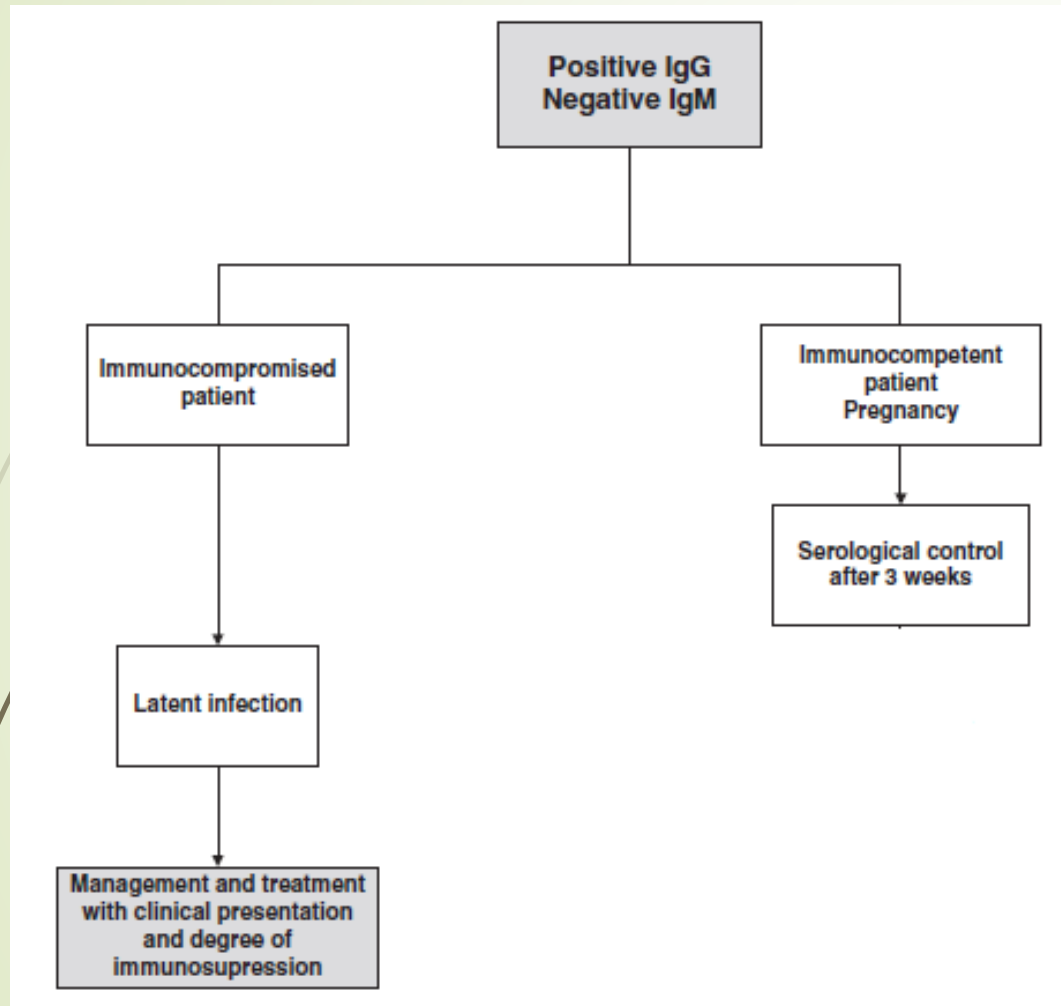
14

*IgG ve IgM yokluğunda (seronegatif birey)*



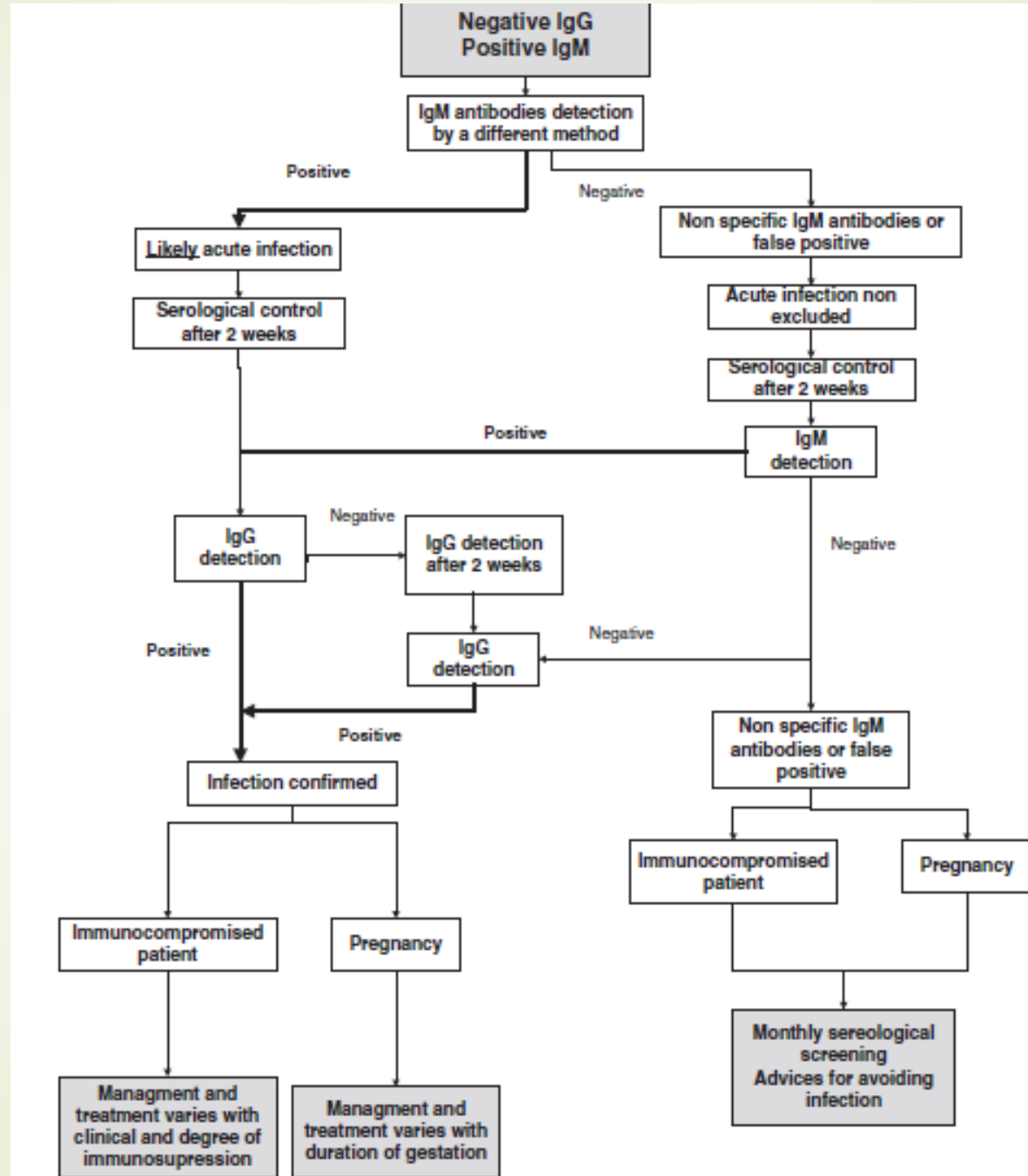
## IgG pozitif ve IgM negatif durum

15

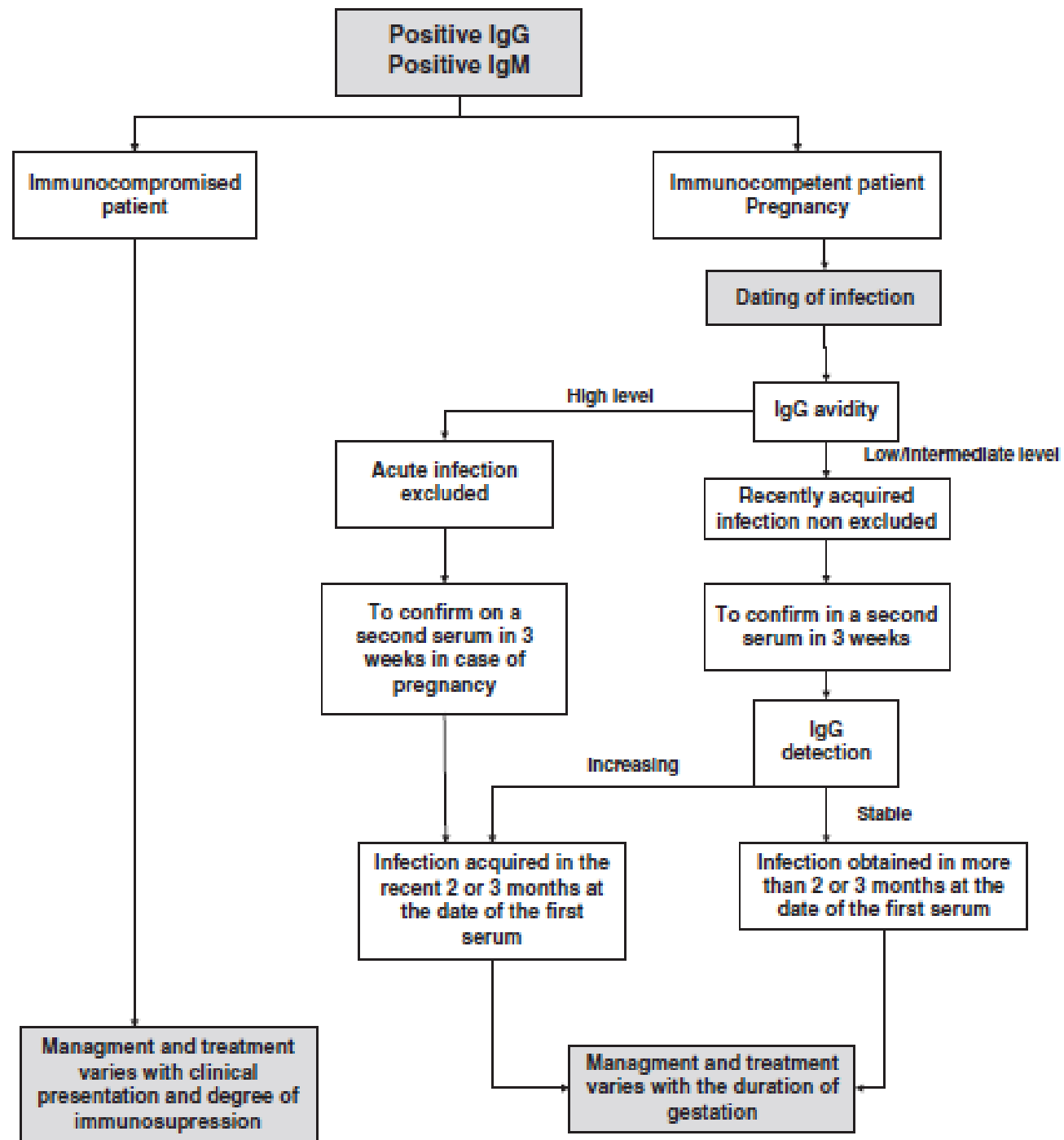


# IgG negatif ve IgM pozitif durum

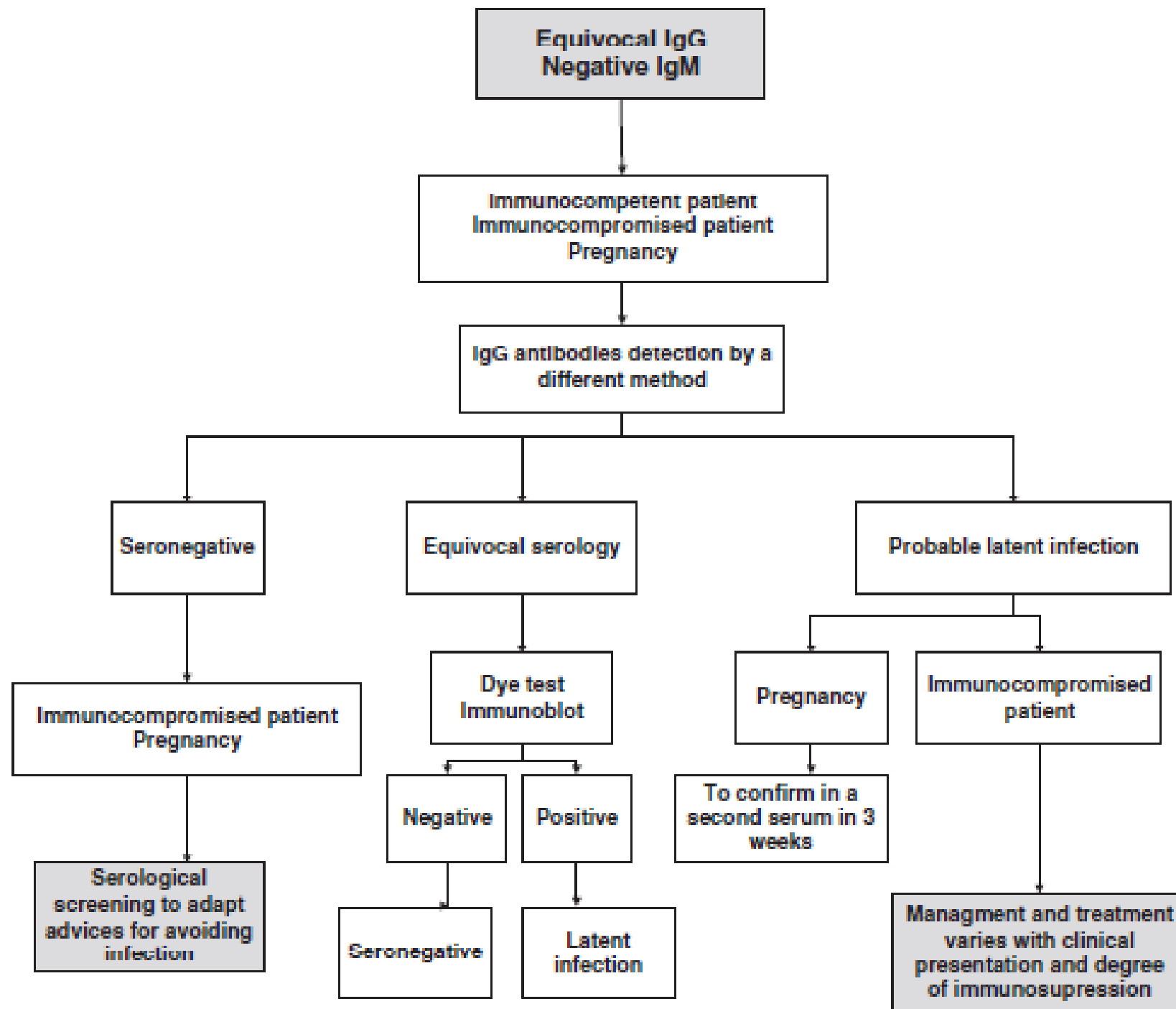
16



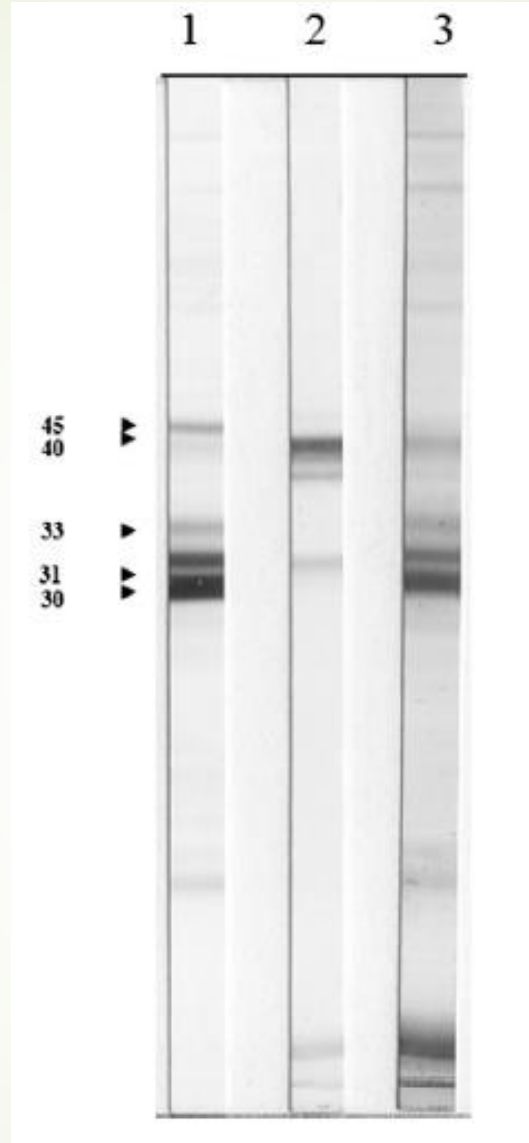
## IgG ve IgM pozitifliği



*IgG şüpheli,  
IgM negatif*







IgG immunoblot

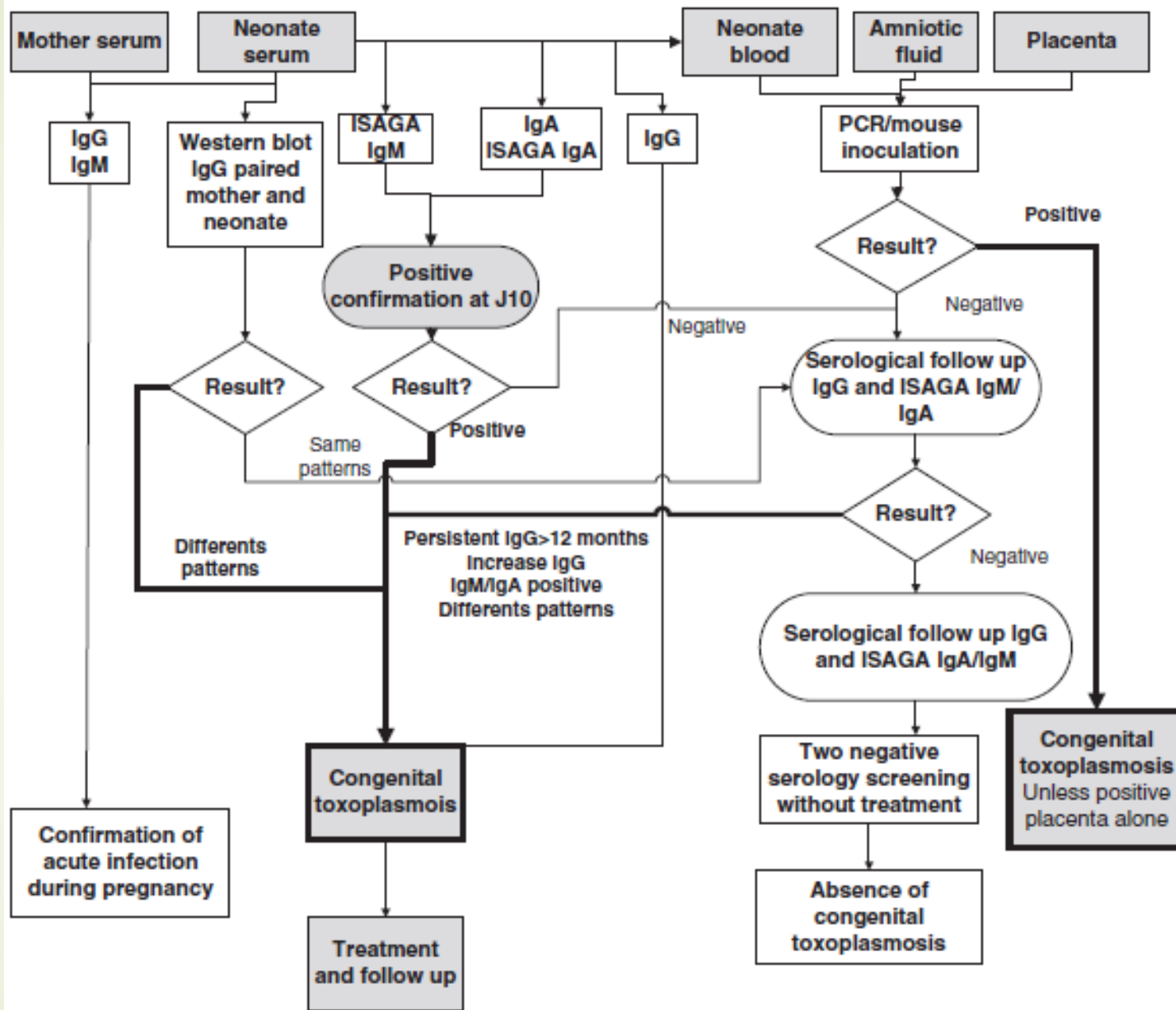
1-Pozitif kontrol 2-IgG'de yalancı pozitiflik 3-Gerçek pozitif  
IgG

## Konjenital toksoplazmoz tanısı alan bebeklerin prenatal ve postnatal takipleri

- Maternal akut enfeksiyon saptanmasına rağmen prenatal tanı konmamışsa, doğumda serolojik tetkiklerin yapılması ve doğumdan sonra bebeğin takibe alınması gereklidir
- Neonatallerin postpartum tarama ve takipleri, prenatal ve maternal tarama yöntemlerini tamamlayıcı olarak kullanılmaktadır ve postpartum tarama özellikle maternal tarama programı olmayan ülkelerde önem taşımaktadır:
  - Amniyotik sıvı, plasenta veya kord kanında parazit DNA'sının saptanması (plasentada saptanan DNA ölü parazite bağlı olabilir ve bebeğe geçmemiş olabilir)
  - Kord kanında veya yenidoğan serumunda IgG, IgM ve IgA'nın saptanması

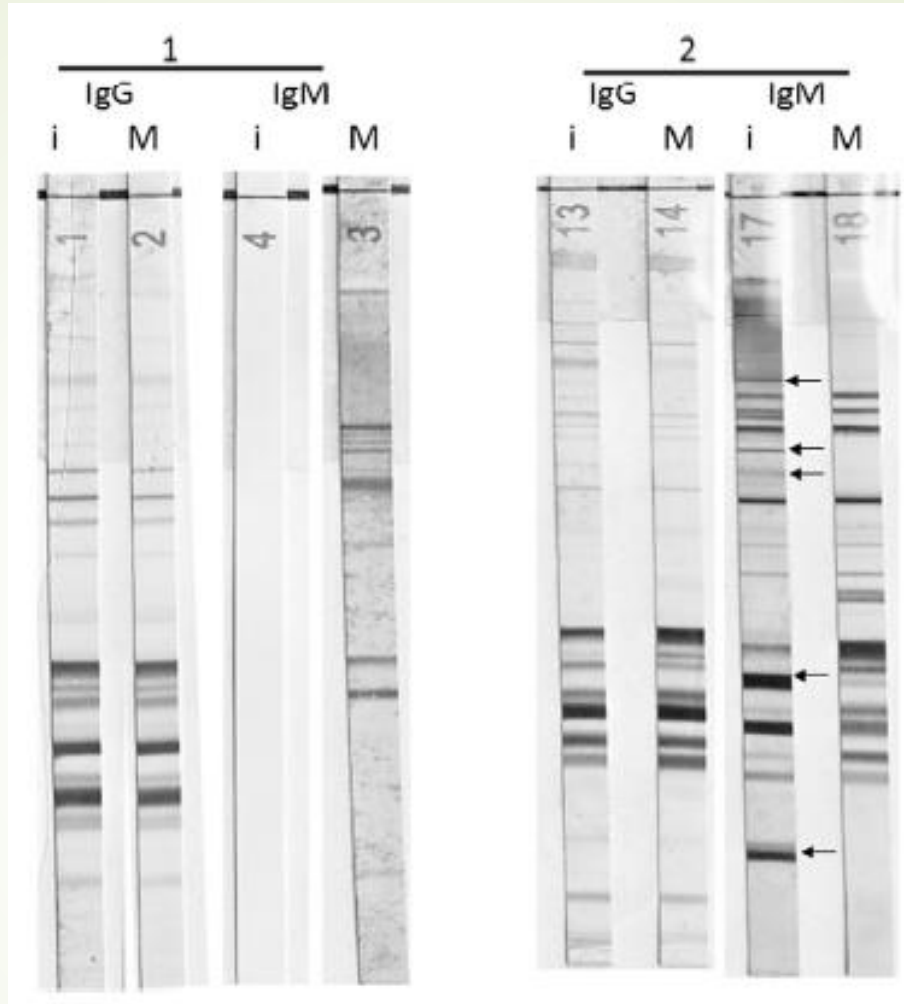
- Yeni doğan serumunda IgG, IgA (monomer formunda) veya IgM pozitifliği (plasental yırtık vs. gibi istisnai durumlarda) anneden bebeğe geçen antikorlar nedeniyle saptanabilir (IgG yarılanma ömrü: 21 gün, IgM/IgA yarılanma ömrü: 10 gün)
- Bu nedenle mutlaka en az 10 gün sonra yeni bir serum istenerek tekrar çalışılması gereklidir
- Yarılanma ömrü 3 hafta olan IgG'nin bebeklerde düzeyinin kaybolana kadar aynı yöntemle takip edilmesi önerilmektedir
- Anneden bebeğe geçen antikorlar zamanla azalarak kaybolur, IgG profilinde duraksama olması veya artış olması durumunda konjenital toksoplazmozdan şüphelenilir

- Kaybolana kadar IgG takibi yapılması uzun bir süreçtir ve pahalı olabilir. IgM ve IgA araştırılması ile daha kısa sürede tanı konabilir
- Hem anne hem bebekte aynı antikörlerin saptanması durumunda KT tanısı için anne ve bebek serumlarından/kord kanından immünblot çalışmak ve bantları karşılaştırmak faydalı olur
- Bebek serumunda farklı bantların saptanmış olması antikörlerin bebek tarafından üretildiğini göstermekte olup, konjenital toksoplazmoz tanısını destekler



Akut toksoplazmoz enfeksiyon tanısı alan veya şüphesi olan gebelerden doğan çocuklara uygulanacak tanı algoritması





Anne ve bebek serumlarındaki IgG ve IgM bantlarının karşılaştırılması

1-Anneden bebeğe geçen antikorlara bağlı IgG pozitifliği

2-Konjenital toksoplazmoz

## Oküler toksoplazmoz (OT)

- ▶ OT, posterior üveitin en önemli nedenidir
- ▶ OT bir koryoretinit olup, konjenital, edinsel akut enfeksiyona baēlı olarak gelişebildiēi gibi; latent enfeksiyonun reaktivasyonuna baēlı olarak da görülebilir
- ▶ Eēer lezyon makula bölgesinde yaygın olarak bulunuyorsa ve multipl ise körlük gelişebilir

- OT kesin tanısı için göz sıvısında parazit DNA'sının veya IgG/IgA gibi lokal antikor üretiminin gösterilmesi gerekmektedir
- Antikorlar genellikle humor aköz sıvısında bakılmakta olup, daha nadiren parasentez ile alınan vitröz sıvıda da çalışılabilmektedir, eş zamanlı olarak mutlaka serum örneğinde de aranması önerilmektedir
- Serumda antikor negatif saptandığında immün sistemi sağlam hastalarda ileri tetkik yapmaya gerek yoktur

## OT tanısında kullanılan yöntemler

### ➤ PZR:

- Göz sıvısında PZR pozitifliği durumunda acilen tedavinin başlanması gerekmektedir
- PZR negatif saptandığında, serumda standart tanı protokolü uygulanmalıdır ve akut enfeksiyon veya rekürrens tanısı konmalıdır
- Akut enfeksiyon durumunda kan-retina bariyerinin bozulmasına bağlı olarak serumdan sızan antikolar nedeniyle göz içi sıvısında yalancı pozitiflik olabilir

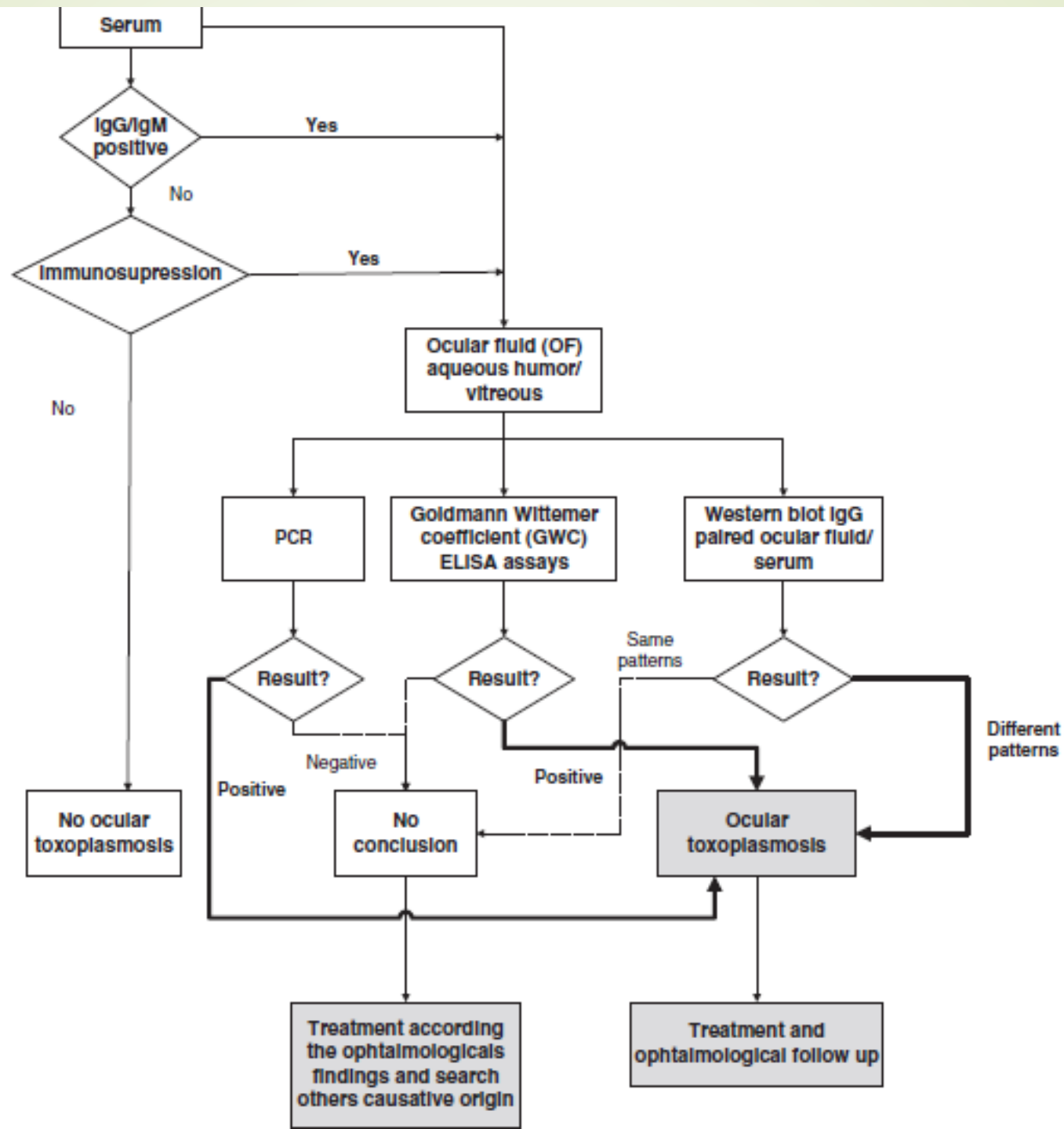
➤ **Goldman Witmer Coefficient (GWC) katsayısı:**

- Göz içi sıvısı veya serumdaki spesifik antikor miktarlarının ELISA veya IFAT gibi kantitatif bir yöntemle ölçülmesi ve oranlanması prensibine dayanır
- Ancak yine de kan-retina bozulduğunda serumdaki antikorların göze geçmesine bağlı olarak yalancı sonuçlar olabilir
- $(\text{Humor aközdeki anti-Toxoplasma IgG} / \text{Humor aközdeki total IgG}) : (\text{Serumdaki anti-Toxoplasma IgG} / \text{Serumdaki total IgG}) = \text{Değerin 2 ve üzerinde olması göz içi lokal antikor üretimini göstermektedir}$



➤ **Western Blot:**

- Yalancı sonuçların önüne geçebilmek için WB testi kullanılmalı ve göz içi sıvısı serumla karşılaştırılmalıdır-göz içi sıvısında en az bir bantta farklılık olması durumunda OT tanısı konur
- WB'in duyarlılığı GWC katsayısına eşitken, özgüllüğü daha fazladır (%95)
- WB, PCR ve GWC katsayısı birlikte kullanıldığında duyarlılık %95'i bulmaktadır
- WB ve serolojik yöntemlerle negatif sonuç alındığında diğer enfeksiyöz ve inflamatuvar nedenlerin araştırılması gereklidir



## İmmün sistemi baskılanmış hastaların takibi

- Toksoplazmoz aynı zamanda fırsatçı bir enfeksiyondur, vücutta latent olarak kalan kistler, immünite baskılandığında reaktive olur
- İmmün yetmezliği olan hastalarda primer akut enfeksiyon da oldukça risklidir
- Ancak immün yetmezlik durumunu ve kullanılan terapilere bağlı olarak B hücreleri ve antikor üretiminin etkilenmesine bağlı olarak yanıtıcı sonuçların alınabileceği akılda bulundurulmalıdır
- Bu özel hasta grubunda serolojik testler negatif olduğunda PZR testinin erken tanıda kullanılması önerilmektedir

## HIV (+)/AIDS hastalarının takibi

- HIV, CD4 (+) T hücrelerinde azalmaya neden olmakta ve CD4+T hücre sayısı 100 / $\mu$ L'nin altına indiği zaman toksoplazmoz açısından reaktivasyon riski, (özellikle de toksoplazma ensefaliti) artar
- T hücre yanıtının tekrar artmasını sağlayan anti-retroviral tedavi ile reaktivasyon riskinde azalma olmaktadır
- HIV (+) hastalarda,
  - Serumda antikor tayini önerilmektedir. Eğer hasta daha önce toksoplazma etkeni ile karşılaşmamışsa, korunma önlemleri anlatılmalı, CD4+ T hücre sayısı takip edilmeli ve serolojik testler belirli aralıklarla tekrarlanmalıdır
  - Latent enfeksiyon saptanmış hasta yüksek risk altındaysa kotrimaksazol profilaksisi verilmelidir

## Organ nakli hastalarının takibi

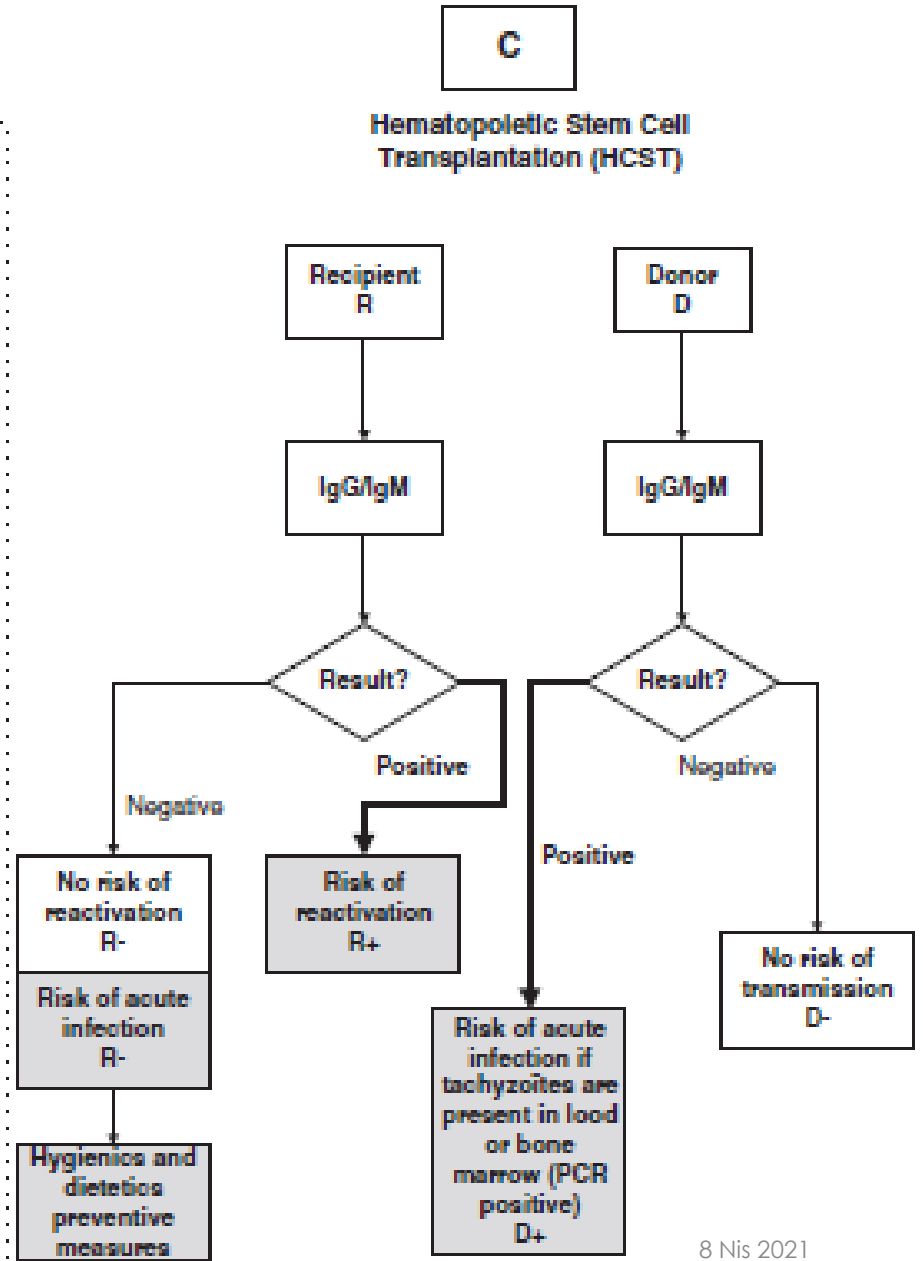
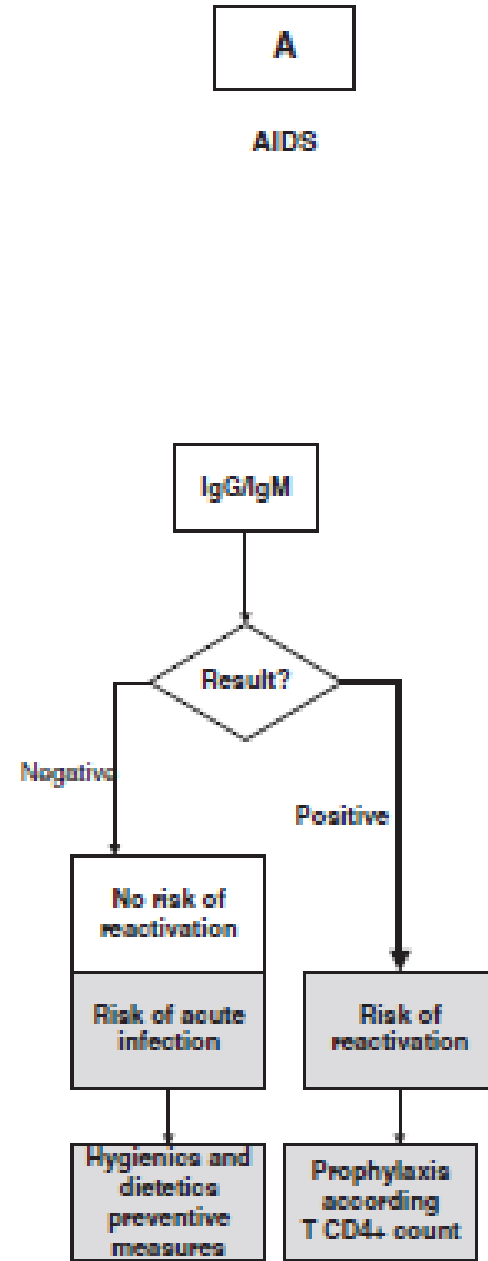
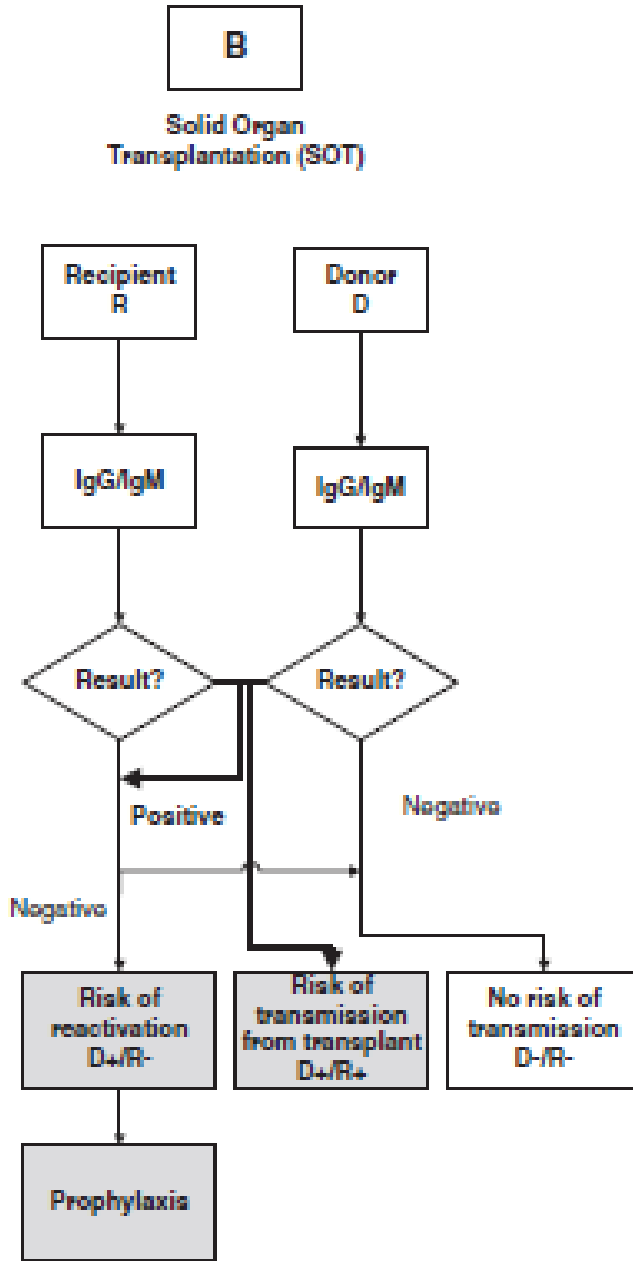
- Organ nakli yapılmadan önce hem vericide hem de alıcıda serolojik testlerin yapılması gereklidir
- **Solid organ nakli:**
  - Organ nakli açısından en riskli durum seropozitif vericilerden, seronegatif alıcılara kalp veya kalp-akciğer nakli yapılan durumdur
  - Organ reddinin önüne geçmek için verilen immünsupresif tedavi latent kistlerin reaktivasyonu ve disseminasyonuna neden olabilmektedir
  - Klinik tablo genellikle ilk 3 ay içerisinde ortaya çıkmakta olup, seropozitif vericiden seronegatif alıcıya kalp nakli yapıldığında profilaktik tedavi verilmemişse toksoplazmoz oranı %50-75'lere çıkabilmektedir

- ▶ Kalp nakli dışındaki organ nakillerinde geçiş riski daha düşüktür
- ▶ Seropozitif bir vericiden seropozitif bir alıcıya nakil yapıldığında da toksoplazmoz görülür, ancak enfeksiyonun geçişe mi bağlı olduğu veya alıcıdaki reaktivasyondan mı kaynaklandığına karar vermek zor olabilir
- ▶ Seronegatif bir vericiden seronegatif bir alıcıya nakil yapıldığında risk yoktur, ancak alıcıyı primer enfeksiyondan korumak için korunma önlemlerinin anlatılması gereklidir



➤ **Kök hücre nakli:**

- Allojenik kök hücre naklinde seropozitif alıcıda reaktivasyon sonucunda ortaya çıkan enfeksiyon oldukça şiddetli seyredebilmektedir
- Klinik tablo genellikle nakilden 2 ay sonra görülmektedir
- Seropozitif kök hücre nakli alıcılarında reaktivasyon prevalansı %0.6-6 iken, mortalite %60-90'ları bulmaktadır
- Seropozitif alıcı olduğunda reaktivasyon riskine karşı koruyucu olarak kotrimaksazol profilaksisi verilmelidir
- Seropozitif bir vericiden seronegatif alıcıya kök hücre nakli yapıldığında enfeksiyon riski yoktur (istisnai bir durum mevcut!), ancak enfeksiyonun primer olarak edinilmemesi için korunma önlemlerinin anlatılması önemlidir



## Sonuç

- Toksoplazmoz açısından riskli durumların belirlenmesi, tarama ve tanı algoritmalarının geliştirilmesi oldukça önemlidir
- Konjenital toksoplazmoz için Fransa Ulusal Tanı Merkezi tarafından oluşturulan ayda bir taramaya dayalı protokoller faydalı bulunmuştur
- Ancak her ülkenin kendi prevalansına ve ekonomik düzeyine göre kendi protokolünü oluşturması gerekmektedir