

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

dr Tijana A. Štajner

KLINIČKI ZNAČAJ  
MOLEKULARNE DIJAGNOSTIKE  
TOKSOPLAZMOZE  
KOD VISOKORIZIČNIH BOLESNIKA

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE

dr Tijana A. Štajner

CLINICAL SIGNIFICANCE OF  
MOLECULAR DIAGNOSIS  
OF TOXOPLASMOSIS  
IN HIGH-RISK PATIENTS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

**MENTOR:**

**Dr sc. med. Olgica Đurković-Đaković**, naučni savetnik

Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu

**Članovi komisije za odbranu:**

**Prof. dr Sanja Mitrović**, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Prof. dr Dragana Vujić**, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Prof. dr Olivera Kontić-Vučinić**, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Prof. dr Gordana Matić**, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Prof. dr Suzana Otašević**, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

Doktorska disertacija je u celini urađena u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za toksoplazmozu, u okviru Centra izuzetnih vrednosti za zoonoze prenošene hranom i vektorima Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu. Istraživanja u sklopu ove disertacije predstavljaju integralni deo aktivnosti planiranih i sprovedenih u okviru dva sukcesivna projekta Ministarstva Republike Srbije zaduženog za nauku: *Infekcije intracelularnim mikroorganizmima rastućeg značaja: transmisija, odnos patogen-domaćin, molekularna epidemiologija i klinički značaj (OI145002)* i *Kontrola infekcije Apikompleksnim patogenima: od novih mesta delovanja leka do predikcije (III41019)*, pod rukovodstvom dr sc. med. Olgice Đurković-Đaković, naučnog savetnika.

*Mojim roditeljima*  
*Arseniju i Marini Živković*

## ZAHVALNICA

Ova disertacija za mene predstavlja mnogo više od sažetka jednog istraživanja – ona za mene predstavlja dosezanje cilja jednog dugog putovanja koje su obeležili mnogi značajni ljudi i nezaboravna iskustva. Stoga ću ove redove iskoristiti da iskažem zahvalnost pre svega ljudima zbog kojih mi je svaki dan u proteklih sedam godina predstavljao novi profesionalni izazov.

Hvala mom mentoru, dr Olgici Đurković-Đaković, koja mi je pružila priliku da se naučnoistraživačkim radom bavim u jednom od tehnički najbolje opremljenih i najperspektivnijih Centara izuzetnih vrednosti u zemlji, kao i na mogućnosti da zaokružim svoje školovanje doktorskim studijama. Sopstvenim primerom mi je pokazala na koji način i na koliko frontova se žena mora boriti da bi ostvarila jednu od liderskih pozicija u srpskoj nauci.

Tokom svog dokorskog istraživanja saradivala sam sa svim kolegama koji su u tom periodu učestvovali u radu Nacionalne referentne laboratorije za toksoplazmozu te bih želela da se zahvalim svima na pomoći i savetima.

Zahvaljujem se dr Branku Bobiću i dr Aleksandri Nikolić na dragocenim savetima kojima su mi pomogli da zaobiđem greške koje bi eventualno nastale kao posledica mog neiskustva. Dr Ivani Klun hvala na podršci i pomoći prilikom statističke obrade podataka u sklopu moje doktorske disertacije.

Neizmerno hvala dr Mariji Marković i dr Vladimiru Ivoviću koji su me, uprkos predrasudama da jedan lekar nema šta da traži u oblasti rezervisanoj za molekularne biologe, strpljivo i predano uvodili u čaroban svet molekularne dijagnostike, kritikujući me kada mi motivacija opadne i bodreći me kada naiđem na naizgled nesavladive prepreke. Hvala vam na svim jutarnjim kafama koje smo zajedno popili, na svim šalama kojima smo se zajedno smejali, na trudu da mi prenesete svo vaše znanje i iskustvo. Hvala dr Vitomiru Đokiću koji me je svojim pozitivnim pristupom oslobodio straha i pomogao da se izveštim u radu sa laboratorijskim životinjama.

Veliko hvala Jeleni Srbljanović, Ireni Rajnpreht i Aleksandri Uzelac koje su, tokom dugih meseci pisanja moje doktorske disertacije, podnele najveći deo tereta tekućih laboratorijskih poslova.

Hvala članovima Komisije na svim sugestijama i korekcijama kojima su unapredili ovu disertaciju. Posebno hvala Prof. dr Dragani Vujić, velikom autoritetu i inspiraciji koja ulaže natčovečanske napore u unapređenje transplantacione medicine u Srbiji.

I na kraju, najveću zahvalnost dugujem onima koji su najzaslužniji što ova disertacija uopšte postoji. Iako je predmet teze van njihove sfere interesovanja, da nije bilo njihove bezuslovne ljubavi i svakodnevnih odricanja, redova koji slede ne bi bilo. Mama, tata i bato – hvala vam na svemu. Damire, hvala ti što mi ni u najtežim trenucima nisi pružio podršku da odustanem, što si me svojim magičnim optimizmom hrabrio kada je to bilo najpotrebnije i što si delima pokazao šta znači voleti ženu, uvek i uprkos svemu. Našem malom sinu, čije je rođenje obeležilo završetak ove disertacije i dalo najlepší mogući smisao svim izazovima kojima sam na ovom putu bila izložena.

Tijana Štajner

**REZIME**



*Toxoplasma gondii* je ubikvitarna parazitska protozoa, izazivač toksoplazmoze, jedne od najrasprostranjenijih zoonoza. Posebno osetljive na infekciju *T. gondii* su one kategorije populacije koje karakteriše nesposobnost imunskog sistema da kontroliše infekciju, a to su fetus, kod koga zbog nezrelosti imunskog sistema dolazi do neometane proliferacije parazita, i imunosuprimirane osobe, kod kojih prestanak imunskog nadzora dovodi do reaktivacije latentne infekcije. U ovim visokorizičnim kategorijama toksoplazmoza je skopčana sa ozbiljnim kliničkim posledicama koje se u slučaju pravovremene laboratorijske dijagnoze mogu prevenirati ili otkloniti primenom specifične terapije. Stoga je osnovni cilj ovog istraživanja podrazumevao implementaciju i sledstvenu evaluaciju kliničkog značaja molekularne detekcije parazita u sklopu algoritma za dijagnostiku kongenitalne (KT) i reaktivirane toksoplazmoze.

U cilju evaluacije metoda za dijagnostiku kongenitalne toksoplazmoze (KT), ispitivani su uzorci periferne krvi 80 trudnica, 60 uzoraka plodove vode, 5 uzoraka fetalne krvi, uzorci periferne krvi 55 novorođenčadi kao i uzorci periferne krvi 16 porodilja. U odsustvu organizovanog skrininga na toksoplazmozu trudnica u Srbiji, većina je upućivana na serološko ispitivanje u podmakloj trudnoći (77,5%), dok su odstupanja u uobičajenoj dinamici specifičnih antitela detektovana kod više od četvrtine slučajeva (27%). Time je naglašena važnost primene dijagnostičkih kriterijuma za određivanje vremena infekcije u odnosu na začecje. Upravo takvi kriterijumi, na osnovu kojih se procenjuje potreba za prenatalnom dijagnostikom KT u konkretnom slučaju, predstavljeni su u ovom radu. Kod većine trudnica koje su ispitivane u cilju procene rizika po plod, vreme infekcije je određeno na perikonceptualni period (70%), imajući za posledicu KT ploda u gotovo trećini slučajeva (29%). Primenom optimizovanog qPCR protokola, prenatalna dijagnoza KT postavljena je u 85% slučajeva. Plodova voda je potvrđena kao optimalan dijagnostički materijal, a uticaj terapije spiramicinom na efikasnost molekularne dijagnostike odbačen. Molekularna dijagnostika u ranom postnatalnom periodu doprinela je potvrdi KT u 71,4% ispitivane novorođenčadi. Statistička potvrda nadmoći molekularne u odnosu na konvencionalnu direktnu dijagnostiku KT ilustrovana je osetljivošću qPCR od 80%, naspram osetljivosti biološkog ogleada od 41,7%, uz 100% specifičnost i PPV, kao i visoku NPV (91,1%). Ipak, učešće biološkog ogleada u dijagnostičkom algoritmu pokazalo se nužnim, posebno ukoliko se kao materijal za dijagnostiku KT koristi krv. Od indirektnih parazitoloških

metoda primenjenih u ovom istraživanju, dokazivanje specifičnih IgA antitela u plodovoj vodi pokazalo se korisnim u detekciji fetalnog imunskog odgovora na infekciju, posebno kod perikonceptualnih infekcija majki, dok se detekcija IgM antitela pokazala nedovoljno osetljivom. U postnatalnom periodu, dokazivanje specifičnih IgA antitela je, pored WB testa, ustoličeno kao glavni dopunski parametar za imunodijagnostiku KT. WB test se pokazao osetljivijim od ISAgA testa (64,3% naspram 56,3% za IgA odnosno 37,5% za IgM), te je korist od WB testa bila posebno uočljiva u slučajevima nedetektabilnih specifičnih IgM i IgA antitela.

Ukupno, kombinovanom primenom molekularnih, bioloških i seroloških metoda u ovom istraživanju dijagnoza KT postavljena je u 25 slučajeva – u 17 slučajeva prenatalno a nakon rođenja u osam.

U drugom delu istraživanja ispitivan je doprinos molekularne detekcije *T. gondii* u sklopu dijagnostike reaktivacije latentne infekcije. Rizik od potencijalne reaktivacije toksoplazmoze u posttransplantacionom periodu procenjivan je pretransplantativnim serološkim ispitivanjem 25 potencijalnih primalaca i 18 davalaca matičnih ćelija hematopoeze (HSC) kao i kod 18 bolesnika posle HSCT. Reaktivacija toksoplazmoze je detektovana kod ukupno 17,6% seropozitivnih primalaca HSC, što je značajno češće nego što je opisano u literaturi. U svim dijagnostikovanim slučajevima reaktivacije davaoci su bili seronegativni. Dok se ispitivanje dinamike specifičnih IgM, IgA i IgG antitela kod primalaca nakon transplantacije pokazalo nedovoljno informativnim, značaj molekularne dijagnostike, posebno u ranoj detekciji reaktivacije, potvrđen je, naročito u prisustvu veoma malog broja parazita u krvi. Takođe, pokazana je i korelacija broja parazita u ispitivanom biološkom materijalu sa težinom kliničkih simptoma reaktivacije. Primena optimizovanog qPCR protokola u ovom istraživanju omogućila je i praćenje terapijskog efekta. Povoljan efekat (meren smanjenjem broja ili iščezavanjem parazita u uzorku periferne krvi) primećen je kod svih bolesnika sa reaktivacijom nekoliko dana po započinjanju antitoksoplazmatske terapije.

Ovaj rad predstavlja prve rezultate organizovane primene savremenih molekularnih metoda u okviru algoritma dijagnostike kongenitalne i reaktivirane toksoplazmoze u Srbiji ali i u sklopu monitoringa efekta specifične terapije, čime doprinosi unapređenju zdravstvene zaštite visokorizičnih kategorija populacije.

**Ključne reči:** *Toxoplasma gondii*, toksoplazmoza, trudnoća, fetus, plodova voda, transplantacija, HSCT, reaktivacija, molekularna dijagnostika, qPCR

**Naučna oblast:** medicina

## **SUMMARY**

*Toxoplasma gondii* is a ubiquitous protozoan parasite causing toxoplasmosis, one of the most prevalent zoonoses. Although generally mild and self-limiting in immunocompetent individuals, *T. gondii* infection may cause life-threatening disease in the fetus and in the immunosuppressed host. Thus, in these high-risk patients, prompt and precise laboratory diagnosis of toxoplasmosis is a prerequisite for timely introduction of specific treatment. Hence, the main aim of this research was to implement molecular, PCR-based methods in the diagnostic algorithm of both congenital (CT) and reactivated toxoplasmosis in order to evaluate its clinical significance.

To evaluate methods for the diagnosis of CT, this study included sample analysis of 80 pregnant women (peripheral blood), 65 fetuses (60 amniotic fluid and 5 fetal blood samples), 55 neonates (neonatal blood) and 16 women first tested after childbirth. Due to an absence of systematic screening program in Serbia, the majority of women enrolled in this study (77.5%) were first tested in advanced pregnancy and unusual serological findings (residual IgM antibody and prolonged maturation of IgG avidity) were detected in 27%. To date maternal infection vs. conception, a set of diagnostic criteria based on the expected kinetics of specific IgM and maturation of specific IgG avidity over time were developed, allowing for individual estimation of the need to conduct the diagnosis of CT. Infection was dated to periconceptual period in 70% of pregnant women which resulted in CT in 29% of the cases, suggesting prolonged incubation after *T. gondii* infection in pregnancy.

Optimized qPCR protocol enabled prenatal diagnosis of CT in 85% and postnatal diagnosis in 71.4% of cases. Amniotic fluid was confirmed to be an optimal material for molecular diagnosis. The results of prenatal diagnosis were not affected by spiramycin treatment. Superiority of molecular vs. conventional diagnosis of CT was further documented by performance characteristics of newly established qPCR protocol - 80% sensitivity (vs. 41.7% sensitivity of bioassay), 91.1% negative predictive value (NPV) and 100% specificity and positive predictive value (PPV). However, although time-consuming (5-6 weeks needed for the result), bioassay remains indispensable in the diagnostic algorithm of CT, especially if the sample material is fetal or neonatal blood. Among indirect methods, the results of sensitive IgA-ISAgA in amniotic fluid were highly useful for detection of fetal immune response, especially in cases of periconceptual infection, unlike the IgM-ISAgA results. Detection of specific IgA antibodies in neonatal blood, along with the WB test, represented the pivotal element of serological diagnosis of CT in postnatal period. WB turned out to be equally successful in confirmation of prenatally as well as in postnatally diagnosed CT and

more sensitive than ISAgA (64,3% in comparison with 56,3% of IgA and 37,5% of IgM) which is why the result of WB test was especially valuable in cases of undetectable specific IgA and IgM antibodies.

Overall, using a complex algorithm for the diagnosis of CT which included molecular, biological and serological methods, 25 cases of CT were diagnosed in this series. Of these, 17 were diagnosed prenatally and eight after birth.

Furthermore, this study was also focused on the evaluation of the clinical significance of molecular detection of *T. gondii* reactivation during the post-HSCT period. Pretransplantation serological screening of potential HSC recipients (25) and donors (18) allowed for the estimation of the posttransplantation reactivation risk and 18 recipients were further monitored for post-HSCT reactivation. Reactivation of latent infection was detected in 17.6% of seropositive recipients, which is significantly higher than previously described. Seronegative status of the HSC donor was identified as risk factor for post-HSCT reactivation in all diagnosed cases. While the posttransplantation dynamics of specific IgM, IgA and IgG antibodies did not contribute to the diagnosis of reactivated toxoplasmosis in HSC recipients, the superiority of molecular methods especially in the early diagnosis of reactivation was evident, even in miniscule parasitemia. Furthermore, the severity of clinical manifestations correlated with the number of parasites in clinical samples analyzed in this study. Optimized qPCR protocol enabled the monitoring of the effect of specific treatment. Favorable outcome (reflected in reduction or complete clearance of parasitemia) was observed in all *T. gondii*-reactivated patients only a few days upon initiation of specific treatment.

Finally, this research provides the very first and original results of organized application of modern molecular methods in the diagnostic algorithm of both congenital and reactivated toxoplasmosis in Serbia, but also in the monitoring of the effect of specific treatment, providing a solid base for significant healthcare improvement of high-risk patients.

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis, pregnancy, fetus, amniotic fluid, transplantation, HSCT, reactivation, molecular diagnostics, qPCR

**Scientific field:** medicine

# **SADRŽAJ**

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. ŽIVOTNI OBLICI <i>T.gondii</i> .....	4
1.1.1. Tahizoit.....	5
1.1.2. Bradizoit.....	5
1.1.3. Sporozoit.....	6
1.2. ŽIVOTNI CIKLUS <i>T. gondii</i> .....	6
1.3. EPIDEMIOLOGIJA.....	9
1.3.1. Putevi zaražavanja ljudi.....	10
1.3.1.1. Toksoplazmoza kao posledica ingestije životnih oblika parazita.....	10
1.3.1.1.1. Infekcija bradizoitima (tkivnim cistama).....	10
1.3.1.1.2. Infekcija sporozoitima (oocistama).....	11
1.3.1.1.3. Ingestija tahizoita.....	12
1.3.1.2. Kongenitalna toksoplazmoza.....	12
1.3.1.3. Toksoplazmoza kao komplikacija transplantacije organa.....	16
1.3.1.3.1. Toksoplazmoza preneta inficiranim organom.....	17
1.3.1.3.2. Reaktivirana toksoplazmoza.....	18
1.4. METODE LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE.....	20
1.4.1. Indirektne dijagnostičke metode.....	21
1.4.1.1. Kvantitativni imunodijagnostički (serološki) testovi.....	21
1.4.1.2. Kvalitativni imunodijagnostički (serološki) testovi.....	25
1.4.2. Direktne dijagnostičke metode.....	26
1.4.2.1. Izolacija parazita <i>T. gondii</i> u kulturi ćelija.....	26
1.4.2.2. Izolacija parazita <i>T. gondii</i> u laboratorijskim miševima (biološki ogled).....	26
1.4.2.3. Dokazivanje DNK <i>T. gondii</i> (metodama baziranim na PCR-u).....	27
<b>2. CILJ RADA</b> .....	<b>30</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>32</b>
3.1. MATERIJAL.....	33
3.2. METODE.....	34
3.2.1. Indirektne metode za dijagnostiku infekcije <i>T. gondii</i> (serološke analize).....	35
3.2.1.1. Kvantitativni serološki testovi.....	35



3.2.1.1.1. Testovi za detekciju IgG antitela specifičnih za <i>T. gondii</i> .....	36
3.2.1.1.2. Testovi za detekciju IgM antitela specifičnih za <i>T. gondii</i> .....	38
3.2.1.1.3. Testovi za detekciju IgA antitela specifičnih za <i>T. gondii</i> .....	42
3.2.1.2. Kvalitativni serološki testovi .....	43
3.2.2. Direktno metode za dijagnostiku infekcije <i>T. gondii</i> .....	45
3.2.2.1. Biološki ogleđ .....	45
3.2.2.2. Molekularna dijagnostika .....	46
3.2.2.2.1. Ekstrakcija (izolacija) DNK iz ispitivanog materijala .....	46
3.2.2.2.2. Kvantitativni PCR (qPCR, real-time PCR) .....	48
3.3. STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA .....	57
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>59</b>
4.1. ANALIZA USPEŠNOSTI MOLEKULARNE DIJAGNOSTIKE	
KONGENITALNE TOKSOPLAZMOZE PRIMENOM qPCR .....	60
4.1.1. Određivanje statusa infekcije <i>T. gondii</i> kod ispitivanih trudnica .....	60
4.1.1.1. Trudnice koje nisu serološki praćene nakon porođaja .....	63
4.1.1.2. Trudnice koje su serološki praćene i nakon porođaja .....	65
4.1.2. Poređenje qPCR sa konvencionalnim metodama prenatalne dijagnostike	
KT .....	66
4.1.2.1. Prenatalna dijagnostika KT bez postnatalnog ispitivanja .....	67
4.1.2.1.1. Rezultati qPCR analize .....	67
4.1.2.1.2. Rezultati bioloških ogleđa .....	68
4.1.2.1.3. Uporedni rezultati direktne parazitološke dijagnostike .....	68
4.1.2.1.4. Rezultati detekcije specifičnih IgM i IgA antitela .....	69
4.1.2.2. Prenatalna dijagnostika KT dopunjena postnatalnim ispitivanjem .....	71
4.1.2.2.1. Rezultati qPCR analize .....	72
4.1.2.2.2. Rezultati bioloških ogleđa .....	73
4.1.2.2.3. Uporedni rezultati direktne parazitološke dijagnostike .....	75
4.1.2.2.4. Rezultati detekcije specifičnih IgM i IgA antitela .....	75
4.1.3. Poređenje qPCR sa konvencionalnim metodama postnatalne dijagnostike	
KT .....	77
4.1.3.1. Novorođenćad čije su majke ispitivane na toksoplazmozu u trudnoći .....	77
4.1.3.1.1. Uporedni rezultati direktne parazitološke dijagnostike .....	77
4.1.3.1.2. Rezultati detekcije specifičnih IgM i IgA antitela .....	78

4.1.3.1.3. Rezultati poređenja imunoloških profila majke i novorođenčeta WB testom ...	79
4.1.3.2. Novorođenčad čije majke nisu ispitivane na toksoplazmozu u trudnoći .....	81
4.1.3.2.1. Rezultati qPCR analize .....	82
4.1.3.2.2. Rezultati bioloških oglada .....	82
4.1.3.2.3. Uporedni rezultati direktne parazitološke dijagnostike .....	83
4.1.3.2.4. Rezultati detekcije specifičnih IgM i IgA antitela .....	83
4.1.3.2.5. Rezultati poređenja imunoloških profila majke i novorođenčeta WB testom ...	83
4.1.4. Analiza sumiranih rezultata prenatalne dijagnostike kongenitalne toksoplazmoze .....	85
4.1.5. Analiza sumiranih rezultata dijagnostike kongenitalne toksoplazmoze u postnatalnom periodu .....	89
4.1.6. Analiza sumiranih rezultata dijagnostike kongenitalne toksoplazmoze .....	94
4.2. ANALIZA USPEŠNOSTI MOLEKULARNE DIJAGNOSTIKE REAKTIVIRANE TOKSOPLAZMOZE PRIMENOM qPCR .....	97
4.2.1. Rezultati posttransplantacione serološke dijagnostike toksoplazmoze .....	100
4.2.2. Rezultati posttransplantacione molekularne dijagnostike toksoplazmoze .....	101
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>105</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>129</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>133</b>
<b>8. PRILOZI .....</b>	<b>152</b>

# **UVOD**

*Toxoplasma gondii* je intracelularna protozoa ubikvitarne distribucije. Sposobnost ovog parazita da inficira gotovo sve toplokrvne životinje (sve sisare i ptice) ilustruje njegov značaj u veterinarskoj medicini, dok je važnost *T. gondii* sa aspekta humane medicine potencirana činjenicom da je ovom protozom zaraženo 25-30% globalne populacije (Montoya i Liesenfeld, 2004).

Interesovanje naučne javnosti za različite aspekte infekcije *T. gondii* ne jenjava iako je od otkrića ovog organizma prošlo više od 100 godina. Naime, 1908. godine, u laboratoriji Pasterovog Instituta u Tunisu, Nicolle i Manceaux izolovali su iz krvi i tkiva glodara *Ctenodactylus gundii* protozou koju su prvobitno greškom smatrali piroplazmom, a potom lajšmanijom. Međutim, karakteristična morfologija po kojoj je parazit i dobio ime (grč. *toxon* = luk, *plasma* = uobličen) nedugo zatim je nedvosmisleno ukazala da je reč o novootkrivenom organizmu (Nicolle i Manceaux, 1908). Interesantno, gotovo istovremeno je na drugom kraju sveta, u Brazilu, Splendore uočio prisustvo istog organizma u tkivima zeca ali ga nije imenovao, misleći da je reč o lajšmaniji (Splendore, 1908).

Od otkrića do prve uspešne izolacije ove protozoe, najpre iz životinjskog a potom i iz humanog materijala prošlo je gotovo 30 godina (Sabin i Olitsky, 1937; Wolf i sar., 1939). Wolf i sar. su prvi doveli *T. gondii* u vezu sa bolešću kod ljudi, nakon uspešne izolacije ovog parazita iz tkiva kongenitalno inficiranog novorođenčeta sa

simptomima encefalitisa i horioretinitisa. Potom je Sabin dokazao da se ovaj soj ne razlikuje biološki niti imunološki od životinjskih izolata (Sabin, 1941), a opisani trijas simptoma – hidrocefalus i/ili mikrocefalus, intracerebralne kalcifikacije i horioretinitis predložio kao klinički orijentir za opisivanje slučajeva kongenitalne toksoplazmoze (Sabin, 1942). Paralelno sa otkrićem kongenitalne toksoplazmoze, Sabinu je pošlo za rukom da izoluje *T. gondii* i iz moždanog tkiva šestogodišnjeg dečaka sa simptomima generalizovane limfadenopatije i splenomegalije a soj koji je očuvan inokulacijom u miševu i nazvan RH još i danas se pasażama uspešno održava u laboratorijama širom sveta, uključujući i Nacionalnu referentnu laboratoriju za toksoplazmozu (NRLT) u Srbiji.

U godinama koje su usledile, ubrzano se radilo na otkriću i opisu životnih oblika *T. gondii*, da bi tek sa detaljnim opisom enteroepitelijalne, odnosno seksualne faze razmnožavanja u životinjama iz porodice *Felida* u potpunosti bio rasvetljen životni ciklus ovog parazita čiji je definitivni domaćin mačka a prelazni gotovo svi toplokrvni organizmi, uključujući i čoveka (Frenkel i sar., 1970; Hutchison i sar., 1970; Sheffield i Melton, 1970; Dubey i Frenkel, 1972). Tada su ispunjeni svi uslovi za uspešnu klasifikaciju ovog parazita koji pripada filumu Apicomplexa, podklasi Coccidia, a uprkos globalnoj distribuciji i širokom opsegu domaćina, postoji samo jedna vrsta u okviru roda *Toxoplasma*, čiji je naziv izveden iz naziva vrste prelaznog domaćina u kome je ovaj organizam inicijalno otkriven.

Phylum: Apicomplexa; Levine, 1970
Class: Sporozoasida; Leukart, 1879
Subclass: Coccidiasina; Leukart, 1879
Order: Eimeriorina; Leger, 1911
Family: Toxoplasmatidae, Biocca, 1956
Genus: <i>Toxoplasma</i> Nicolle and Manceaux, 1909

Za razumevanje značaja toksoplazmoze u humanoj patologiji neophodno je ne samo poznavanje životnih oblika, reproduktivnog ciklusa, virulencije i genetskih karakteristika izazivača, već i svojstava domaćina, pre svega sposobnosti imunskog odgovora na infekciju. Kako je očuvan imunski sistem domaćina osnovni ograničavajući faktor u širenju infekcije i prevenciji oštećenja organizma parazitom koji

se vrlo uspešno razmnožava i ima kapacitet da parazitira u svim nukleisanim ćelijama, posledice toksoplazmoze su najozbiljnije u kategorijama populacije čiji je imunski odgovor nerazvijen ili neadekvatan, a to su fetus i imunosuprimirani bolesnici.

## 1.1. ŽIVOTNI OBLICI *T.gondii*

### Osnovne morfološke karakteristike

U toku svog životnog ciklusa, ovaj parazit prolazi kroz više razvojnih oblika od kojih su najznačajnija tri infektivna životna oblika - **tahizoit**, **bradizoit** i **sporozoit**. Oni se međusobno razlikuju po ultrastrukturnim specifičnostima, nivou metaboličke aktivnosti i stepenu infektivnosti mada su sva tri infektivna kako za stalne, tako i za prelazne domaćine. Polumesečastog su oblika, blago zašiljenog na apikalnom i zaobljenog na posteriornom kraju parazita. Telo parazita oivičeno je spoljašnjom membranom – plazmalemom, dok unutrašnja membranska ovojnica zajedno sa konoidom, apikalnim i polarnim prstenovima i mrežom mikrotubula ulazi u sastav citoskeleta koji ima ključnu ulogu u pokretljivosti parazita. Komponente citoskeleta koncentrisane u apikalnom delu ćelije parazita (konoid, apikalni i polarni prstenovi i kompleksna mreža mikrotubula), zajedno sa sekretornim organelama (roptrije, mikroneme i apikalno lokalizovane guste granule) sačinjavaju **apikalni kompleks**, formaciju karakterističnu za sve pripadnike filuma *Apicomplexa* koja ima ključnu ulogu u invaziji ćelije domaćina. Još jedna specifičnost *Apicomplexa* je i prisustvo **apikoplasta**, organele nalik plastidu odnosno hloroplastu biljaka, koja predstavlja rezultat sekundarne endosimbioze sa slobodnoživućim crvenim algama i koja je evolutivno izgubila sposobnost fotosinteze (Roos i sar., 1999). Apikoplast je organela ovalnog oblika oivičena multiplim membranama koja se nalazi u neposrednoj blizini jedra i mitohondrija i koja je, i pored nedovoljno rasvetljene funkcije, od vitalnog značaja za *T. gondii*. Brojna istraživanja usmerena na razvoj novih lekova protiv pripadnika *Apicomplexa* kao ciljnu strukturu uzimaju upravo apikoplast. U unutrašnjosti parazita smešteno je i jedro sa nukleolusom, mitohondrija, endoplazmatski retikulum (gladak i granulirani), ribozomi, Goldžijev kompleks i amilopektinske granule.

### 1.1.1. Tahizoit

Već sam naziv (grč. *tahos* = brzina) govori da je u pitanju vegetativni, brzodeleća oblik parazita koja se putem multiplih ciklusa endodiogenije razmnožava u praktično svim ćelijama prelaznog odnosno u ekstraintestinalnim epitelnim ćelijama stalnog domaćina (Frenkel, 1973). Endodiogenija je poseban vid aseksualne reprodukcije tokom kojeg unutar roditeljske ćelije deobom jedra i organela i asimilacijom roditeljske membrane nastaju dve ćerke ćelije – progenije (Goldman i sar., 1958; Dubey, 1998.; Nishi i sar., 2008).

Invazija ćelije domaćina od strane tahizoita je aktivan,  $Ca^{2+}$ -zavistan proces koji se odvija za manje od 30 sekundi dovodeći do privremene deformacije tahizoita koji poprima ovoidan oblik. Tahizoit je okružen novoformiranom membranom u unutrašnjosti ćelije domaćina koja sačinjava parazitoforusnu vakuolu i koja predstavlja optimalnu sredinu za razmnožavanje parazita koji nakon formiranja 64-128 parazita obično napuštaju ćeliju (Black i Boothroyd, 2000; Sibley, 2010). Tahizoiti se potom krvotokom diseminuju do udaljenih ćelija, koje na isti način invadiraju.

Ovaj životni oblik *T. gondii* odgovoran je za nastanak diseminovane, akutne faze primarne infekcije ili reaktivaciju latentne infekcije.

### 1.1.2. Bradizoit

Bradizoit (grč. *bradi* = spor) je sporodeleći životni oblik koji se u ćelijama domaćina nalazi tokom hronične faze infekcije u formi **tkivnih cista** (Dubey i Beattie, 1988). Bradizoiti nastaju konverzijom tahizoita pod uticajem imunskog sistema domaćina koji ima presudnu ulogu u procesu ograničavanja infekcije.

Otpornost tkivnih cista na proteolitičke enzime i kiselu sredinu želuca omogućava njihovu transmisiju putem ingestije (Jacobs i sar., 1960).

Eksperimentalno je pokazano da se tkivne ciste u domaćinu mogu formirati od trećeg dana nakon inokulacije parazita (Dubey i Frenkel, 1976). Razvijaju se inicijalno unutar parazitoforusne vakuole, zid im je tanak ( $< 0,5 \mu\text{m}$ ) i elastičan, ali detalji vezani za sam proces formiranja ciste *in vivo* i građu njenog zida još uvek su nedovoljno razjašnjeni (Ferguson, 2004). Mada se tkivne ciste mogu razviti i u visceralnim

organima (pluća, jetra, bubrezi), predilekciona mesta za njihov razvoj su centralni nervni sistem (mozak i retina) i mišići (skeletni i srčani mišić). Unutar tkivne ciste, bradizoiti se razmnožavaju endodigenijom što, usled povećanja broja parazita dovodi do rasta ciste koje poprimaju dimenzije od svega 5  $\mu\text{m}$  (dva bradizoita) do 100  $\mu\text{m}$ , kao i oblik ćelije domaćina u kojoj se nalaze. Moždane ciste su okrugle dok su ciste u skeletnim mišićima vretenastog oblika i mogu sadržavati i više hiljada bradizoita (Dubey, 2010).

Niska metabolička aktivnost bradizoita i adekvatan imunski odgovor domaćina uslovljavaju dugoročan (praktično doživotan) nesmetan opstanak tkivnih cista *T. gondii* u ćeliji domaćina. Međutim, u stanjima imunosupresije može doći do ruptore cista, ekscistacije bradizoita i njihove rekonverzije u tahizoite koji nanovo pokreću proces diseminacije infekcije.

### 1.1.3. Sporozoit

Sporozoit je razvojni oblik *T. gondii* koji se nalazi unutar zrelih **oocista**. Nezrele forme oocista izbacuju se putem fecesa stalnog domaćina (životinje iz porodice Felida) u spoljašnju sredinu u kojoj se odvija njihova sporulacija, i tek sporulacijom oocista postaje infektivna. Zrela, sporulisana oocista sadrži dve sporociste sa po četiri sporozoita koji predstavljaju oblik infektivan i za čoveka i za druge domaćine.

Morfološki, sporozoit je sličan tahizoitu, dimenzija 2 x 6-8  $\mu\text{m}$ , sa subterminalno postavljenim jedrom. Međutim, za razliku od tahizoita, sporozoit nema mikroneme, roprije i amilopektinske granule (Dubey, 1998).

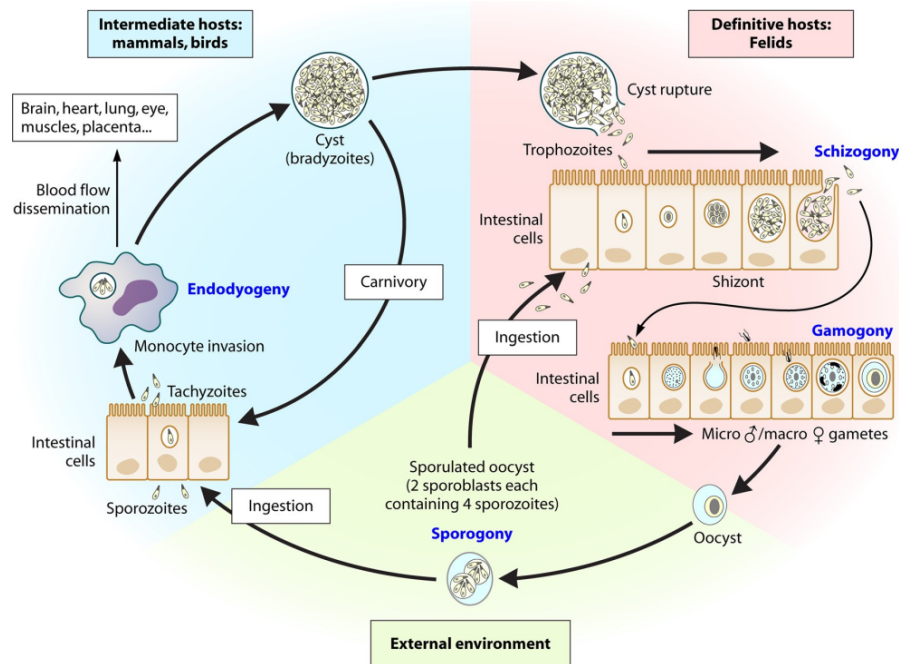
## 1.2. ŽIVOTNI CIKLUS *T. gondii*

Kompleksan životni ciklus *T. gondii* obuhvata fazu seksualnog razmnožavanja (šizogonija, gametogonija i sporogonija) koja se odvija isključivo u enterocitima definitivnog domaćina (životinje iz porodice Felidae – domaće ili divlje mačke) i aseksualnu fazu razmnožavanja koja podrazumeva endodigeniju tahizoita, odnosno bradizoita u svim nukleisanim ćelijama kako stalnog, tako i prelaznog domaćina.



Mačke mogu produkovati a potom i ekskretovati oociste nakon ingestije bilo kojeg od tri razvojna oblika parazita. Prepatentni period (vreme od inicijalne infekcije do početka izbacivanja oocista) varira u zavisnosti od oblika *T. gondii* koji je izazvao infekciju – 3 do 10 dana nakon ingestije tkivnih cista,  $\geq 13$  dana od ingestije tahizoita (Dubey, 1998) i  $\geq 18$  dana nakon infekcije oocistama (Dubey, 1996). Nakon ingestije svega nekoliko bradizoita mačke mogu sekretovati milione oocista (Dubey i Frenkel, 1976; Dubey, 1996; Dubey, 1998).

Nakon ingestije tkivne ciste, pod dejstvom proteolitičkih enzima u želucu i tankom crevu mačke dolazi do rupture ciste i oslobađanja bradizoita koji invadiraju epitelne ćelije tankog creva u kojima započinju seriju ciklusa aseksualnog razmnožavanja - šizogonije. U toku šizogonije, unutar enterocita dolazi do podele jedra parazita (dve ili više) koja nije praćena podelom citoplazme, čime nastaju mladi šizonti. Nakon formiranja četiri ili više jedra, u centru zrelih šizonata deli se i citoplazma, čime nastaju merozoiti. Ovi se oslobađaju prskanjem šizonata i inficiraju nove ćelije. Jedan broj merozoita se u ćelijama dalje razvija u pravcu gametogonije, otprilike dva dana nakon ingestije tkivne ciste od strane definitivnog domaćina. Od merozita, najčešće u epitelnim ćelijama ileuma nastaju gametociti koji se potom diferenciraju u ženske (makrogamete) i muške (mikrogamete). Zahvaljujući prisustvu dve flagele, mikrogameti su pokretljiviji, što im omogućava da doplivaju do mikrogameta i oplode ga, što rezultira nastankom zigota. Nakon oplodjenja, oko parazita se formira zid oociste koja rupturom inficiranog enterocita biva oslobođena u lumen creva. Nesporulisane oociste su sferoidnog oblika, dvoslojnog zida, dijametra 10-12  $\mu\text{m}$ . Sporulacija, odnosno sazrevanje oocista koje rezultira njihovom infektivnošću kako za prelazne, tako i za stalne domaćine odvija se unutar pet dana od njihovog dospevanja (fecesom inficirane mačke) u spoljnu sredinu. Visoka vlažnost vazduha i temperaturni interval od 4<sup>0</sup>C-37<sup>0</sup>C predstavljaju optimalne uslove za sazrevanje oocista (Dubey, 1996). U toku sporulacije dolazi do mejoze praćene morfološkim promenama, tako da je sporulisana oocista elipsoidnog oblika, dijametra 11 x 13  $\mu\text{m}$ , a sastoji se od dve elipsoidne sporociste od kojih svaka sadrži po četiri sporozoita (Dubey, 1998).



Slika 1. Životni ciklus *T. gondii* (preuzeto iz Robert-Gangneux i Darde, 2012)

U prelaznim domaćinima međutim, odvija se samo aseksualni ciklus razmnožavanja. Ukoliko se prelazni domaćin inficira oocistama, sporozoiti oslobođeni u lumenu digestivnog trakta invadiraju enterocite u kojima se diferenciraju u tahizoite. Tahizoiti zatim započinju proces endodigenije najpre u enterocitima, a nakon diseminacije putem krvotoka odnosno limfotoka, mogu se razmnožavati u praktično svim nukleisanim ćelijama organizma. Kompetentan najpre ćelijski a potom i humoralni imunski odgovor domaćina uslovljava konverziju tahizoita u bradizoite i formiranje intracelularnih tkivnih cista unutar nekoliko dana od akvizicije infekcije. Infekcija prelaznih domaćina tkivnim cistama ima sličan razvojni put. Nakon oslobađanja bradizoita, oni penetrišu epitelne ćelije tankog creva i diferenciraju se u tahizoite koji otpočinju proces rapidnog razmnožavanja koji rezultira diseminacijom i na kraju, incistacijom parazita u predilekcionim tkivima.

### 1.3. EPIDEMIOLOGIJA

Danas se smatra da je 25-30% svetske populacije inficirano toksoplazmom (Montoya i Liesenfeld, 2004). Međutim, postoje velike varijacije u prevalenci infekcije kako među različitim zemljama, tako i među različitim regionima jedne zemlje. Najniža zabeležena prevalenca je ona u Koreji (4%) (Ryu i sar., 1996) a najviša u Brazilu (92%) (Figueiro-Filho i sar., 2007). Zapravo, globalno gledano, prevalenca infekcije značajno je viša na južnoj u odnosu na severnu hemisferu, što se objašnjava povoljnijim uslovima za opstanak i sporulaciju oocista u uslovima tople i vlažne klime (Dubey, 2010). Međutim, uprkos velikim geografskim razlikama u zastupljenosti infekcije *T. gondii*, na globalnom planu je tokom poslednje dve decenije zabeležen trend opadanja prevalencije. Ovaj trend je najuočljiviji u zemljama sa višedecenijskim programima obaveznog serološkog praćenja trudnica, kao što su Austrija i Francuska (Aspöck i Pollak, 1992; Berger i sar., 2008), koje je omogućilo kontinuiran i sistematski uvid u kretanje prevalencije infekcije u tim sredinama. U istraživanju Berger i sar. (Berger i sar., 2008) kojim su obuhvaćene žene u generativnom periodu (20-40 godina) u periodu od 1995-2003. godine, zabeležen je trend opadanja seroprevalencije podjednako zastupljen u svih pet starosnih grupa (20, 25, 30, 35, 40): od 37,6-65,4% u 1995. na 31,0-56,8% u 2003. godini. Slično istraživanje sprovedeno na teritoriji SAD (*National Health and Nutrition Examination Survey*, NHANES) u periodu od 1999-2004. rezultiralo je podacima o smanjenju prevalencije infekcije kod ukupne populacije uzrasta 12-49 godina (9% u odnosu na 14,1% u periodu od 1988-1994) kao i o prevalenci žena starosti 15-44 godine od 11% (Jones i sar., 2007).

Trend opadanja prevalencije zahvatio je i zemlje Balkanskog poluostrva, tako da je u 2000-tim niža od 50% (Bobić i sar., 2011). Gotovo trostruki pad prevalencije tokom poslednje dve decenije zabeležen je i kod žena generativne dobi u Srbiji. Naime, od 1988. do 2007. godine prevalenca je opala sa 86% na 31% (Bobić i sar., 2003; Bobić i sar., 2007). Ovi podaci ukazuju na rastuću potrebu kako prevencije, tako i pažljivijeg praćenja serološkog statusa ne samo trudnica već i žena koje planiraju trudnoću, imajući u vidu da je gotovo 70% žena u generativnom periodu u našoj zemlji izloženo primoinfekciji u trudnoći.

### **1.3.1. Putevi zaražavanja ljudi**

Infekcija *T. gondii* kod imunokompetentnih osoba u najvećem broju slučajeva predstavlja rezultat ingestije nekog od životnih oblika ovog parazita. Međutim, kod imunski nezrelog fetusa toksoplazmoza se razvija kao posledica vertikalne transmisije parazita tokom infekcije majke u trudnoći, dok kod imunosuprimiranih osoba koje se leče transplantacijom organa predstavlja čestu oportunističku infekciju.

#### **1.3.1.1. Toksoplazmoza kao posledica ingestije životnih oblika parazita**

Toksoplazmoza se najčešće razvija nakon konzumiranja nedovoljno termički obrađenog mesa, povrća i voća koje raste pri zemlji kao i ingestijom kontaminirane vode ili zemlje.

Čovek se može inficirati bilo kojim od tri životna oblika *T. gondii*.

##### **1.3.1.1.1. Infekcija bradizoitima (tkivnim cistama)**

Poznato je da se ciste *T. gondii* mogu naći u tkivima svih toplokrvnih životinja ali i ptica. Stoga, konzumacija neadekvatno fizički ili hemijski obrađenog mesa inficiranih životinja može rezultirati infekcijom čoveka. Neadekvatna termička obrada mesa identifikovana je kao vodeći faktor rizika u epidemiološkim studijama kojima je obuhvaćena populacija žena u generativnom dobu na teritoriji Beograda ali i čitave Srbije (Bobić i sar., 1998; Bobić i sar., 2003). Ciste naime uspešno preživljavaju nedeljama na temperaturi frižidera (oko 4°C) dok su neotporne na temperature zamrzivača (niže od -12°C), što zamrzavanje mesa u trajanju dužem od 48h (u zavisnosti od količine mesa) čini bezbednim za upotrebu (Dubey, 1988; Djurković-Djaković i Milenković, 2000). Otpornost cista na visoke temperature, s druge strane, zavisi ne samo od visine temperature već i od dužine termičke obrade. Ciste ostaju vijabilne na temperaturi od 60°C tokom 4 minuta kao i na 50°C tokom 10 minuta (Dubey i sar., 1990). Zastupljenost cista *T. gondii* u mesu životinja koje se koriste za ishranu ljudi procenjuje se na osnovu prisustva *T. gondii*-specifičnih antitela u uzorcima seruma ispitivanih životinja. Studije seroprevalence pokazuju velike varijacije u učestalosti infekcije životinja čije se meso najčešće koristi za ljudsku ishranu na

globalnom nivou: 1-98% kod svinja, 0-99% kod goveda i 0-96% kod ovaca (Halli sar., 2001). Prema rezultatima obimne seroepizootiološke studije sprovedene na teritoriji Srbije, seroprevalenca toksoplazmoze u svinjama iznosi 28,9%, u govedima 76,3% i 84,5% u ovcama (Klun i sar., 2006).

#### **1.3.1.1.2. Infekcija sporozoitima (oocistama)**

Inficirana mačka može izbaciti više od 100 miliona oocista čije se sazrevanje odvija u spoljašnjoj sredini tokom narednih 4-5 dana, zbog čega do infekcije ljudi ređe dolazi nakon direktnog kontakta sa zaraženom mačkom a mnogo češće indirektnim kontaktom sa oocistama kontaminiranom vodom, zemljištem ili konzumacijom povrća i voća koje raste u/pri zemlji (Kapperud i sar., 1996; Cook i sar., 2000; Jones i sar., 2009).

Sporulisane oociste su veoma otporne na uslove spoljne sredine a u uslovima povećane vlažnosti mogu ostati vijabilne i više od godinu dana. Veoma su otporne na niske (vijabilne 54 meseca na 4°C i 106 dana na -10°C) ali i na visoke temperature (vijabilne 32 dana na 35°C i 9 dana na 40°C), dok ih izlaganje temperaturi od 55°C-60°C uništava za 1-2 minuta (Dubey, 2010). Zbog veoma čvrstog višeslojnog zaštitnog zida, sporulisane oociste otporne su i na dejstvo dezinficijensa, što je osobina koja doprinosi procesu njihove izolacije iz uzoraka vode i zemljišta (Dumetre i Darde, 2003).

##### *a) Ingestija vode kontaminirane oocistama *T. gondii**

Opisane su opsežne hidrične epidemije toksoplazmoze sa rezervoarima pijaće vode kao izvorom infektivnih oocista u Kanadi (Aramini i sar., 1999), u Brazilu (De Moura i sar., 2006) i u Indiji (Balasundaram i sar., 2010).

Osim slatke, i slana, morska voda može predstavljati izvor infekcije oocistama *T. gondii* (Lindsay i Dubey, 2009). U skladu sa eksperimentalnim nalazima, konzumacija plodova mora a pre svega raznih vrsta školjki identifikovana je kao rizikofaktor za infekciju ljudi u opsežnoj epidemiološkoj studiji sprovedenoj u SAD (Jones i sar., 2009).

b) *Ingestija zemljišta, povrća i voća kontaminiranog oocistama T. gondii*

Kontakt sa zemljištem prepoznat je kao jedan od glavnih faktora rizika za infekciju ljudi (6-17% slučajeva) u velikoj evropskoj multicentričnoj studiji (Cook i sar., 2000). Takođe, konzumacija nedovoljno i neadekvatno opranog povrća i voća koje raste u/pri zemlji doprinosi značajnom broju humanih infekcija (Cook i sar., 2000; Kapperud i sar., 1996).

**1.3.1.1.3. Ingestija tahizoita**

Kako je vegetativni oblik parazita veoma osetljiv na dejstvo digestivnih enzima, ovaj vid zaražavanja je veoma redak, mada postoje podaci o infekciji *T. gondii* nakon konzumacije nepasterizovanog kozjeg mleka (Sacks i sar., 1982; Skinner i sar., 1990).

**1.3.1.2. Kongenitalna toksoplazmoza**

Kongenitalna toksoplazmoza je zbog svog značaja, patofizioloških osobenosti i potencijalno teških, katkad razornih posledica ne samo po tok i ishod trudnoće već i po kvalitet života inficiranog deteta, izdvojena kao zaseban klinički entitet. Kao infektivni teratogeni agens u sastavu TORCH kompleksa, *T. gondii* je, u globalnim razmerama, na trećem mestu po učestalosti, iza virusa rubele i citomegalovirusa a ispred herpes virusa (Alfordi sar., 1974).

O kongenitalnoj toksoplazmozi (KT) se govori kada infekcija trudnice rezultira klinički ili laboratorijski manifestnom infekcijom ploda.

Uvreženo je stanovište da do vertikalne transmisije parazita na plod može doći samo tokom primarne (akutne) infekcije majke u trudnoći. Ova hipoteza našla je svoju potvrdu u rezultatima brojnih prospektivnih studija koji su poslužili kao argument za uvođenje obaveznog serološkog testiranja trudnica najpre u Austriji (1975.) i Francuskoj (1978.), a kasnije i u drugim zemljama Zapadne Evrope (Belgija, Švajcarska, Slovenija). Kako je akvirirana toksoplazmoza u više od 80% slučajeva asimptomatska (limfadenopatija je prisutna kod ne više od 10% majki čija se infekcija prenese na potomstvo) (Swisher i sar., 1994), serološko ispitivanje trudnica je jedini

mehanizam utvrđivanja potencijalnog rizika za nastanak infekcije ploda. Iako je približno 70% žena u generativnom periodu u Srbiji izloženo primoinfekciji *T. gondii*, program obaveznog serološkog ispitivanja trudnica do danas nije uveden, te kako i kliničke manifestacije kod kongenitalno inficirane novorođenčadi najčešće izostaju, tačna učestalost KT u našoj zemlji ostaje nepoznanica.

Bez obzira na mehanizam nastanka infekcije kod majke, hematogena diseminacija parazita i posledična infekcija placente predstavljaju obavezan preduslov za razvoj infekcije ploda. Iako je trajanje parazitemije u akviriranoj toksoplazmozi predmet brojnih kontroverzi, uvreženo je stanovište da unutar četiri nedelje od infekcije tahizoiti iščezavaju iz cirkulacije (Remington i sar., 2001). Međutim, mogućnost vertikalne transmisije parazita uslovljena je kako osobinama soja *T. gondii* izazivača infekcije, tako i karakteristikama same trudnoće/trudnice. Broj i virulentnost izazivača infekcije odlučujući su činioci vezani za sam parazit, dok su odlike imunskog sistema trudnice i pre svega, prokrvljenost i propustljivost placente, odlučujući faktori domaćina.

Činjenica da se paraziti mogu izolovati iz placente čak i nakon infekcija u ranoj trudnoći ukazuje da jednom inficirana, placenta ostaje inficirana do kraja trudnoće čime predstavlja svojevrsan depo za parazite koji u različitim vremenskim razmacima nakon parazitemije majke mogu prodreti u fetalnu cirkulaciju. Iako zapaljenje placente po pravilu rezultira i povećanjem njene propustljivosti, postoje stanovišta po kojima se transmisija infekcije na plod dešava odloženo, nakon tzv. „prenatalnog inkubacionog perioda” (Thalhammer i sar., 1955; Thalhammer i sar., 1975). Nalazi Desmonts i sar. (1985) potvrđuju ne samo da fetalna infekcija nakon inicijalnog placentitisa može biti odložena i duže od 16 nedelja, već i da inkubacioni period traje znatno kraće kod infekcija u kasnoj trudnoći (Desmonts i sar., 1985). Međutim, postoje i podaci o mogućnosti da žene inficirane nedeljama, čak i mesecima pre začeća mogu preneti infekciju na plod (Marty i sar., 1991; Pons i sar., 1995; Vogel i sar., 1996; Villena i sar., 1998; Boumahni i sar., 2004).

Ipak, kako su placentalna cirkulacija i fiziološka permeabilnost u direktnoj (obrnuto proporcionalnoj) korelaciji sa starošću trudnoće, odnosno stadijumom intrauterusnog razvoja, jasno je da se gestacijska starost nametnula kao činilac od presudnog značaja za transplacentnu transmisiju parazita i razvoj mogućih kliničkih

manifestacija. Kao barijera za nastanak infekcije fetusa, intaktna placenta je daleko efikasnija u početku trudnoće, tako da manje od 10% infekcija u prvom trimestru trudnoće rezultira KT. Kako trudnoća napreduje, placenta postaje permeabilnija čime se verovatnoća infekcije ploda povećava na 30% u drugom i čak 70% u trećem trimestru, približavajući se 90% u poslednjim danima trudnoće (Dunn i sar., 1999). Ipak, uporedo sa porastom verovatnoće razvoja infekcije ploda, povećanje gestacijske starosti rezultira smanjenjem verovatnoće nastanka potencijalno teških kliničkih manifestacija KT, od 75% u I do 0% u III trimestru (Couvreur i sar., 1984). Stoga, klinička simptomatologija KT prevashodno je uslovljena gestacijskom starošću ploda u vreme transplacentne transmisije infekcije, znači ne nužno u vreme infekcije majke. Mada je kongenitalna toksoplazmoza retka kod primoinfekcije majke u ranoj trudnoći, posledice infekcije ploda u ranim fazama organogeneze su najozbiljnije i često inkompatibilne sa životom (spontani pobačaj, missed abortion). Periodom najvišeg rizika za razvoj izraženih oštećenja ploda nakon primoinfekcije majke smatra se II trimestar (od 10-24. nedelje gestacije), kada, usled interferencije strukturne organizacije CNS-a fetusa od strane parazita može doći do uvećanja moždanih komora sa razvojem hidrocefalusa, mikrocefalusa, kao i oštećenjem retine. Iako se klasični trijas KT o kojem je govorio Sabin (hidrocefalus, horioretinitis i intracerebralne kalcifikacije) danas retko sreće, predstavlja potencijalnu posledicu nelečenih infekcija upravo u II trimestru trudnoće. Uprkos tome što je verovatnoća transplacentne transmisije parazita najveća u III trimestru, deca inficirana u periodu od 26-40. nedelje trudnoće rađaju se ili sa blagim ili bez ikakvih kliničkih simptoma (prematurnitet, *in utero growth restriction* - IUGR) (Desmonts i Couvreur, 1974). Međutim, treba imati u vidu da, iako je 70% inficirane dece na rođenju klinički zdravo, posledice nelečene KT (najčešće horioretinitis) pojavljuju se mesecima i godinama posle rođenja, čak i u drugoj i trećoj deceniji života (Djurković-Djaković, 1995).

Faktor nezavisan i od parazita i od domaćina koji značajno utiče na smanjenje stope transplacentne transmisije *T. gondii* svakako je primena terapije spiramicinom, potentnim makrolidnim antibiotikom koji u tkivu posteljice postiže značajno više koncentracije nego u serumu trudnice, zbog čega se primenjuje u prevenciji infekcije ploda. Protektivna uloga spiramicina potvrđena je rezultatima istraživanja Desmonts i Couvreur-a (1974.) kojim je obuhvaćen 321 uzorak placente korišćen za izolaciju



vijabilnih parazita metodom biološkog ogleda (inokulacijom u laboratorijske miševe). *T. gondii* je izolovana u 25% uzoraka placente nelečenih trudnica inficiranih u I trimestru, u 54% uzoraka trudnica inficiranih u II trimestru i 65% u III trimestru inficiranih nelečenih trudnica. Procenat izolacije parazita bio je daleko niži kod trudnica lečenih spiramicinom (8%, 19%, 44%), shodno trimestru graviditeta.

Danas se u svim slučajevima dokazane ili suspektne serokonverzije u trudnoći savetuje primena spiramicina do rezultata prenatalne ili rane postnatalne (u prva tri meseca života) dijagnostike KT. Dijagnoza infekcije ploda odnosno novorođenčeta predstavlja indikaciju za prelazak sa terapije spiramicinom na kombinaciju pirimetamina i sulfonamida (najčešće sulfadiazin, PYR-SDZ) koji prolaze placentu, i dati u kombinaciji imaju sinergistički efekat. Time se smanjuje rizik od nastanka ozbiljnih neuroloških sekvela (Cortina-Borja i sar., 2010) i intrakranijalnih lezija kod novorođenčeta, posebno ako se terapija primeni u prve četiri nedelje od infekcije majke (Gras i sar., 2005). Opsežnim američkim kohortnim studijama istaknut je značaj rane postnatalne dijagnoze i primene terapije PYR-SDZ kontinuirano tokom prve godine života kako bi se prevenirale kasne sekvele CT (horioretinitis) (Guerina i sar., 1994; McAuley i sar., 1994; McLeod i sar., 2006).

Istorijski gledano, hronična (latentna) infekcija trudnice odbačena je kao potencijalni rizik za prenos infekcije na plod, osim ukoliko trudnoća nije praćena supresijom imunskog odgovora, bilo kao posledica sistemske bolesti (AIDS, urođene imunodeficijencije) ili imunosupresivne terapije, što može rezultirati reaktivacijom infekcije i hematogenom diseminacijom parazita (Desmots i sar., 1990). Međutim, u novije vreme, podaci dobijeni izučavanjem genetskog materijala parazita usloveli su reviziju dosadašnjeg stava o protektivnom aspektu latentne infekcije trudnice. Iako su sporadični slučajevi ponovne infekcije prethodno imunizovanih trudnica ukazivali na mogućnost reinfekcije u trudnoći, ona je najčešće dovođena u vezu sa ingestijom životnog oblika parazita različitog od onog koji je izazvao primarnu infekciju (Fortier i sar., 1991; Gavinet i sar., 1997; Hennequin i sar., 1997). Tek je primena savremenih molekularnih metoda genotipizacije *T. gondii* pružila konkretnije objašnjenje. Rezultati istraživanja kojim je uz pomoć osam mikrosatelitskih markera izvršena genotipizacija 86 izolata poreklom od kongenitalno inficiranih pacijenata u Francuskoj ukazali su na predominantnu zastupljenost tipičnog, klonskog tipa II *T. gondii* u gotovo 85%

ispitivanog materijala (Ajzenberg i sar., 2002). Primena iste metodologije doprinela je i rasvetljenju fenomena reinfekcije u trudnoći jer je ustanovljeno da ponovna infekcija imunizovane trudnice i sledstvena KT nastaju kao posledica infekcije atipičnim, neklonalnim genotipovima *T. gondii* (Elbez-Rubinstein i sar., 2009; Delhaes i sar., 2010).

### **1.3.1.3. Toksoplazmoza kao komplikacija transplantacije organa**

Značaj *T. gondii* kao oportunističkog infektivnog agensa u imunosupresivnim stanjima potenciran je tokom poslednje dve decenije 20. veka zahvaljujući pandemiji HIV infekcije i posledičnom porastu učestalosti toksoplazmatskog encefalitisa. Međutim, primena HAART terapije minimizirala je ne samo pojavu toksoplazmatskog encefalitisa već i drugih oportunističkih infekcija, čime je težište interesovanja pomeren na druge kategorije imunokompromitovanih pacijenata.

Kako lečenje transplantacijom organa krajem 20. i početkom 21. veka, zahvaljujući napretku savremene medicine ali i proširenju liste indikacija predstavlja deo savremenih terapijskih protokola, problem oportunističkih infekcija u posttransplantacionom periodu zavređuje sve veću pažnju ali i opsežnije angažovanje lekara i istraživača. Interesantno je da je u periodu od 1953-1993. godine, dakle tokom gotovo čitave druge polovine 20. veka opisano (ne više od) 212 slučajeva teške kliničke slike toksoplazmoze razvijene nakon transplantacije organa (Remington i sar., 2001). Ne samo što toksoplazmoza može ugroziti prihvatanje kalema, već može doći i do životno ugrožavajuće diseminacije infekcije.

Kada je reč o patogenezi, odnosno o mogućem mehanizmu razvoja infekcije *T. gondii* u posttransplantacionom periodu, on je dvojak – toksoplazmoza se može razviti kao rezultat direktnog prenošenja vijabilnih parazita presađenim organom (graftom) inficiranog davaoca ili kao posledica reaktivacije latentne (hronične) infekcije kod seropozitivnog primaoca.

### 1.3.1.3.1. Toksoplazmoza preneti inficiranim organom

Predstavlja važan izvor infekcije kod primalaca solidnih organa (srce, pluća, bubreg, jetra, itd.), dok je kod primalaca matičnih ćelija hematopoeze (*Hematopoietic Stem Cell*, HSC primaoci) praktično zanemarljiv.

#### a) *Transmisija infekcije organom akutno inficiranog davaoca seronegativnom primaocu*

Ukoliko je davalac npr. kostne srži (odnosno HSC) u fazi parazitemije u trenutku uzorkovanja kostne srži, postoji realna mogućnost brze proliferacije tahizoita u krvi i organima seronegativnog primaoca. Ukoliko nije izvršeno pretransplantaciono testiranje na toksoplazmozu, parazitemija davaoca je teško proveriva u času kada se kod primaoca jave simptomi reaktivacije, mada se takva uzročno-posledična veza može pretpostaviti (Chandrasekar i sar., 1997).

#### b) *Transmisija infekcije organom hronično inficiranog davaoca seronegativnom primaocu*

Do incistacije bradizoita *T. gondii* teoretski može doći u svakoj nukleisanoj ćeliji ljudskog organizma, ali se ciste ipak najčešće formiraju u nervnom (mozak, retina) i mišićnom tkivu (srčani i skeletni mišići). Stoga je razumljivo da najveći rizik od rupture cista i oslobađanja bradizoita snose seronegativni primaoci srčanog mišića. U odsustvu profilakse kotrimoksazolom (Bactrim®) a u slučaju serološke nepodudarnosti (seropozitivan donor/seronegativan recipijent, D+/R-), čak 25-75% transplantacija srca komplikuje se toksoplazmozom (Derouin i Pelloux, 2008). Međutim, mogućnost transmisije cista *T. gondii* matičnim ćelijama hematopoeze minimizirana je na nivo teoretske verovatnoće.

#### c) *Transmisija infekcije organom hronično inficiranog davaoca seropozitivnom primaocu*

Slučajevi reinfekcije u prošlosti mahom su bili tumačeni kao reaktivacija latentne infekcije, prvenstveno zbog nedostatka adekvatne (molekularne) dijagnostike. Primenom *Western blot* tehnike, Robert-Gangneux i sar. (2000) dolaze do otkrića neosinteze u klasi specifičnih IgG antitela kod dva seropozitivna transplantirana

pacijenta, čime se potvrđuje stimulacija novim antigenskim determinantama *T. gondii* (hipotetički, novim sojem). U novije vreme, takve dijagnostičke nedoumice rešavaju se primenom savremenih tehnika genotipizacije, čime je omogućena precizna diferencijacija reinfekcije od reaktivacije.

### **1.3.1.3.2.      *Reaktivirana toksoplazmoza***

Transplantacija matičnih ćelija hematopoeze (eng. *Haematopoietic Stem Cell Transplantation* – HSCT) skopčana je sa primenom visokodozne hemioterapije ili kombinacije visokodozne hemioterapije i zračenja celog tela sa ciljem uništenja klona malignih ćelija (ako je u pitanju maligno oboljenje hematopoeznog tkiva), stvaranja prostora za zdrave ćelije ali i supresije imunskog sistema primaoca (kod alogene transplantacije). Slabljenje imunskog nadzora nad aktivnošću latentne infekcije *T. gondii* dovodi u posttransplantacionom periodu do rupture cista, ekscistacije bradizoita i njihove konverzije u brzodeleće tahizoite čija hematogena diseminacija izaziva čitav niz mogućih kliničkih simptoma. Shodno predilekciji *T. gondii*, najčešće se javljaju encefalitis, miokarditis i pneumonija. Ukoliko se ne primeni specifična terapija, dolazi do agravacije simptoma sa znacima septičnog šoka, odbacivanjem transplantata i smrtnim ishodom. Činioci koji uslovljavaju posttransplantacionu reaktivaciju latentne toksoplazmoze odnose se pre svega na vrstu transplantacije koja određuje i tip, intenzitet i dužinu trajanja imunosupresivne terapije. Kao i u slučaju kongenitalne infekcije ploda, incidenca reaktivacije je prevashodno uslovljena prevalencom toksoplazmoze u toj populaciji. Međutim, kao i kod kongenitalne toksoplazmoze gde se zbog odustva programa organizovanog praćenja trudnica broj kongenitalno inficirane dece tek naslućuje, tačna incidenca reaktivirane toksoplazmoze u Srbiji je nepoznanica, jer do ovog istraživanja nije bilo organizovanog monitoringa infekcije *T. gondii* kod bolesnika u posttransplantacionom periodu.

Transplantacija matičnih ćelija hematopoeze (eng. *Haematopoietic Stem Cell Transplantation* - HSCT) je svaka procedura kojom se matične ćelije hematopoeze (eng. *Haematopoietic Stem Cell* - HSC), bez obzira na tip davaoca i izvor, daju primaocu sa ciljem potpune ili delimične obnove hematopoeznog sistema. Standardna je terapija u lečenju urođenih i stečenih bolesti hematopoeznog sistema, kao i bolesnika sa hemosenzitivnim, radiosenzitivnim i imunosenzitivnim malignim oboljenjima (Vujić i

sar., 2011). Indikacije za HSCT kod dece su: maligne bolesti hematopoeznog sistema (akutne leukemije, hronična mijeloidna leukemija, mijelodisplazni sindrom, limfomi, juvenilna mijelomonocitna leukemija), brojne urođene i stečene nemaligne bolesti (aplastična anemija, hemoglobinopatije, urođene slabosti kostne srži, primarne imunodeficijencije, osteopetroza, bolesti taloženja), solidni tumori, autoimunske bolesti i nehematopoezne indikacije (Ljungman i sar., 2010). Zahvaljujući globalnoj ekspanziji centara u kojima se radi HSCT, uvođenju novih indikacija i osavremenjenju tehnologije, od 1970. godine registruje se stalni porast broja urađenih HSCT od 5-10% godišnje (Miano i sar., 2007).

HSCT može biti autologna, kada se bolesniku daju sopstvene HSC ili alogena, kada je davalac druga osoba. Tip HSCT određuje se na osnovu bolesti i dostupnosti davaoca. Kod bolesnika sa solidnim tumorima prvenstveno se primenjuju autologne, a kod bolesnika sa stečenim i urođenim bolestima hematopoeznog sistema alogena HSCT (Vujić i sar., 2011). Davalac može biti jednojajčani blizanac, zatim srodan identičan (rođeni brat ili sestra), srodan delimično podudaran (član porodice) i nesrodan podudaran ili delimično podudaran. Najviše 30% bolesnika, kod kojih je potrebno uraditi HSCT, ima identičnog srodnog davaoca. Nesrodni davalac sa zadovoljavajućim stepenom podudarnosti je osoba koja je u 10/10 ili 9/10 lokusa HLA sistema, ispitivane tehnikom visoke rezolucije klase I (HLA-A, HLA-B i HLA-C) i klase II (HLA-DRBA-DQB1) podudarna sa primaocem HSC. Nesrodan delimično podudaran davalac je osoba koja je u 6-8/10 lokusa podudarna sa primaocem HSC. Haploidentičan davalac se u svakom lokusu HLA sistema razlikuje od primaoca. Predstavlja dobar izbor kada bolesnik nema identičnog srodnog, nesrodnog dobro podudarnog davaoca ili odgovarajući uzorak krvi pupčanika (Shaw i sar., 2009; Ljungman i sar., 2010).

Danas se koriste tri izvora HSC i to: kostna srž, periferna krv i krv pupčanika. Odluka o izboru izvora HSC zasnovana je na proceni osnovne bolesti, stanju bolesti i uzrastu bolesnika. Za autologne HSCT kod većine bolesnika (više od 98%) koriste se HSC iz periferne krvi pokrenute granulocitnim faktorom rasta (mobilisane HSC), čijom se primenom postiže brži oporavak hematopoeznog sistema. U alogenim transplantacijama koriste se sva tri izvora HSC, međutim u slučaju dostupnosti identičnog srodnog davaoca kao izvor matičnih ćelija hematopoeze koristi se kostna srž. Prednost HSC iz periferne krvi je brži oporavak hematopoeznog tkiva, a mana veća

učestalost hroničnog oblika bolesti kalema protiv domaćina (eng. *graft versus host disease* – GVHD) u odnosu na HSC kostne srži. Kod dece se HSC iz periferne krvi u alogenim transplantacijama ređe koriste.

Posttransplantacioni period obuhvata ukupno vreme posle HSCT u kome se mogu javiti rane ili kasne komplikacije. Rane komplikacije su one koje se registruju u prvih 100 dana od dobijanja HSC i one obuhvataju poremećaje nastale usled aplazije kostne srži (infekcije i krvavljenja), oštećenja endotela krvnih sudova režimom kondicioniranja ili imunosupresivnom terapijom, a posle alogene HSCT, i bolest kalema protiv domaćina (Vujić i sar., 2011).

Značaj toksoplazmoze kao potencijalno opasne oportunističke infekcije kod bolesnika posle HSCT je dugo bio zanemarivan zbog uvreženog stava da je infekcija *T. gondii* kod ovih pacijenata retka (Derouin i sar., 1992). Po podacima iz literature, incidenca reaktivacije kod seropozitivnih primalaca kostne srži, odnosno matičnih ćelija hematopoeze kreće se od 1,9% u Brazilu (De Medeiros i sar., 2001) do 5,7% u Francuskoj (Martino i sar., 2005), a stopa mortaliteta od 60-90% (Martino i sar., 2000; Martino i sar., 2005). Reaktivacija je daleko češća ukoliko je davaalac neinficiran (Derouin i sar., 1992; Martino i sar., 2005), čime se implicira potreba za obavezanim serološkim testiranjem potencijalnog davaoca matičnih ćelija hematopoeze.

Nespecifična infektivna simptomatologija praktično onemogućava kliničku dijagnozu, dok je interpretacija rezultata seroloških testova otežana postojanjem duboke imunosupresije posle HSCT. Dijagnostika toksoplazmatske reaktivacije mora se stoga bazirati na direktnim parazitološkim metodama, i to onima koje su ne samo visoko osetljive već, zbog potencijalnog fulminantnog toka bolesti, omogućavaju brz rezultat, te bi metode bazirane na PCR predstavljale idealan dijagnostički izbor.

#### **1.4. METODE LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE**

Kako klinička dijagnostika, zbog odsustva specifičnih manifestacija, nije od značajne pomoći u potvrdi toksoplazmatske etiologije bolesti, dijagnoza toksoplazmoze je praktično zasnovana na laboratorijskim metodama, koje mogu biti direktne i indirektne. Iako se direktnim parazitološkim metodama izoluju vijabilni paraziti ili parazitska DNK iz telesnih tečnosti ili tkiva, zbog zamašnih tehničkih uslova koji su

skopčani sa izvođenjem metoda direktne dijagnostike, njihova primena je ograničena na strogo precizirane indikacije. Stoga, neuporedivo su rasprostranjenije indirektno, imunodijagnostičke metode pomoću kojih se procenjuje vrsta i intenzitet humoralnog imunskog odgovora, odnosno koncentracija antitela specifičnih za *T. gondii*.

#### **1.4.1. Indirektno dijagnostičke metode**

##### **1.4.1.1. Kvantitativni imunodijagnostički (serološki) testovi**

Serološki testovi služe za procenu nivoa humoralnog imunskog odgovora prema *T. gondii* a zasnovani su na *in vitro* reakciji (egzogenog) antigena *T. gondii* sa specifičnim antitelima prisutnim u serumu inficirane osobe (Djurković-Djaković, 1995 b). Sa dijagnostičkog aspekta, najznačajniji su testovi za određivanje specifičnih IgG, IgM i IgA antitela. IgM antitela specifična za *T. gondii* sintetišu se u prvim danima nakon infekcije, maksimalne koncentracije dostižu tokom druge ili treće nedelje, da bi, od kraja prvog meseca njihova koncentracija postepeno opadala do nedetektabilnih nivoa, najčešće nakon šest meseci. Koncentracije specifičnih IgA antitela obično rastu uporedo sa specifičnim IgM antitelima, dostižu maksimum krajem prvog meseca a potom opadaju tokom narednih 6-8 meseci. Kako su specifična IgM i IgA antitela karakteristična za ranu fazu infekcije a odsutna su u hroničnoj infekciji, često se nazivaju markerima akutne infekcije. S druge strane, početak sinteze specifičnih IgG antitela poklapa se sa periodom postizanja maksimalnih koncentracija specifičnih IgM (druga, odnosno treća nedelja) a najveće koncentracije (koje se održavaju nedeljama, obično do dva meseca; tzv. "plato" faza) dostižu po isteku drugog meseca infekcije. Iako nakon faze platoa koncentracija specifičnih IgG antitela postepeno opada, ona se zadržavaju na detektabilnim nivoima i u hroničnoj fazi infekcije, praktično do kraja života inficirane osobe.

- Sabin-Feldman-ov test (SFT) - Otkrićem svojstva tahizoita da se u odsustvu *T. gondii*-specifičnih antitela u ispitivanom serumu boje metilenskim plavim, dok u prisustvu specifičnih antitela stvoreni antigen-antitelo kompleks aktivira sistem komplemenata dovodeći do lize parazita, odnosno distorzije i nebojenosti, Sabin i

Feldman su razvili dijagnostički test koji je omogućio prva epidemiološka ispitivanja toksoplazmoze na globalnom nivou (Sabin i Feldman, 1948).

- Test indirektne hemaglutinacije (IHA) (Jacobs i Lunde, 1957; Welch i sar., 1980).
- Test fiksacije komplementa (CF test) (Welch i sar., 1980).
- Modifikovani test direktne aglutinacije (*Modified agglutination test*, MAT; *High sensitivity direct agglutination test*, HSDA) - Aglutinacioni test u dijagnostici toksoplazmoze u kome se u svojstvu antigena koriste formalinizirani celi tahizoiti prvi put je opisan davne 1959. od strane Fultona i Turka (Fulton i Turk, 1959) ali su tek 1967. Ardoin i sar. omogućili masovnu proizvodnju antigena i komercijalizaciju testa (Ardoin i sar., 1967). Međutim, već u inicijalnim dijagnostičkim studijama sprovedenim u Francuskoj demonstrirana je nedovoljna senzitivnost ali i specifičnost ovog testa u odnosu na SF test (Desmots, i sar., 1974). Pelloux i sar. pokušali su da povećaju specifičnost testa rastvaranjem analiziranih seruma u baznom rastvoru, imajući u vidu da kiseli pH dovodi do spontane aglutinacije (Peloux i sar., 1973). Pravi potencijal testa direktne aglutinacije u dijagnostici toksoplazmoze otkriven je tek nakon opsežnih modifikacija testa kojima su, udruženim naporima, Desmots i Remington (Desmots i Remington, 1980) ne samo doveli performanse aglutinacionog testa u rang sa SF testom, već su dodatno unapredili senzitivnost detekcije antitela specifičnih za *T. gondii* u odnosu na dotadašnji zlatni standard. Kao i SF testom, i MAT-om detektovana antitela specifična za *T. gondii* pripadaju IgG klasi (dodavanjem 2ME neutralisana su IgM antitela). Kada se zadivljujućim performansama ovog testa doda i reproducibilnost rezultata i jednostavnost izvođenja, ne čudi podatak da je MAT značajno unapredio dijagnostiku toksoplazmoze. Od početaka njegove primene davne 1974. godine u laboratoriji Georges Desmots-a u Parizu pa do današnjih dana, modifikovani aglutinacioni test naišao je na široku primenu ne samo u različitim dijagnostičkim studijama, već i u opsežnim skrining programima namenjenim detekciji serokonverzije u trudnoći i prevenciji kongenitalne toksoplazmoze. Takođe, zahvaljujući univerzalnosti antigena i odsustvu konjugata (antiseruma) omogućena je detekcija ukupnih *T. gondii*-specifičnih antitela i u serumu životinja, tako da MAT predstavlja okosnicu najvećeg broja dosadašnjih seroepizootioloških istraživanja.



- Indirektni imunofluorescentni test (*Indirect fluorescent antibody test, IFAT*) - Nakon inicijalne primene u dijagnostici toksoplazmoze (Kellen i sar., 1962; Walton i sar., 1966), IFAT je, zahvaljujući naporima Remingtona i sar. (Remington i sar., 1968) prilagođen detekciji specifičnih IgM antitela pre svega u KT ali i u akutnoj akviriranoj toksoplazmozi, korišćenjem antiseruma specifičnog za IgM. Međutim, prisustvo antinuklearnih antitela i reumatoidnog faktora u serumu uticalo je na pojavu lažno pozitivnih nalaza kod adultnih pacijenata obolelih od autoimunih bolesti (sistemski lupus, reumatoidni artritis) (Araujo i sar., 1971; Hyde i sar., 1975), dok su lažno negativni nalazi zabeleženi u serumima sa visokim koncentracijama specifičnih IgG antitela (Filice i sar., 1980).

- Enzimski imunosorbentni test (*Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*) - ELISA metod su u dijagnostici toksoplazmoze prvi put primenili Voller i sar. (1976), koristeći preparate solubilnih antigena, tako da su, za razliku od prethodno navedenih testova u kojima su se kao antigen koristili celi tahizoiti, najprisutnije citoplazmatske i u mnogo manjoj meri membranske antigenske determinante (Voller i sar., 1976). Danas se različite modifikacije ELISA testa koriste sa velikim uspehom za detekciju *T. gondii*-specifičnih antitela IgG, IgM i IgA klase (Remington, 2001). Veoma rano je pokazano da pouzdanost ELISA testa za detekciju specifičnih IgG antitela u velikoj meri korelira sa SFT i IFAT (Walls i sar., 1977). Ipak, značaj ELISA metoda u dijagnostici kongenitalne ali i akutne akvirirane toksoplazmoze unapređen je tek modifikacijama testa, odnosno razvojem "antibody capture" ili "double-sandwich" ELISA za detekciju specifičnih IgM (Naot i Remington, 1980; Naot i sar., 1981; Siegel i Remington, 1983) i IgA antitela (Stepick-Biek i sar., 1990; Decoster i sar., 1991). Primenom "double-sandwich" IgM-ELISA testa izbegnuta je pojava lažno pozitivnih nalaza zbog prisustva reumatoidnog faktora ali i lažno negativnih usled kompetitivnog efekta transmitovanih IgG antitela. U poslednjoj deceniji 20. veka, primena ELISA testova u dijagnostici toksoplazmoze doživljava ekspanziju, ne samo zbog odličnih performansi testa već i zbog mogućnosti automatizacije.

- ELISA test za određivanje aviditeta specifičnih IgG antitela - Iako su napori usmereni na razvoj pouzdanih testova za otkrivanje markera akutne toksoplazmoze imali za posledicu precizniju identifikaciju pacijenata sa IgM, odnosno IgA specifičnim antitelima, njihova prolongirana detekcija u značajnom broju slučajeva

dovela je do poteškoća u razlučivanju stadijuma infekcije. Vođeni idejom da inicijalnim serološkim testiranjem razluče svežu od latentne infekcije, Hedman i sar. su 1989. godine razvili modifikovanu verziju ELISA testa namenjenu određivanju funkcionalnog afiniteta (aviditeta) specifičnih IgG antitela za vezivanje antigena *T. gondii* (Hedman i sar., 1989). Naime, IgG antitela sintetisana u ranim fazama (prvim mesecima) infekcije imaju nizak aviditet, dok u kasnijim mesecima usled antigenom stimulisanе selekcije B limfocita dolazi do sazrevanja imunskog odgovora i sledstveno, porasta funkcionalnog afiniteta oslobođenih IgG antitela, što za posledicu ima visok aviditet u hroničnoj infekciji. Porast aviditeta u osnovi predstavlja čvršće vezivanje IgG antitela za antigenske determinante vodoničnim, elektrostatičkim i van der Waalsovим vezama. Upravo na ovim svojstvima veze specifičnih IgG antitela sa antigenom počiva princip Hedman-ovog ELISA testa u kojem dodatkom uree kao protein-denaturišućeg agensa dolazi do disocijacije kompleksa antigen-antitelo. Već su rezultati prvih dijagnostičkih studija koje su uvele ovaj test u svoj protokol testiranja trudnica (i do 17000 žena) pokazali da visok aviditet specifičnih IgG antitela u I trimestru trudnoće pomera trenutak infekcije pre začeca čime se isključuje mogućnost fetalne infekcije (Lappalainen i sar., 1993; Jenum i sar., 1997; Pelloux i sar., 1998). Uspešnost ovog testa u diskriminaciji infekcije nastale pre više od 3-5 meseci dovela je do njegove komercijalizacije i masovne primene u Evropi, a od 2001. godine i u SAD (Liesenfeld i sar., 2001).

- Imunosorbentni aglutinacioni test (*Immunosorbent agglutination assay, ISAgA*) - ISAgA test u tehničkom smislu predstavlja kombinaciju testa direktne aglutinacije i "double-sandwich (capture)" ELISA testa, dizajniranu tako da, implementacijom najboljih osobina ova dva testa značajno unapredi osetljivost i specifičnost detekcije *T. gondii*-specifičnih antitela najpre klase IgM, a ubrzo potom i IgA i IgE. Princip testa sastoji se u vezivanju *T. gondii*-specifičnih antitela u uzorku seruma za odgovarajuća humana monoklonska antitela, bez korišćenja enzimskog konjugata. Nakon dodavanja antigena, dolazi do aglutinacije. Kao antigen u ISAgA testu koriste se, kao i u testu direktne aglutinacije, formalinizirani tahizoiti, čime se detektuju antitela specifična za membranske antigene toksoplazme. Sličnost sa aglutinacionim testom ogleda se i u načinu očitavanja rezultata kao i u jednostavnosti izvođenja. Kao i u "double-sandwich" ELISA testu (a za razliku od IFAT testa),

ISAgA testom se ne dobijaju lažno pozitivni rezultati usled prisustva reumatoidnog faktora ili antinuklearnih antitela u serumu, niti lažno negativni usled kompetitivnog vezivanja specifičnih IgG antitela.

#### **1.4.1.2. Kvalitativni imunodijagnostički (serološki) testovi**

- Western blot komparativna analiza imunoloških profila majke i novorođenčeta - Tehnike blotiranja proteina, mada ekstenzivno korišćene u svrhu istraživanja kako samog parazita, tako i različitih aspekata imunskog odgovora domaćina na infekciju toksoplazmom, svoju praktičnu primenu dobile su u dijagnostici kongenitalne toksoplazmoze. Korišćenjem posebnog enzimskog imunofiltracionog testa, Pinon i Gruson su 1982. godine pokazali da sinteza specifičnih antitela u sklopu fetalnog odgovora na kongenitalnu infekciju može predstavljati posledicu stimulacije antigenskim determinantama različitim od onih koje dovode do sinteze majčinih antitela iste klase imunoglobulina u sklopu odgovora na akutnu infekciju *T. gondii* (Pinon i Gruson, 1982). Tragom ovog otkrića, Remington i sar. su razvili novi dijagnostički metod identifikacije kongenitalno inficiranih novorođenčadi, baziran na *Western blot* (WB) analizi, odnosno komparaciji imunoloških profila novorođenčeta i njegove majke (Remington i sar., 1985). kojim su u polovini od 24 seruma kongenitalno inficirane novorođenčadi (12/24) detektovali bendove u IgM i IgG klasi koji nisu postojali kod majki. Zaključeno je da ovi kvalitativno različiti bendovi nisu mogli nastati kao posledica pasivnog transfera majčinih antitela pre ili tokom porođaja jer razlika nije bila kvantitativne prirode (različita gustina bendova), već su očigledno predstavljali refleksiju fetalne neosinteze imunoglobulina kao odgovor na stimulaciju različitim antigenskim determinantama parazita u odnosu na one koje su izazvale imunski odgovor kod majki, čime je potvrđeno stanovište Pinona i Grusona. I pored očigledne korisnosti metode, zametna tehnika izvođenja testa verovatni je uzrok činjenice da je prošlo više od 15 godina od kako je WB analiza primenjena u nekoj velikoj dijagnostičkoj studiji.

### 1.4.2. Direktne dijagnostičke metode

Kod imunokompetentnih osoba detekcija antitela specifičnih za *T. gondii* uglavnom je dovoljan dijagnostički kriterijum za postavljanje dijagnoze, dok se metode direktne dijagnostike primenjuju za dokazivanje parazitemije i sledstvenu genotipizaciju. Međutim, kod osoba sa oslabljenim imunskim odgovorom, kao i u slučaju nedozrelih mehanizama humoralnog imunskog odgovora ploda/novorodenčeta, pouzdana dijagnoza obavezno zahteva identifikaciju samog uzročnika, tj. vijabilnog parazita ili parazitske DNK u telesnim tečnostima/tkivima domaćina.

#### 1.4.2.1. Izolacija parazita *T. gondii* u kulturi ćelija

Primena ćelijskih linija (pre svega kulture humanih fibroblasta) u cilju izolacije vijabilnih parazita iz kliničkog materijala, i pored inicijalne optimistične implementacije u dijagnostičke algoritme za dijagnostiku toksoplazmoze ubrzo se pokazala nedovoljno osetljivom – uspešnost izolacije parazita iz plodove vode od 13,3% (Robert-Gangneux i sar., 1999), odnosno 15% (Foulon i sar., 1999). Danas se *T. gondii* izoluje i održava u *in vitro* uslovima gotovo ekskluzivno u istraživačke svrhe.

#### 1.4.2.2. Izolacija parazita *T. gondii* u laboratorijskim miševima (biološki ogled)

Detekcija specifičnog serološkog odgovora ili identifikacija morfološki prepoznatljivih cista *T. gondii* u mozgu miša nedeljama nakon intraperitonealne inokulacije kliničkog materijala sumnjivog na prisustvo parazita spada u laboratorijske metode koje su predstavljale revoluciju u dijagnostici toksoplazmoze. Nakon otkrića mogućnosti izolacije parazita iz plodove vode, uzorka fetalne krvi ili homogenata placente biološkim ogledom, biološki ogled je prihvaćen kao zlatni standard u dijagnostici kongenitalne toksoplazmoze (Desmonts i Couvreur, 1974; Desmonts i sar., 1985). U studiji Hezarda i sar. kojom je obuhvaćena 261 primoinficirana trudnica podvrgnuta dijagnostici fetalne infekcije, kongenitalna toksoplazmoza prenatalno je ustanovljena u 24 slučaja (77% od ukupno potvrđenog 31 slučaja KT nakon jednogodišnjeg praćenja). Dok se serološko testiranje uzoraka fetalne krvi pokazalo

nedovoljno informativnim (senzitivnost 10%), izolacija parazita iz istih uzoraka bila je uspešna u 50% ukupno inficiranih slučajeva a iz uzoraka plodove vode u 74% (Hezard i sar., 1997). Praktično istovremeno u šest referentnih evropskih laboratorija evaluiran je značaj različitih dijagnostičkih metoda namenjenih prenatalnom otkrivanju kongenitalne toksoplazmoze na retrospektivno prikupljenim uzorcima 122 žene primoinficirane u trudnoći. Biološki ogled pokazao se uspešnim u izolaciji parazita iz 58% uzoraka plodove vode (specifičnost 98%) i iz 31% uzoraka fetalne krvi (specifičnost 100%) (Foulon i sar., 1999). Značaj biološkog ogleada demonstriran je i u slučajevima serokonverzije u trudnoći u kojima je prenatalna dijagnostika stanja ploda izostala. Inokulacija homogenata placentalnog tkiva pokazala se uspešnom u detekciji 42-60% kongenitalno inficirane dece na rođenju (Bessieres i sar., 2001; Naessens i sar., 1999; Fricker-Hidalgo i sar., 2007; Robert-Gangneux i sar., 2010; Bessieres i sar., 2009).

#### 1.4.2.3. Dokazivanje DNK *T. gondii* (metodama baziranim na PCR-u)

Prekretnicu ne samo u dijagnostici već i u razumevanju patogeneze toksoplazmoze kao i u poznavanju filogenetske strukture samog parazita označio je prvi uspešan pokušaj detekcije DNK jednog tahizoita, lančanim umnožavanjem ciljne sekvence (targeta) nazvane B1 koja se u genomu parazita ponavlja 35 puta (Burg i sar., 1989). Od tada je razvijeno više protokola namenjenih molekularnoj detekciji *T. gondii* iz različitih bioloških materijala koji se, i pored značajnih međusobnih razlika, odlikuju visokom osetljivošću, reproducibilnošću i unutar 24-časovnim izdavanjem rezultata.

Detekcija *T. gondii* primenom molekularnih metoda u osnovi sadrži visoko specifično prepoznavanje, umnožavanje i analizu (kvantitativnu - broj kopija ili kvalitativnu - položaj i debljina benda i sl.) određene (odabrane) DNK sekvence (oligonukleotidni segment) koja se u genomu ovog parazita ponavlja određeni broj puta. U cilju uspešne detekcije, bira se sekvenca koja nije podložna mutacijama (promenama redosleda nukleotida), odnosno sekvenca koja pripada visoko konzervisanom delu genoma parazita. Sve ciljane sekvence u do sada implementiranim PCR protokolima zadovoljavaju ove uslove (B1, 529 bp, ITS-1, 18S rRNK).

Prvi rezultati o uspešnosti molekularne detekcije *T. gondii* dobijeni su konvencionalnom PCR tehnologijom pri čemu je ciljnu sekvencu predstavljao gen B1,

nepoznate funkcije ali prisutan u 35 kopija u genomu ovog parazita. Evaluacija uspešnosti primene PCR detekcije B1 gena u odnosu na konvencionalne metode najpre je sprovedena na polju prenatalne dijagnostike kongenitalne toksoplazmoze. Dokazavši primoinfekciju kod 43 trudnice, Grover i sar. su implementirali metod molekularne dijagnostike KT iz prenatalnih uzoraka (plodova voda i fetalna krv) u konvencionalni dijagnostički algoritam. Konvencionalnim PCR-om B1 gen *T. gondii* detektovan je u 8 od 10 uzoraka plodove vode kongenitalno inficiranih fetusa, demonstrirajući na taj način superiornu osetljivost nove u odnosu na konvencionalne metode (detekcija spec. IgM u fetalnoj krvi 30%; izolacija parazita iz plodove vode u kulturi ćelija 40%; biološki ogled 70%) (Grover i sar., 1990).

Značaj detekcije B1 gena *T. gondii* uz pomoć PCR-a u pravovremenom otkrivanju diseminovane toksoplazmoze kod imunokompromitovanih pacijenata pokazali su Roth i sar. koji su uspešno izolovali genetski materijal parazita iz bronhoalveolarnog lavata (BAL) akutno inficiranog pacijenta obolelog od AIDS-a (Roth i sar., 1992). Liesenfeld i sar. su primenom *nested*-PCR tehnike dodatno doprineli povećanju senzitivnosti detekcije B1 gena u uzorcima BAL-a, periferne krvi ali i bioptata jetre pacijenta obolelog od AIDS-a. Toksoplazmatska etiologija bolesti potvrđena je prisustvom tahizoita na nativnim preparatima BAL-a iz kojeg su paraziti (nedeljama kasnije) izolovani biološkim ogledom (Liesenfeld i sar., 1994).

Kako su preliminarni rezultati primene PCR metode u dijagnostici toksoplazmoze pre svega vulnerabilnih kategorija - fetusa i imunosuprimiranih bili više nego ohrabrujući, napori istraživača su usmereni na unapređenje metodologije, a pre svega na identifikaciju nove ciljane visokokonzervirane sekvence koja se u genomu *T. gondii* pojavljuje u većem broju kopija od B1 gena, čime bi se dodatno povećala dijagnostička osetljivost. Korišćenje ITS-1 i 18S rRNK kao target gena u *nested*-PCR reakciji, mada prisutnih u 110 kopija u genomu *T. gondii*, rezultirala je sličnom osetljivošću molekularne detekcije kao i u slučaju B1 gena (Jones i sar., 2000; Calderaro i sar., 2006).

Otkriće visokokonzervirane sekvence dužine 529 bp koja se u genomu *T. gondii* ponavlja 200-300 puta, amplifikovane primenom *real-time* PCR (rtPCR, qPCR) tehnologije rezultiralo je razvojem ne samo 10-100 puta osetljivije metode molekularne dijagnostike u odnosu na prethodnice bazirane na B1 target genu, već i mogućnošću

kvantifikacije parazita prisutnih u kliničkom materijalu i eksperimentalnim uzorcima (Homan i sar., 2000; Reischl i sar., 2003). Uspešnost amplifikacije 529 bp repetitivnog elementa qPCR-om bacila je novo svetlo na dotadašnje pokušaje primene ove tehnike u dijagnostici toksoplazmoze (Bretagne i sar., 1995) koja se ubrzo pokazala ne samo osetljivijom već i specifičnijom u odnosu na *nested*-PCR (Reischl i sar., 2003; Contini i sar., 2005; Calderaro i sar., 2006; Edvinsson i sar., 2006).

Međutim, uprkos napretku tehnologije i jasnoj koristi od primene molekularnih tehnologija i metodologija u dijagnostici toksoplazmoze, one se i dalje usavršavaju, te je za njihovu uspešnu primenu u svakoj, a pre svega referentnoj laboratoriji nužna standardizacija i optimizacija savremenog protokola molekularne dijagnostike.

## **CILJ RADA**



Promptna ali precizna dijagnostika infekcije *T. gondii* predstavlja osnovni preduslov za pravovremenu primenu specifične terapije kojom se mogu prevenirati ili otkloniti ozbiljne kliničke posledice toksoplazmoze kod dve posebno vulnerabilne kategorije populacije, a to su fetus i imunosuprimirani bolesnici. U vodećim referentnim centrima, to podrazumeva implementaciju molekularne detekcije parazita u rutinski dijagnostički protokol.

Cilj ovog istraživanja je evaluacija kliničkog značaja molekularne dijagnostike kongenitalne i reaktivirane toksoplazmoze. Kako bi se ovaj cilj realizovao, postavljeni su sledeći zadaci:

- Uvođenje i optimizacija qPCR protokola u cilju rane dijagnoze KT i reaktivirane toksoplazmoze posle HSCT
- Evaluacija rezultata dobijenih primenom qPCR u odnosu na rezultate dobijene konvencionalnim dijagnostičkim metodama (serološki testovi i biološki ogled)
- Redefinisanje dijagnostičkog algoritma za KT u Srbiji u skladu sa dobijenim rezultatima, i
- Dizajniranje dijagnostičkog algoritma za toksoplazmozu kod bolesnika posle HSCT u Srbiji u skladu sa dobijenim rezultatima.

# **MATERIJAL I METODE**

### 3.1. MATERIJAL

Materijal korišćen u cilju dijagnostike kongenitalne i reaktivirane toksoplazmoze prikupljen je i ispitan u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za toksoplazmozu (NRLT) u periodu od 2008-2014. godine.

U istraživanje su uključene trudnice upućivane u NRLT na osnovu sonografski suspektih ili dokumentovanih fetalnih malformacija i/ili na osnovu suspektne primoinfekcije *T. gondii* u trudnoći, nakon serološkog skrininga u rutinskim laboratorijama. Porodilje su uključene u istraživanje na osnovu kliničkih manifestacija koje su ukazivale na moguću KT njihove novorođenčadi.

Materijal za istraživanje činili su uzorci periferne krvi 80 trudnica, 60 uzoraka plodove vode (PV), 5 uzoraka fetalne krvi (FK), uzorci periferne krvi 55 novorođenčadi (NK) kao i uzorci periferne krvi 16 porodilja.

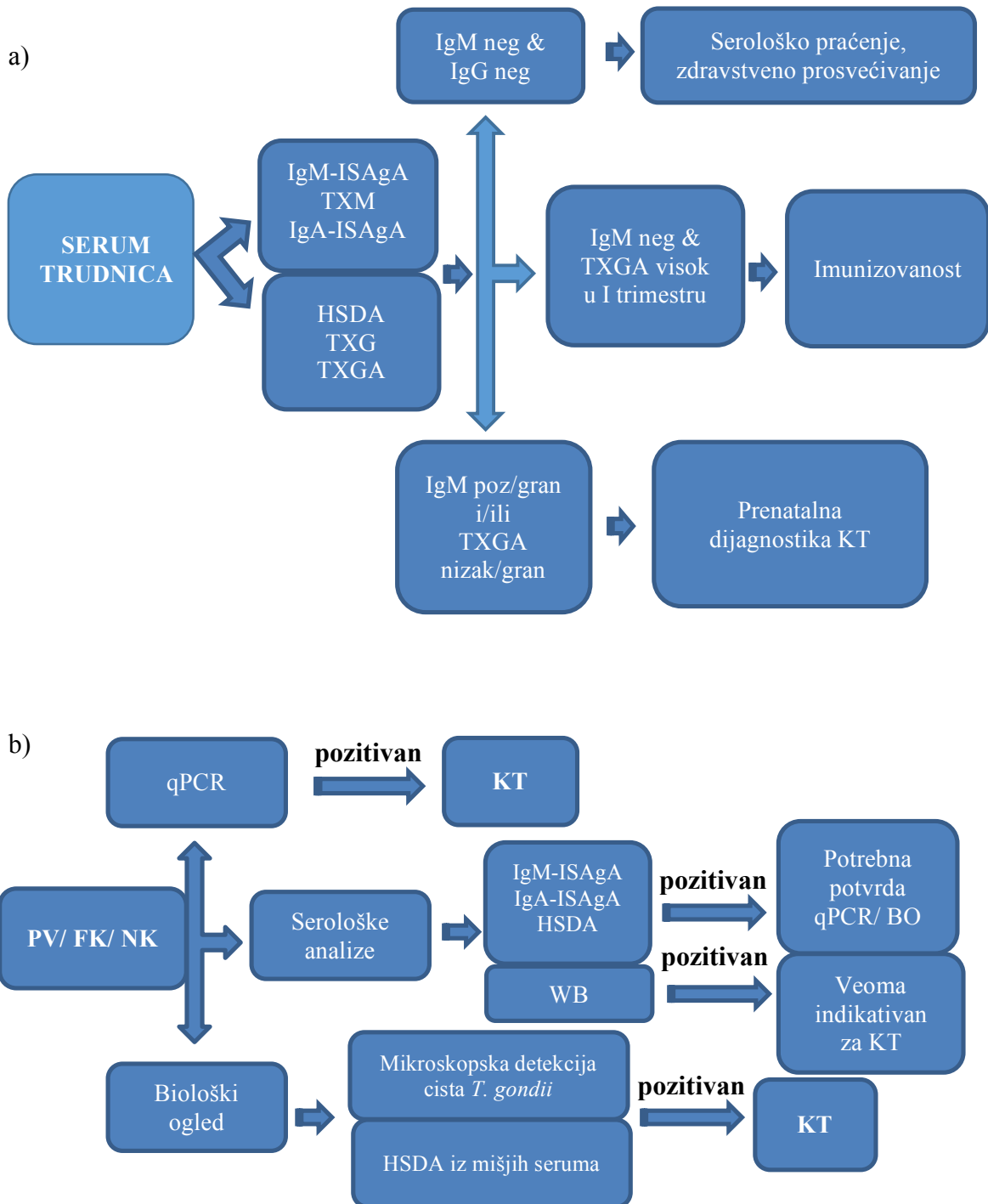
U cilju dijagnostike kongenitalne toksoplazmoze, prvi korak predstavljalo je utvrđivanje statusa infekcije *T. gondii* kod trudnica iz uzoraka periferne krvi. Kod trudnica sa sumnjom ili potvrdom primoinfekcije u trudnoći, vršena je prenatalna dijagnostika infekcije ploda iz uzoraka plodove vode ili fetalne krvi (materijal je dopreman u NRLT nakon izvršene amnio-/kordocenteze u odgovarajućim ginekološkim ustanovama). Postnatalna dijagnostika kongenitalne toksoplazmoze sprovedena je na uzorcima periferne krvi novorođenčadi, a u cilju utvrđivanja statusa infekcije *T. gondii* analizirani su i uzorci periferne krvi njihovih majki nakon porođaja.

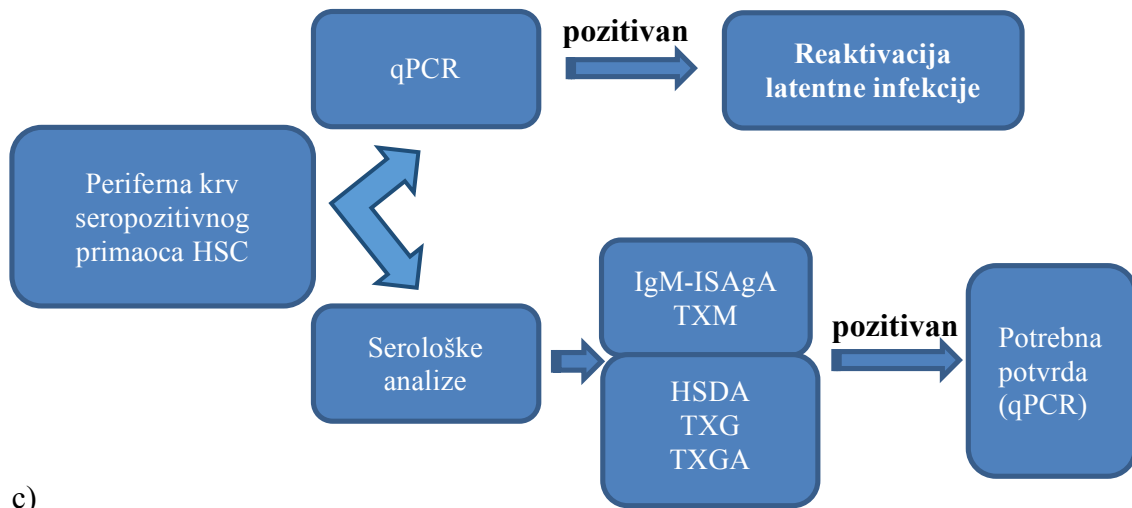
Rizik od posttransplantacione reaktivacije toksoplazmoze procenjivan je analizom uzoraka periferne krvi 25 potencijalnih primalaca i 18 davalaca HSC dok je dijagnostika posttransplantacione reaktivacije toksoplazmoze izvršena na uzorcima periferne krvi 18 primalaca HSC.

Dijagnostika reaktivirane toksoplazmoze podrazumevala je prikupljanje i analizu uzoraka periferne krvi i, kod sumnje na plućnu toksoplazmozu, bronhoalveolarnog lavata (BAL) bolesnika koji su od osnovne bolesti lečeni transplantacijom matičnih ćelija hematopoeze u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr. Vukan Čupić”. Radi određivanja statusa infekcije *T. gondii* kod davalaca matičnih ćelija hematopoeze, analizirani su i uzorci njihove periferne krvi.

### 3.2. METODE

Materijal dopremljen u NRLT u cilju dijagnostike toksoplazmoze analiziran je korišćenjem raspoloživih metoda, uz poštovanje odgovarajućeg algoritma namenjenog dijagnostici kongenitalne odnosno reaktivirane toksoplazmoze koji su shematski prikazani na Slici 2.





c)

**Slika 2.** Shematski prikaz dijagnostičkog algoritma za a) toksoplazmozu trudnica b) kongenitalnu toksoplazmozu c) reaktiviranu toksoplazmozu

Prikupljeni materijal je nakon dopremanja u NRLT najpre obrađivan centrifugiranjem. Puna krv (trudnica, kao i FK i NK) pripremana je centrifugiranjem na 2500 obrtaja u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi a PV i BAL centrifugiranjem na 2200 obrtaja u trajanju od 15 minuta. Izdvojeni supernatanti (serumi) korišćeni su za serološke analize a do izvođenja istih čuvani su na temperaturi od  $-20^{\circ}\text{C}$ . Istaloženi ćelijski elementi čuvani su na temperaturi od  $+4^{\circ}\text{C}$  do ekstrakcije DNK *T. gondii* i molekularnih analiza (qPCR) i/ili inokulacije u miševe (biološki ogled).

### 3.2.1. Indirektne metode za dijagnostiku infekcije *T. gondii* (serološke analize)

Supernatant izdvojen nakon centrifugiranja materijala prikupljenog u cilju dijagnostike toksoplazmoze analiziran je testovima namenjenim za detekciju antitela specifičnih za *T. gondii*.

#### 3.2.1.1. Kvantitativni serološki testovi

### 3.2.1.1.1. Testovi za detekciju IgG antitela specifičnih za *T. gondii*

- HSDA (visoko osetljivi test direktne aglutinacije) - Modifikacija testa direktne aglutinacije po (Desmonts i Remington, 1980) korišćena u ovom istraživanju omogućava detekciju niskih koncentracija specifičnih IgG antitela (od 0,1 IU/ml uzorka), zbog čega je primenjen kao trijažni test u uzorcima seruma pacijenata nepoznatog statusa infekcije *T. gondii*, kao i u uzorcima prikupljenim u cilju prenatalne dijagnostike KT odnosno reaktivirane toksoplazmoze kod kojih se očekuje niža koncentracija antitela. Kako je, zbog odsustva konjugata, sam test *species*-nespecifičan, primenjen je i u svrhu detekcije antitela specifičnih za *T. gondii* u serumima miševa žrtvovanih u sklopu biološkog ogleđa.

U ovom testu se kao antigen koriste celi, formalinom fiksirani i inaktivirani tahizoiti RH soja *T. gondii* a u cilju povećanja specifičnosti testa, odnosno inhibitornog vezivanja eventualno prisutnih IgM antitela (kako specifičnih tako i prirodnih, nespecifičnih) u reakcionu smešu je dodavan pufer sa 0,016 g/ml koncentracijom 2ME (2-merkaptoetanol). Reakcija je izvođena u mikrotitracionim pločama sa 96 reakcionih mesta (bunarčića sa U dnom). Kiselost reakcije koja bi mogla da ugrozi specifičnost testa sprečena je dilucijom antigena u baznom BABS puferu dok su analizirani serumi rastvarani u pH-neutralnom fosfatnom puferu (PBS). U slučaju nepoznatog statusa infekcije *T. gondii*, analizirani serumi su serijski razblaživani u PBS puferu od odnosa 1:20, dok je u slučaju poznate koncentracije specifičnih IgG antitela inicijalno razblaženje određivano shodno broju IU na ml seruma. Nakon unošenja uzoraka, u svako reakciono mesto dodavan je antigen (rastvoren u BABS puferu) u identičnoj zapremini. Nakon kratkotrajnog (< 1 min) mešanja na automatskoj horizontalnoj mešalici, ploče su inkubirane 18h u termostatu na temperaturi od 32°C, nakon čega su očitavani rezultati. Negativna (PBS pufer) i pozitivna kontrola (laboratorijski standard pripremljen prema referentnom serumu Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO) sa koncentracijom specifičnih IgG antitela od 1000 IU/ml) uključivane su u svaku reakciju.

Svi uzorci u kojima je u razblaženju (titru)  $\geq 1:20$  došlo do aglutinacije, smatrani su pozitivnim na prisustvo specifičnih IgG antitela u koncentraciji  $\geq 1$  IU/ml (shodno referentnom serumu SZO).

- Enzimski imunotest za određivanje IgG antitela specifičnih za *T. gondii* u humanom serumu ili plazmi, VIDAS® Toxo IgG II (TXG) (bioMérieux, Charbonnieres-les-Bains, Francuska) - Koncentracija specifičnih IgG antitela određivana je i korišćenjem komercijalnog TXG testa na mini VIDAS aparatu. Kao i drugi testovi komercijalno proizvedeni za upotrebu na mini VIDAS aparatu, i komplet za detekciju IgG antitela (TXG) sastoji se od seta plastičnih pipeta (*solid phase receptable*, SPR) i plastičnih test-traka (stripova) u čijim se bunarčićima nalaze svi reagensi neophodni za reakciju (ispirać, konjugat, rastvarač i supstrat). Metoda je automatizovana i bazira se na kombinaciji "sandwich-ELISA" i ELIFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) testa, uz fluorescentno očitavanje reakcije i završno štampanje rezultata.

Kod TXG testa, unutrašnjost SPR pipeta prevučena je antigenom (sadrži membranske i citoplazmatske determinante RH soja *T. gondii*) koji vezuje specifična IgG antitela ukoliko su prisutna u analiziranom serumu, za koja se potom vezuju i mišja monoklonska anti-humana IgG antitela konjugovana sa alkalnom fosfatazom, dok se nevezane komponente tokom reakcije sukcesivno ispiraju. Nakon automatskog dodavanja supstrata (4-metil-umbeliferil fosfata) dolazi do njegove hidrolize pod dejstvom alkalne fosfataze i oslobađanja fluorescentnog produkta (4-metil-umbeliferon). Mini VIDAS aparatom detektovana jačina fluorescencije proporcionalna je koncentraciji specifičnih IgG antitela u uzorku, izraženoj u IU/ml.

**Tabela 1.** Tumačenje TXG testa za detekciju specifičnih IgG antitela prema referentnim vrednostima

Koncentracija IgG antitela specifičnih za <i>T. gondii</i> (IU/ml)	Nalaz testa
< 4	Negativan
4-8	Graničan
≥ 8	Pozitivan

- Enzimski imunotest za određivanje aviditeta IgG antitela specifičnih za *T. gondii* u humanom serumu ili plazmi, VIDAS® Toxo IgG avidity (TXGA) (bioMérieux, Charbonnieres-les-Bains, Francuska) - Uslov za primenu ovog testa je

prisustvo specifičnih antitela u serumu u koncentraciji  $\geq 8$  IU/ml. Ukoliko je koncentracija IgG antitela  $> 15$  IU/ml, uzorci seruma se prethodno razblažuju (puferom u sastavu TXGA kompleta).

Test se zasniva na određivanju funkcionalnog afiniteta specifičnih IgG antitela za vezivanje antigena *T. gondii*, odnosno na osobini uree da, kao protein-denaturišući agens, lako razlaže veze koje sa antigenom formiraju nisko-avidna antitela (sintetisana u akutnoj fazi infekcije), dok nema uticaja na veze antigena sa antitelima detektovanim u poodmakloj infekciji (visoko-avidna antitela).

Sam princip testa razlikuje se od TXG testa u tome što se reakcija izvodi u dva stripa paralelno, pri čemu jedan strip sadrži samo ispirać dok drugi pored pufera za ispiranje sadrži i ureu. Rezultati se izražavaju u formi indeksa, a služe za određivanje vremena nastanka infekcije u odnosu na vreme testiranja.

**Tabela 2.** Tumačenje TXGA testa za određivanje aviditeta specifičnih IgG antitela prema referentnim vrednostima

Aviditet IgG antitela specifičnih za <i>T. gondii</i> (TXGA indeks)	Nalaz testa
$< 0,200$	Nizak
$0,200-0,300$	Graničan
$\geq 0,300$	Visok

### 3.2.1.1.2. Testovi za detekciju IgM antitela specifičnih za *T. gondii*

- Imunosorbentni aglutinacioni test za određivanje specifičnih IgM antitela (IgM-ISAgA) (*bioMérieux, Charbonnières-les-Bains, Francuska*) - ISAgA test se zbog svoje visoke osetljivosti koristi za detekciju specifičnih IgM antitela u serumima sa niskom koncentracijom IgM antitela (serumi novorođenčadi, imunokompromitovanih bolesnika i trudnica sa graničnom ili blizu granične koncentracije IgM antitela), kao i u uzorcima namenjenim prenatalnoj dijagnostici KT (plodova voda i fetalna krv).








Kao i u HSDA testu, i u ISAgA testu se kao antigen koriste intaktni formalinizirani tahizoiti RH soja. U ovom istraživanju korišćen je komercijalni ISAgA test koji se bazira na principu vezivanja monoklonskih anti-humanih IgM antitela za specifična IgM antitela prisutna u uzorku. Kao i kod HSDA testa, analizirani serumi se razblažuju u neutralnom PBS puferu u razmeri od 1:20 za serume novorođenčadi, odnosno 1:100 za serume odraslih. Pozitivna kontrola je deo ISAgA kompleta dok se PBS pufer koristi kao negativna kontrola u svakoj reakciji. Uzorci razblaženih seruma se, kao i kontrole, u zapremini od 100  $\mu$ l ukapavaju u stripove sačinjene od bunarčića sa U dnom (obezbeđene u sklopu ISAgA kompleta), prevučene monoklonskim antitelima, nakon čega se stripovi inkubiraju 2h u vlažnoj komori na temperaturi od 37°C. Potom sledi sukcesivno ispiranje PBS-*Tween*, odnosno PBS puferom i na kraju, dodavanje antigena rastvorenog u BABS puferu (u odnosu 1:20, prema uputstvu proizvođača) u zapremini od 100 i 150  $\mu$ l (inicijalni, skrining test), odnosno 150 i 200  $\mu$ l (potvrđni test).

Nakon 18-časovne inkubacije pokrivenih stripova u vlažnoj komori, pristupa se očitavanju rezultata. Kao i kod HSDA testa, i u ISAgA testu se pozitivna reakcija ogleda u aglutinaciji tahizoita sa antitelima dok u odsustvu specifičnih IgM antitela dolazi do taloženja tahizoita na dnu bunarčića u vidu kompaktnog dugmeta.

Rezultati se očitavaju kao stepen aglutinacije u pojedničanim bunarčićima pri čemu se stepen aglutinacije u svakom bunarčiću izražava skorom čija se vrednost kreće od 0 do 4 (0 = potpuno odsustvo aglutinacije, sedimentacija tahizoita kao u negativnoj kontroli; 4 = potpuna aglutinacija, odsustvo dugmeta kao u pozitivnoj kontroli), a rezultat ISAgA testa dobija se sabiranjem očitanih vrednosti (0-4) u svakom od bunarčića sa dve različite zapremine antigena (100 i 150  $\mu$ l, odnosno 150 i 200  $\mu$ l ukoliko je indeks inicijalnog ISAgA testa  $\geq 6$ ) i može iznositi od 0 do 12. Međutim, očitavanje rezultata je kao i kod HSDA testa, subjektivno i zavisno od oka posmatrača.

**Tabela 3.** Interpretacija rezultata ISAgA testa prema shematskom prikazu izgleda pojedinačnog bunarčića

Izgled bunarčića	Interpretacija rezultata	Indeks
	Potpuna sedimentacija u formi dugmeta (kao u negativnoj kontroli)	0
	Veliko sedimentaciono dugme	1
	Dugme srednje veličine	2
	Sasvim malo sedimentaciono dugme	3
	Potpuna aglutinacija (identična onoj u pozitivnoj kontroli)	4

**Tabela 4.** Tumačenje IgM-ISAgA testa za određivanje specifičnih IgM antitela prema referentnim vrednostima kod odraslih pacijenata

IgM-ISAgA indeks (odrasli)	Nalaz testa
0-5	Negativan
6-8	Graničan
9-12	Pozitivan

Međutim, po preporuci proizvođača svi uzorci seruma novorođenčadi, kao i uzorci korišćeni za prenatalnu dijagnostiku, smatraju se suspektnim na KT ukoliko je indeks IgM-ISAgA testa  $\geq 3$ , i potrebno je ponoviti analizu iz sukcesivnog uzorka neonatalnog seruma (posle najmanje 10 dana), kako bi se isključila kontaminacija majčinim antitelima na porođaju.

**Tabela 5.** Tumačenje IgM-ISAgA testa za određivanje specifičnih IgM antitela prema referentnim vrednostima u serumu novorođenčadi, u uzorcima plodove vode i fetalne krvi

IgM-ISAgA indeks (NK, PV i FK)	Nalaz testa
0-2	Negativan
$\geq 3$	Pozitivan

- Enzimski imunotest za određivanje IgM antitela specifičnih za *T. gondii* u humanom serumu ili plazmi, VIDAS® Toxo IgM (TXM) (bioMérieux, Charbonnières-les-Bains, Francuska) - U ovom istraživanju je kao trijažni korišćen komercijalni test namenjen automatizovanoj detekciji specifičnih IgM antitela na mini VIDAS aparatu u cilju inicijalnog određivanja markera akutne infekcije isključivo kod odraslih pacijenata.

Za razliku od TXG testa, unutrašnjost SPR pipeta u okviru TXM kompleta presvučena je poliklonskim, anti- $\mu$  imunoglobulinskim antitelima koja vezuju ukupna IgM antitela. IgM antitela specifična za *T. gondii*, ukoliko su prisutna u uzorku, izdvajaju se vezivanjem za mišja monoklonska anti-P30 antitela (P30 je solubilna antigenska determinanta *T. gondii*) konjugovana sa alkalnom fosfatazom, dok se nevezane komponente tokom reakcije sukcesivno ispiraju. Sledeći koraci u TXM testu analogni su onim u TXG testu. Nakon dodavanja supstrata (4-metil-umbeliferil fosfat) sadržanog u jednom od bunarčića TXM test trake, dolazi do njegove hidrolize pod dejstvom alkalne fosfataze i oslobađanja fluorescentnog produkta, 4-metil-umbeliferona. Mini VIDAS aparatom detektovana jačina fluorescencije proporcionalna je koncentraciji specifičnih IgM antitela u uzorku, izraženoj u formi indeksa (I).

**Tabela 6.** Tumačenje TXM testa za detekciju specifičnih IgM antitela prema referentnim vrednostima

Koncentracija IgM antitela specifičnih za <i>T. gondii</i> (TXM indeks)	Nalaz testa
< 0,55	Negativan
0,55-0,65	Graničan
≥ 0,65	Pozitivan

### 3.2.1.1.3. Testovi za detekciju IgA antitela specifičnih za *T. gondii*

- Imunosorbentni aglutinacioni test za određivanje specifičnih IgA antitela (IgA-ISAgA) - Komercijalni ISAgA test (*bioMérieux, Charbonnières-les-Bains, Francuska*) bio je jedini raspoloživi test za detekciju specifičnih IgA antitela u ovom istraživanju, našavši primenu prvenstveno u uzorcima korišćenim za dijagnostiku KT (plodova voda, fetalna krv, serum novorođenčadi; korelacija sa nalazom kod majki).

Test se zasniva na vezivanju monoklonskih anti-humanih IgA antitela za IgA antitela specifična za *T. gondii*, ukoliko postoje u uzorku. Dodatak antigena (formalinizirani tahizoiti RH soja) omogućava vizuelnu identifikaciju prisustva specifičnih antitela koja dovode do aglutinacije tahizoita (pozitivna reakcija), dok u odsustvu specifičnih IgA dolazi do sedimentacije parazita u vidu dugmeta. Princip izvođenja testa i tumačenje rezultata identični su onima u istovetnom testu za detekciju specifičnih IgM antitela (IgM-ISAgA).

**Tabela 7.** Tumačenje IgA-ISAgA testa za određivanje specifičnih IgA antitela prema referentnim vrednostima kod adultnih pacijenata (trudnica i porodilja)

IgA-ISAgA indeks (odrasli)	Nalaz testa
0-5	Negativan
6-8	Graničan
9-12	Pozitivan

**Tabela 8.** Tumačenje IgA-ISAgA testa za određivanje specifičnih IgA antitela u serumu novorođenčadi, u uzorcima plodove vode i fetalne krvi

IgA-ISAgA indeks (NK, PV i FK)	Nalaz testa
0-2	Negativan
3-5	Graničan
≥ 6	Pozitivan

Detekcija specifičnih IgA u graničnim vrednostima indeksa u materijalu za dijagnostiku fetalne/neonatalne infekcije predstavlja visoko suspektan nalaz koji govori u prilog KT pa je stoga, kao i u slučaju pozitivnog nalaza (radi isključenja potencijalne kontaminacije majčinim antitelima) neophodna serološka potvrda u neonatalnom uzorku prikupljenom nakon 10-14 dana.

### 3.2.1.2. Kvalitativni serološki testovi

- Komparativna analiza IgG/IgM imunoloških profila majke i novorođenčeta primenom *Western blot* tehnike - *Western blot* (WB) test primenjen je u ovom istraživanju u cilju identifikacije kongenitalno inficirane dece na rođenju ili u prva tri meseca života, kao i za eliminaciju mogućih uzroka lažno pozitivnih nalaza IgM-ISAgA testa (kontaminacija majčinim IgM antitelima prilikom porođaja).

WB test se uvek izvodi u paru i služi za kvalitativno poređenje IgG i IgM imunološkog odgovora u uzorku seruma deteta na rođenju sa IgG/IgM odgovorom u uzorku seruma majke. Takođe, WB se može izvoditi i nakon rođenja, u prva tri meseca života deteta, kada se vrši poređenje sa prethodnim uzorkom (u starijem uzrastu pojava nespecifičnih, *natural* antitela može interferirati sa rezultatom testa).

Antigenske determinante *T. gondii* razdvojene su elektroforezom na fragmente (trake, bendove) i prenete tehnikom elektro-blotiranja proteina na nitroceluloznu membranu. Membrana sa nanešenim antigenom isečena je potom na jednake trake, spremne za upotrebu.

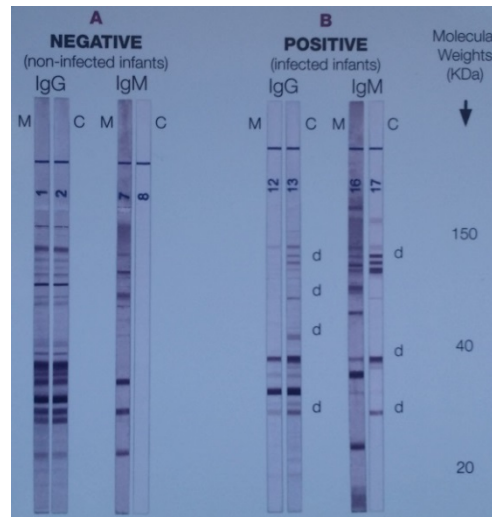
U ovom radu korišćen je komercijalni *Western blot* (WB) test proizvođača *LD-Bio Diagnostics*, Lion, Francuska. Komercijalni komplet sadrži, osim test-traka

presvučenih antigenom, pufer za ispiranje, pufer za rastvaranje uzorka, anti-IgM konjugat, anti-IgG konjugat, supstrat, kao i standard-traku namenjenu tumačenju rezultata testa.

Svi koraci u sklopu WB IgG/IgM testa izvode se uporedno za dva uzorka i po principu jedna traka - jedna klasa antitela u odgovarajućem uzorku, što podrazumeva korišćenje četiri trake u cilju komparacije IgG/IgM imunoprofila majka-dete. Test trake se najpre natapaju puferom za rastvaranje uzorka a potom se na njih nanosi ispitivani serum. Nakon 90-minutne inkubacije i ispiranja, na trake se nanosi odgovarajući konjugat (anti-IgG, odnosno anti-IgM). Nakon ponovne inkubacije i ispiranja dodaje se supstrat i prati razvoj boje bendova. Razvoj odgovarajućeg intenziteta boje bendova signal je za zaustavljanje reakcije, ispiranjem destilovanom vodom. Reakcija se mora zaustavljati istovremeno u oba kanalića sa trakama za određivanje antitela iste klase. Nakon zaustavljanja reakcije trake se suše na vazduhu tokom 15-20 minuta a potom se fiksiraju na beloj pozadini (paralelno obe IgG, odnosno IgM trake).

Očitavanje rezultata se vrši uz pomoć standard-trake sa obojenim specifičnim bendovima određenih molekulskih težina (kDa). Rezultati (prisustvo novosintetisanih bendova) se očitavaju za svaku klasu antitela ponaosob.

Ovim testom detektovano prisustvo bendova molekulske težine < 120 kDa na traci sa nanetim uzorkom seruma deteta dobijenim na rođenju koji se ne nalaze u uzorku majke znak je *in utero* (fetalne) sinteze antitela specifičnih za *T. gondii*. Isto tako, prisustvo bendova molekulske težine < 120 kDa na traci sa nanetim uzorkom seruma novorođenčeta do tri meseca starosti kojih nema u uzorku sa rođenja označava neonatalnu (postnatalnu) sintezu *T. gondii*-specifičnih antitela.



**Slika 3.** Ilustracija A) negativnog i B) pozitivnog WB nalaza na rođenju (u prisustvu standard test-trake), obezbeđena od strane proizvođača (*LD-Bio Diagnostics*, Lion, Francuska) (M=serum majke; C=serum novorođenčeta)

### 3.2.2. Direktne metode za dijagnostiku infekcije *T. gondii*

#### 3.2.2.1. Biološki ogled

Biološki ogled je u ovom istraživanju postavljan iz materijala prikupljenog u cilju prenatalne i rane postnatalne dijagnostike KT (plodova voda, fetalna krv, krv novorođenčeta).

Za postavljanje biološkog ogleda iz suspektnog materijala korišćene su ženke *Swiss-Webster* albino miševa (dva miša po ogledu), starosti 4-6 nedelja, težine 18-20 g u koje je inokulisan ćelijski talog (dobijen centrifugiranjem odgovarajućih bioloških materijala) u kome bi se mogli nalaziti tahizoiti *T. gondii*.

Oglednom mišu je, nakon dezinfekcije kože alkoholom, intraperitonealno ubrizgavano (korišćenjem sterilnog šprica sa odgovarajućom iglom) po 500  $\mu$ l uzorka ispitivanog biološkog materijala, uz dodatak 100  $\mu$ l antibiotika širokog spektra (gentamicin u dozi od 0,04 g/kg).

Nakon šest nedelja, ogleдни miševi su žrtvovani metodom cervikalne dislokacije nakon čega je odmah aspirirana krv iz srca (leve pretkomore/komore) u zapremini od 200-500  $\mu$ l. Serumi izdvojeni nakon centrifugiranja uzoraka krvi miševa analizirani su na prisustvo antitela specifičnih za *T. gondii* HSDA testom. Svi serumi sa koncentracijom antitela u HSDA testu  $\geq 1:20$ , označavani su kao pozitivni.

Mozgovi ogleđnih miševa ekstrahovani su iz lobanje i homogenizovani u 1 ml fiziološkog rastvora (korišćenjem sterilnog insulinskog šprica i igle od 21 G). Mikroskopskim pregledom (upotrebom fazno-kontrastnog mikroskopa) nativnih preparata pripremljenih od homogenata mozga miša (po mozgu jednog miša pravljeno je ukupno četiri preparata načinjenih od po 25  $\mu$ l homogenata) ispitivano je prisustvo cista *T. gondii* i njihova koncentracija u moždanom tkivu.

Broj cista *T. gondii* određen pregledom četiri preparata (ukupna pregledana zapremina homogenata iznosila je 100  $\mu$ l) množen je sa 10, kako bi se izračunao broj cista po 1 ml moždanog tkiva. Samim tim, prag osetljivosti biološkog ogleđda kao dijagnostičke metode iznosio je 10 cista/ml.

Ukratko, biološki ogleđ je smatran pozitivnim ukoliko je identifikovana bar jedna morfološki prepoznatljiva cista *T. gondii* u bar jednom mikroskopskom preparatu homogenata mozga bar jednog (od dva) ogleđna miša i/ili ukoliko su HSDA testom detektovana specifična antitela u uzorku seruma bar jednog (od dva) miša.

### **3.2.2.2. Molekularna dijagnostika**

Molekularna dijagnostika toksoplazmoze primenjena u ovom istraživanju podrazumevala je inicijalnu izolaciju (ekstrakciju) DNK iz ispitivanog materijala i sledstvenu detekciju i kvantifikaciju DNK *T. gondii* korišćenjem *real-time* PCR (qPCR) tehnike.

#### **3.2.2.2.1. Ekstrakcija (izolacija) DNK iz ispitivanog materijala**

Da bi se iz početnog materijala izdvojila DNK koja je predmet molekularne dijagnostike toksoplazmoze, odnosno identifikacije genetskog materijala parazita, pristupilo se ekstrakciji celokupne (genomske) DNK u ispitivanim uzorcima (plodova



voda, fetalna krv, periferna krv novorođenčeta, periferna krv trudnica, periferna krv transplantiranih bolesnika).

Ekstrakcija DNK izvedena je korišćenjem komercijalnog kita (*QIAamp DNA mini kit*, *Qiagen*, Hilden, Nemačka), u skladu sa uputstvom proizvođača ali uz manje modifikacije samog protokola. Princip primenjenog protokola ekstrakcije zasniva se na specifičnom vezivanju DNK molekula za *QIAamp* silika gel membranu (sastavni deo kolonica kroz koje se propušta uzorak ali i odgovarajući reagensi u sukcesivnim koracima) koja propušta ostale komponente uzorka. Uzorak najpre biva liziran a DNK u uzorku stabilizovana dejstvom odgovarajućih enzima i optimizovanih pufera, kako bi se pospešila selektivna adsorpcija DNK molekula za *QIAamp* silika gel membranu. Dobijeni lizat se, uz dodatak etanola, propušta kroz *QIAamp* kolonicu, a potom centrifugira i ispira. Potencijalni inhibitori PCR reakcije (proteini, divalentni katjoni...) u potpunosti se otklanjaju tokom dva koraka ispiranja tako da se na kraju protokola dobija čista DNK rastvorena ili u vodi bez nukleaza (eng. *nuclease-free*) ili u komercijalno obezbeđenom puferu, spremna za PCR analizu.

Kada je kao materijal za ekstrakciju DNK korišćena puna krv, ekstrakcija je, u cilju povećanja prinosa, vršena iz leukocitima bogate frakcije pune krvi (eng. *buffy coat*). Uzorak je najpre pripremljen centrifugiranjem pune krvi na 2500 obrtaja u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi, što je rezultiralo izdvajanjem tri jasno vidljive frakcije: plazme (gornji, transparentni sloj), *buffy coat*-a (srednji sloj, bogat leukocitima) i koaguluma (donji sloj, bogat eritrocitima). Celokupna DNK ekstrahovana je iz 200 µl *buffy coat*-a. Smatra se da je prinos DNK iz *buffy coat*-a čak 5-10 puta veći u odnosu na prinos iz jednake zapremine pune krvi (25-50 µg DNK iz 200 µl *buffy coat*-a, u odnosu na 4-12 µg iz pune krvi). Plodova voda i BAL pripremljeni su centrifugiranjem na 2200 obrtaja u trajanju od 15 minuta, pri čemu su istaloženi ćelijski elementi u zapremini od 200 µl iskorišćeni za ekstrakciju DNK.

Na samom početku procedure, uzorci izdvojeni za ekstrakciju DNK podvrgnuti su lizi dodavanjem 20 µl proteinaze K i 200 µl AL pufera. Tokom 10-30 minuta potrebnih za uspešno liziranje, uzorci su inkubirani u termomikseru na temperaturi od 56°C uz neprestano mešanje brzinom od 500 obrtaja u minuti (rotirajuća platforma). U dobijeni lizat dodavan je etanol u zapremini od 200 µl, a nakon energičnog mešanja u trajanju od 15 sekundi celokupna zapremina prebacivana je u kolonicu sa pripadajućom

*QIAamp* silika gel membranom. Tokom centrifugiranja sadržaja kolonica na 8000 obrtaja u trajanju od jednog minuta, DNK se vezala za membranu, dok su ostaci ćelija, nečistoće i potencijalni inhibitori ispirani u dva koraka – najpre AW1 a potom AW2 puferom DNK vezana za membranu u finalnom koraku je rastvorena u 100 µl *nuclease-free* vode. U cilju povećanja prinosa, potonji korak je ponavljan, što je rezultiralo finalnom zapreminom od 200 µl resuspendovane DNK.

Isti protokol primenjen je i za ekstrakciju DNK iz uzoraka peritonealnog eksudata RH sojem *T. gondii* inficiranih miševa, koji su korišćeni kao pozitivna kontrola u svim qPCR reakcijama sprovedenim u ovom istraživanju, odnosno za konstruisanje standardne krive (dalje u tekstu).

#### 3.2.2.2. **Kvantitativni PCR (qPCR, real-time PCR)**

Molekularna dijagnostika toksoplazmoze sprovedena u ovom istraživanju zasnovana je na detekciji i umnožavanju dela sekvence (amplikona) nekodirajućeg fragmenta u okviru 529 bp repetitivnog elementa koji se u genomu *T. gondii* ponavlja 200-300 puta (*GenBank accession number AF146527*) (Homan i sar., 2000) (Prilog).

Uspostavljanje protokola za molekularnu dijagnostiku toksoplazmoze kod visokorizičnih bolesnika podrazumevalo je odabir *forward* (f) (HO1) i *reverse* (r) (HO2) prajmera tj. odgovarajućih oligonukleotidnih sekvenci čije specifično vezivanje za komplementarne sekvence u okviru amplikona predstavlja preduslov za uspešno umnožavanje željenog regiona dužine 81 bp (Prilog) u okviru 529 bp repetitivnog elementa, kao i visokospecifične *TaqMan* probe (HOFT) (Vujanić i sar, 2010). *TaqMan* proba tek nakon specifičnog vezivanja za komplementarnu sekvencu u okviru amplikona emituje fluorescentni signal (detektovan uz pomoć FAM filtera u sklopu qPCR uređaja). Upotrebom *TaqMan* probe je izbegnuto nespecifično vezivanje do kojeg bi mogla dovesti primena drugih fluorescentnih proba odnosno obeleživača (kao što je npr. *SYBR Green*), što bi zahtevalo određivanje kriva topljenja (radi detekcije prisustva nespecifičnih produkata reakcije) i u mnogome odužilo protokol qPCR analize. Sekvence *TaqMan* probe i prajmera korišćenih u ovom istraživanju predstavljene su u Tabeli 9.

**Tabela 9.** Nukleotidne sekvence prajmera i probe

<i>forward</i> prajmer	HO1	5'-AGAGACACCGGAATGCGATCT
<i>reverse</i> prajmer	HO2	5'-CCCTCTTCTCCACTCTTCAATTCT
<i>TaqMan</i> proba	HOFT	5'-6FAM-ACGCTTTCCTCGTGGTGATGGCG-TAMRA

Naredni korak u procesu optimizacije rtPCR reakcije podrazumevao je određivanje optimalne koncentracije prajmera i probe, kao i tzv. *annealing* temperature (temperature vezivanja prajmera za komplementarne sekvence u okviru amplikona). Za određivanje optimalne temperature vezivanja prajmera poslužila je opcija temperaturnog gradijenta u sklopu uređaja za konvencionalni PCR (Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (*Applied Biosystems*)), korišćenjem uzoraka DNK ekstrahovanih iz peritonealnog eksudata RH sojem *T. gondii* inficiranih miševa. Produkti dobijeni amplifikacijom na šest zadatih različitih temperatura analizirani su potom elektroforezom na agaroznom gelu. Temperatura na kojoj je amplifikovan produkt sa najjasnijom trakom na gelu iznosila je 60°C, na osnovu čega je zaključeno da je upravo ta temperatura vezivanja prajmera najpogodnija za uspešnu amplifikaciju produkta. Određivanjem *annealing* temperature, precizno su definisani koraci u sklopu programa qPCR reakcije:

**Tabela 10.** Koraci u okviru dijagnostičkog qPCR programa

Redosled koraka	Svojstva qPCR koraka (vreme, temperatura)	Svrha određenog koraka
1.	2 min 50°C	Priprema za dejstvo UDG
2.	10 min 95°C	Inicijalna denaturacija
3.	15 sekundi 95°C	Brza denaturacija
<b>x 40</b>	1 min 60°C	Vezivanje prajmera i elongacija

Određivanje koncentracije prajmera i probe optimalnih za amplifikaciju produkta podrazumevala je istovremeno testiranje amplifikacije produkta (u analizi je korišćena DNK dobijena ekstrakcijom iz 500 tahizoita RH soja *T. gondii*) u četiri

reakcije sa različitom koncentracijom prajmera, dok je koncentracija probe ostala nepromenjena (3 mM), kao i ukupan volumen reakcije (23  $\mu$ l). Detalji su navedeni u Tabeli 11.

**Tabela 11.** Optimizacija koncentracije prajmera

Koncentracija prajmera u radnom rastvoru ( $\mu$ M)	Zapremina rastvora prajmera dodata u reakciju ( $\mu$ l)	Koncentracija probe ( $\mu$ M)
25	1	3
25	0,3	3
10	1	3
10	0,3	3

Naredni korak u optimizaciji koncentracije prajmera ali ovog puta i probe podrazumevao je analizu istovremene amplifikacije šest različitih reakcionih smeša (uz korišćenje DNK RH soja *T. gondii*), pri čemu je akcenat bio na varijaciji koncentracije probe (Tabela 12).

**Tabela 12.** Optimizacija koncentracije probe

Koncentracija prajmera u radnom rastvoru ( $\mu$ M)	Zapremina rastvora prajmera dodata u reakciju ( $\mu$ l)	Koncentracija probe u radnom rastvoru ( $\mu$ M)	Zapremina rastvora probe dodata u reakciju ( $\mu$ l)
25	0,3	3	0,1
25	0,3	3	0,3
25	0,3	3	0,5
10	1	3	0,1
10	1	3	0,3
10	1	3	0,5

Svi ovi koraci rezultirali su identifikacijom optimalne koncentracije prajmera i probe za detekciju željenog fragmenta u okviru 529 bp genske sekvence *T. gondii* (Tabela 13).

**Tabela 13.** Uporedne koncentracije prajmera i probe u radnom rastvoru, reakcionoj smeši (osnovnom miksu) i u finalnoj reakciji

Naziv komponente	Koncentracija u radnom rastvoru	Koncentracija u osnovnom miksu	Koncentracija u finalnoj reakciji (V=23 µl)
Prajmer HO1	25 µM (pmol/µl)	7,5 µM (pmol/µl)	326 nM (fmol/µl)
Prajmer HO2	25 µM (pmol/µl)	7,5 µM (pmol/µl)	326 nM (fmol/µl)
Proba HOFT	10 µM (pmol/µl)	3 µM (pmol/µl)	130 nM (fmol/µl)

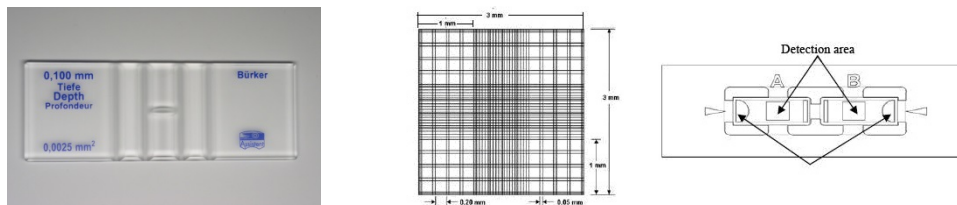
U sastav *TaqMan* master miksa korišćenog u ovom istraživanju (*Maxima® Probe /ROX qPCR Master Mix (2X)*, *Thermo Scientific*) ulaze *hot start* Taq DNK polimeraza i dNTP koji se nalaze u optimizovanom qPCR puferu. Osim dNTP neophodnih za amplifikaciju željenog produkta, primenjeni master miksu sadrži i dUTP čime je omogućena primena uracil-DNK glikozilaze (UDG) kako bi se sprečila tzv. *cross*-kontaminacija. Radi unapređenja efikasnosti reakcije, koncentracija MgCl<sub>2</sub> povećana je dodavanjem 1 µl MgCl<sub>2</sub> koncentracije 25 mM na 4,28 mM u osnovnom miksu.

Ključni korak u procesu standardizacije qPCR protokola za dijagnostiku toksoplazmoze podrazumevao je utvrđivanje praga i raspona detekcije genetskog materijala parazita kako bi se omogućila kvantifikacija *T. gondii* po 1 ml ispitivanog materijala.

#### Standardna kriva

U ovom istraživanju su korišćeni tahizoiti visoko virulentnog, necistogenog RH soja *T. gondii* koji se održava kroz serijske intraperitonealne (i.p.) pasaže u *Swiss-Webster* miševima u NRLT. Miševima se i.p. inokuliše 500 µl suspenzije parazita u fiziološkom rastvoru ( $2 \times 10^6$  tahizoita po mišu), uz dodatak 100 µl antibiotika (gentamicin u dozi od 0,04 g/kg).

Lavažom pomoću 1 ml fiziološkog rastvora tahizoiti su uzorkovani iz peritonealne tečnosti RH miša 72h nakon infekcije (Djurković-Djakovic i sar., 2005), čime je uzorkovano nešto više od 1 ml peritonealne tečnosti (zapaljenskog eksudata). Mikroskopskim pregledom nativnih preparata peritonealnog eksudata utvrđeno je prisustvo tahizoita *T. gondii*, a njihov broj je određen uz pomoć *Bürker-Türk* hemocitometra.



**Slika 4.** *Bürker-Türk* komora (preuzeto sa [www.incyto.com](http://www.incyto.com))

Nakon postavljanja pokrovnog stakalca, odgovarajućom pipetom se 10  $\mu$ l ćelijske suspenzije nanosi na ivicu komore koja potom kapilarnim silama biva uvučena u šupljinu komore. Broj ćelija u komori određuje se direktnim prebrojavanjem uz pomoć mikroskopa (*Zeiss Axioskop 2 plus*), tako da vizuelno različite ćelije mogu biti zasebno brojane. Dobijeni broj ćelija u komori služi za izračunavanje koncentracije ćelija u ukupnoj zapremini analizirane telesne tečnosti, po sledećoj formuli:

$$\text{Koncentracija ćelija u telesnoj tečnosti} = \frac{\text{Broj ćelija određen na komori}}{\text{Izbrojana P x V komore}} \times \frac{\text{V nanetog uzorka}}{\text{V izvornog uzorka}}$$

U *Bürker-Türk* komori zapremina svakog velikog kvadrata je 0.1 mm<sup>3</sup>. Broje se ćelije (u ovom slučaju tahizoiti) unutar četiri velika kvadrata komore, kao i one koje se nalaze na gornjoj i levoj stranici kvadrata, dok se ćelije na desnoj i donjoj stranici ne broje. Dakle, koncentracija ćelija/ml eksudata izračunavana je po formuli:

$$\text{Koncentracija ćelija po ml} = \text{broj ćelija u četiri velika kvadrata} / 4 \times 25 \times 10^4.$$

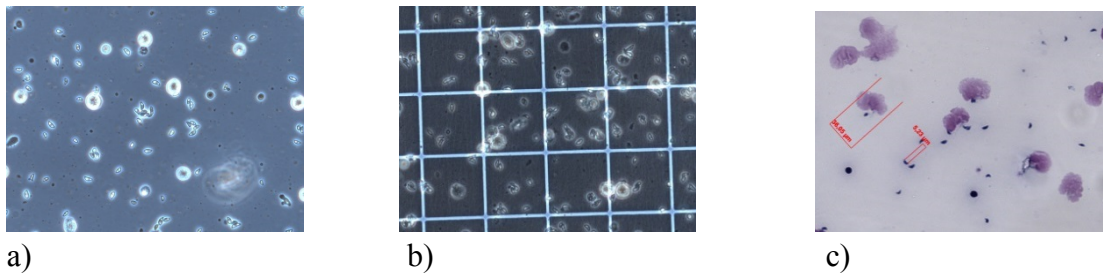
*Rezultati*

Broj tahizoita u peritonealnom eksudatu *Swiss-Webster* miša žrtvovanog 72h nakon infekcije RH sojem *T. gondii* određen je uz pomoć *Bürker-Türk* komore brojanjem tahizoita u četiri velika kvadrata. Brojanje je ponovljeno tri puta, pri čemu su dobijene slične vrednosti čijim je preračunavanjem određeno da analizirani uzorci sadrže približno  $7 \times 10^7$  parazita/ml peritonealne tečnosti.

**Tabela 14.** Rezultati određivanja broja tahizoita uz pomoć *Bürker-Türk* komore

	I brojanje	II brojanje	III brojanje
	292	277	266
	256	282	289
	278	295	301
	302	268	291
Srednja vrednost	282	280.5	286.75
$\times 25 \times 10^4$	$7050 \times 10^4$	$7012.5 \times 10^4$	$7168.75 \times 10^4$
Broj tahizoita/ml	$7.05 \times 10^7$	$7.01 \times 10^7$	$7.17 \times 10^7$

Potom je svaki od uzoraka peritonealnog eksudata razblažen u PBS puferu u odnosu 1:10 (1 ml peritonealnog eksudata i 9 ml PBS pufera). Dobijena smeša je potom centrifugirana na 2200 obrtaja u trajanju od 5 minuta. Nakon centrifugiranja odliven je supernatant a deo taloga nanesen je na *Bürker-Türk* komoru. Broj parazita određen na komori u tri analizirana uzorka peritonealnog eksudata nakon razblaživanja PBS puferom iznosio je  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$  i  $2,5 \times 10^7$ .



**Slika 5.** Tahizoiti RH soja *T. gondii* a) na nativnom preparatu b) na Bürker-Türk komori c) preparat peritonealnog eksudata bojenog *Giemsa* tehnikom

Iz 200  $\mu\text{l}$  svakog od ova tri uzorka izolovana je DNK korišćenjem QIAmp DNA mini komercijalnog kita (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka), prema prethodno opisanom protokolu. Ekstrahovana DNK je resuspendovana u 200  $\mu\text{l}$  *nuclease-free* vode. Zatim je svaki od uzoraka DNK razblažen do uzorka koji sadrži  $5 \times 10^6$  DNK *T. gondii* (u 200  $\mu\text{l}$  *nuclease-free* vode), od kojeg je formiran standardni niz desetostrukih serijskih razblaženja u rasponu od  $5 \times 10^3$  do 0,5 tahizoita po uzorku, koji su uključeni u qPCR reakciju postavljenu sa ciljem konstruisanja standardne krive. U svakom od ovih uzoraka određena je koncentracija ekstrahovane DNK (u  $\text{ng}/\mu\text{l}$  uzorka) korišćenjem Qubit® 3.0 fluorometra (*Life Technologies*). U reakciju je dodavana zapremina uzorka ekstrahovane DNK koja odgovara 1 ng, 100 pg, 100 fg DNK (preračunato na osnovu fluorometrijski određene koncentracije). Kao rezultat, zabeležena je linearnost u detekciji produkata qPCR reakcije u analiziranim uzorcima sa početnih 1 ng pa sve do 0,2 fg DNK.

Softver pridružen *Eppendorf Mastercycler realplex 1.5* uređaju automatski preračunava Ct (eng. *Cycle threshold*; redni broj PCR ciklusa u kome se registruje amplifikacija željenog DNK targeta iznad praga detekcije nespecifične fluorescencije) vrednosti standarda u cilju izračunavanja standardne krive koja prikazuje Ct vrednosti kao funkciju količine nukleinske kiseline u uzorcima. Standardna kriva izražena u formi linearne funkcije računski je predstavljena oblikom:

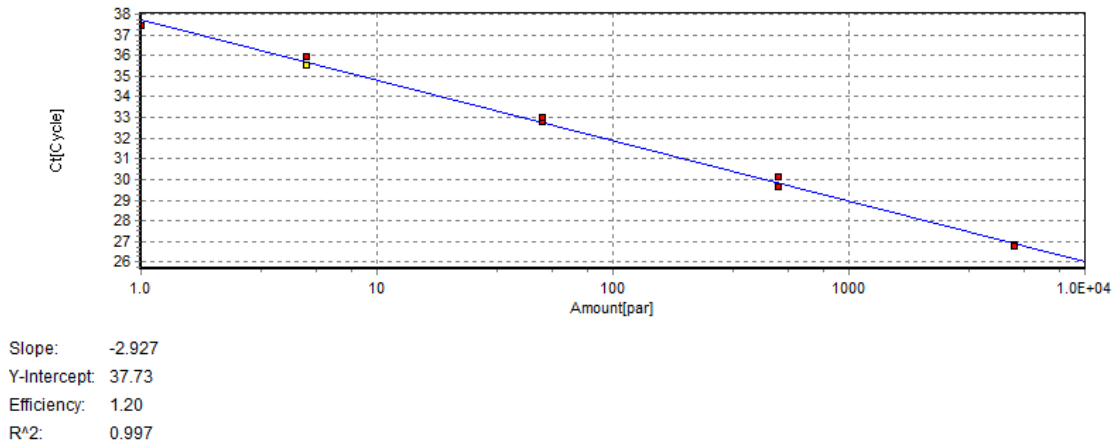
$$y = m x + b,$$

gde je  $y = \text{Ct}$ ,  $m =$  nagib krive,  $x = \log_{10}$  količine DNK u standardima,  $b =$  odsečak na y-osi.



Koeficijent korelacije ( $R^2$ ) je parametar standardne krive koji ukazuje na stepen odstupanja qPCR reakcije od maksimalne (100%) efikasnosti (savršene linearnosti).

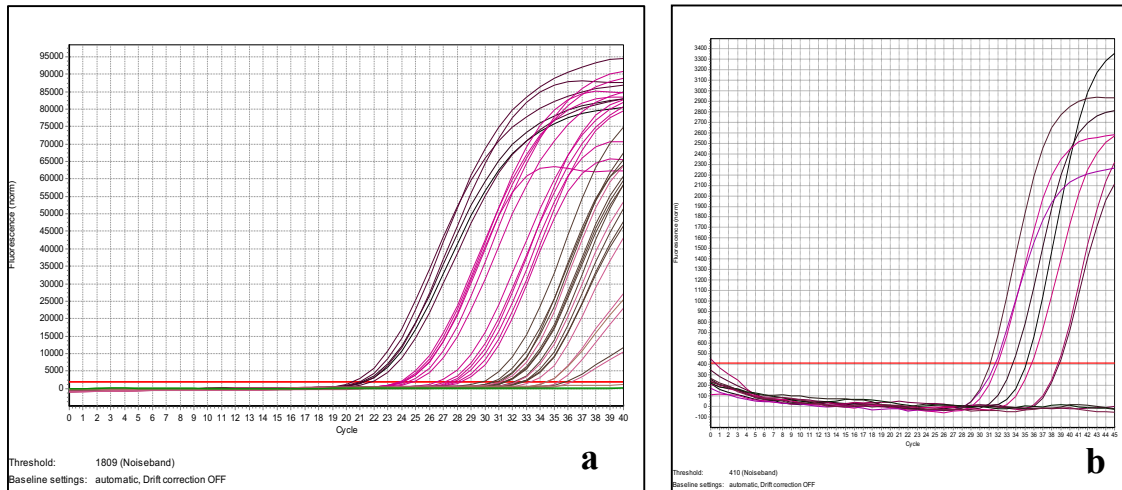
Odsečak na y-osi (b) je pokazatelj donjeg praga detekcije tj. pouzdanosti kvantifikacije DNK u standardima.



**Slika 6.** Prikaz formirane standardne krive

Standardna kriva dobijena kao rezultat ovog istraživanja imala je sledeće karakteristike: nagib linearne krive -2,927, a odsečak na Y osi 37,73, što je pokazatelj visokog stepena efikasnosti reakcije (99,7%).

Verodostojnost novoformiranih standarda proverena je qPCR ko-testiranjem sa 10 uzoraka DNK *T. gondii* dobijenim u sklopu QCMD (eng. *Quality Control Molecular Diagnostics*) programa a poreklom iz materijala sa standardizovanim brojem parazita ([www.qcmd.org](http://www.qcmd.org)). Na osnovu rezultata učešća NRLT u QCMD programu (u periodu 2009-2014.), primenom optimizovanog qPCR protokola u analizi dobijenih uzoraka, verifikovana je osetljivost metode u granicama detekcije 1 parazita/ml biološkog materijala.



**Slika 7.** Grafički prikaz qPCR analize a) standarda reakcije b) uzoraka dobijenih u okviru QCMD programa 2014. godine

Konstruisanje standardne krive omogućilo je finalizaciju protokola namenjenog primeni qPCR za detekciju DNK *T. gondii* u dijagnostičke svrhe.

Uzorci ekstrahovane DNK poreklom iz materijala prikupljenog u cilju dijagnostike kongenitalne i reaktivirane toksoplazmoze analizirani su najpre fluorometrijski na Qubit® 3.0 uređaju. Nakon određivanja koncentracije DNK, za svaki uzorak pripremane su tri odvojene reakcione smeše. Prva reakcija podrazumevala je analizu 1 ng DNK uzorka (u odgovarajućoj, izračunatoj zapremini uzorka u kojoj se ta količina DNK nalazi). Druge dve reakcije postavljane su u cilju pokušaja eliminacije mogućeg prisustva inhibitora PCR procesa (tragovi proteina, soli, etanola itd.). Druga reakcija obuhvatala je amplifikaciju uzorka razblaženog do koncentracije od 0,1-0,2 ng DNK u reakciji, a treća (tzv. "spajkovana", eng. *spiking*) podrazumevala je amplifikaciju 0,1 ng DNK uzorka u koji je dodat 0,1 ng DNK RH soja *T. gondii* (interna kontrola), što je u odsustvu inhibitora rezultiralo amplifikacijom produkta sa Ct vrednošću od 31. U slučaju detekcije prisustva inhibitora, uzorak ekstrahovane DNK podvrgnut je dodatnom pročišćavanju propuštanjem kroz membranu kolonice *DNeasy Blood & Tissue Kit*-a (*Qiagen*, Hilden, Nemačka), uz sledstveno ispiranje odgovarajućim komercijalnim puferima, nakon čega je retestiran.

U sklopu dijagnostičke analize uzorka, uključivane su i dve negativne kontrole, i to materijal iste vrste u kojem je dokazano odsustvo *T. gondii* i uzorak *nuclease-free* vode.

Ukupan volumen svake od ovih reakcionih smeša iznosio je 23  $\mu$ l. Osnovni miks pravljen je za sve smeše zajedno (u tabeli 15 navedene su finalne koncentracije komponenti osnovnog miksa), dok je odgovarajuća zapremina DNK ekstrakta kao i *nuclease-free* vode dodavana u svaku smešu ponaosob.

**Tabela 15.** Uporedne koncentracije prajmera i probe u radnom rastvoru, reakcionoj smeši (osnovnom miksu) i u finalnoj reakciji

Naziv komponente osnovnog miksa	Koncentracija u radnom rastvoru	Volumen koji se dodaje u miks ( $\mu$ l)	Koncentracija u osnovnom miksu [ $\mu$ M (pmol/ $\mu$ l)]	Koncentracija u finalnoj reakciji (V=23 $\mu$ l)
Prajmer HO1	25 $\mu$ M (pmol/ $\mu$ l)	0,3	7,5	326 nM (fmol/ $\mu$ l)
Prajmer HO2	25 $\mu$ M (pmol/ $\mu$ l)	0,3	7,5	326 nM (fmol/ $\mu$ l)
Proba HOFT	10 $\mu$ M (pmol/ $\mu$ l)	0,3	3	130 nM (fmol/ $\mu$ l)
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1	4,28 mM	186 $\mu$ M (pmol/ $\mu$ l)
UNG	1 U/ $\mu$ l	1	1 U	1 U
UNG Buffer	10 X	2	1 X	

### 3.3. STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA

U analizi podataka korišćeni su, osim osnovnih metoda deskriptivne statistike (aritmetička sredina, standardna devijacija, grupisanje) i metode neparametrijske [hi-kvadrat test ( $X^2$ )] statistike.

Dijagnostičke metode su međusobno poređene pomoću standardnih mera slaganja između testova, i to pomoću tablica kontingencije 2 x 2 na zbirnom nivou. Granicom statističke značajnosti smatrana je verovatnoća od 5% ( $P < 0,05$ ). Kao standardne mere slaganja testova izračunavani su osetljivost, specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrednost, kao i realno statističko slaganje rezultata (*kappa* statistika). Osetljivost je izračunavana prema formuli  $[SP / (SP + LN)] \times 10$ ,

specifičnost =  $[\text{SN} / (\text{SN} + \text{FP})] \times 100$ , pozitivna prediktivna vrednost (PPV) =  $[\text{SP} / (\text{SP} + \text{LP})] \times 100$ , a negativna prediktivna vrednost (NPV) =  $[\text{LN} / (\text{LN} + \text{FN})] \times 100$  (SP - stvarno pozitivno; LP - lažno pozitivno; SN - stvarno negativno; LN - lažno negativno). Nivoi slaganja za *kappa* (*k*) analizirani su po protokolu Landis i Koch-a (1977). Moguće vrednosti *k* su u rasponu od -1 do 1. Negativne vrednosti ukazuju na to da postoji slaganje manje od slučajnog, što znači da postoji sistematsko neslaganje između testova. Pozitivne vrednosti definišu slaganje između testova koje je više nego slučajno. *Kappa* vrednost od 0,01 - 0,20 označava neznatno slaganje, 0,21 - 0,40 umereno, 0,41 - 0,60 dobro slaganje, 0,61 - 0,80 znatno i od 0,81 - 0,99 gotovo savršeno slaganje.

Statistička obrada je obavljena u *SPSS* programu verzija 11.5 (*SPSS Inc.*, Čikago, IL, SAD).

## **REZULTATI**

#### 4.1. ANALIZA USPEŠNOSTI MOLEKULARNE DIJAGNOSTIKE KONGENITALNE TOKSOPLAZMOZE PRIMENOM qPCR

Molekularna dijagnostika kongenitalne toksoplazmoze primenjena je u različitim kategorijama pacijenata, i to:

- Kod plodova trudnica sa dokazanom ili suspektnom primoinfekcijom u trudnoći (kod 34 koji nisu ispitivani nakon rođenja i kod 20 koji su ispitivani i nakon rođenja)
- Kod novorođenčadi čije su majke ispitivane na toksoplazmozu tokom trudnoće (bez obzira da li je prenatalna dijagnostika preduzeta ili ne; ukupno 39)
- Kod novorođenčadi čije su majke prvi put ispitivane na toksoplazmozu nakon porođaja (ukupno 16 novorođenčadi)

Kako je osnovni preduslov za dijagnostiku KT suspektna ili dokazana infekcija majke, prvi korak u ovom istraživanju bio je određivanje statusa infekcije ispitivanih trudnica.

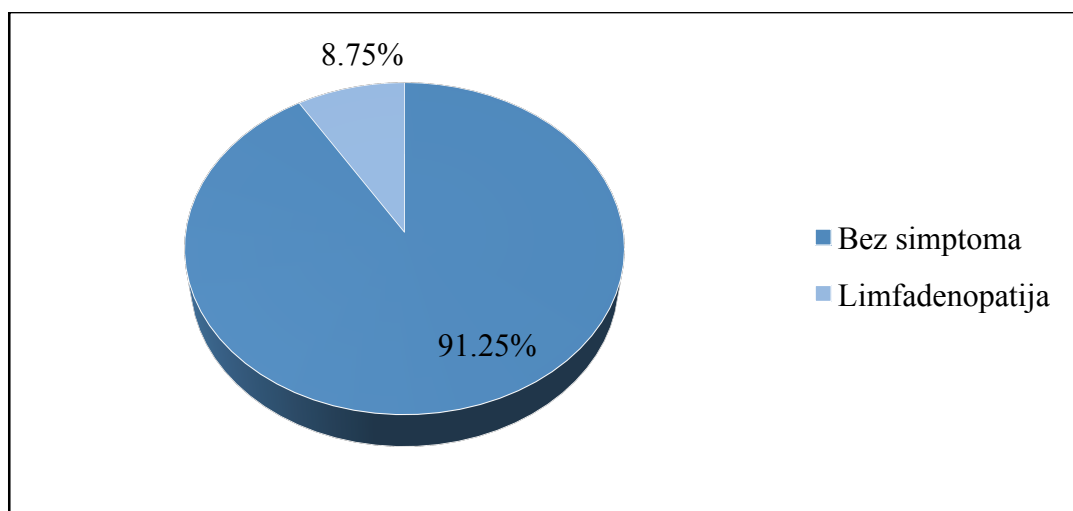
##### 4.1.1. Određivanje statusa infekcije *T. gondii* kod ispitivanih trudnica

Ovim delom istraživanja obuhvaćeno je ukupno 80 trudnica koje su inicijalno ispitivane na toksoplazmozu u različitim fazama trudnoće (Tabela 16). Ishod trudnoće praćen je kod 37, dok novorođenčad 43 trudnice nije praćena u NRLT nakon porođaja.

**Tabela 16.** Faza trudnoće u vreme inicijalnog ispitivanja trudnica u NRLT

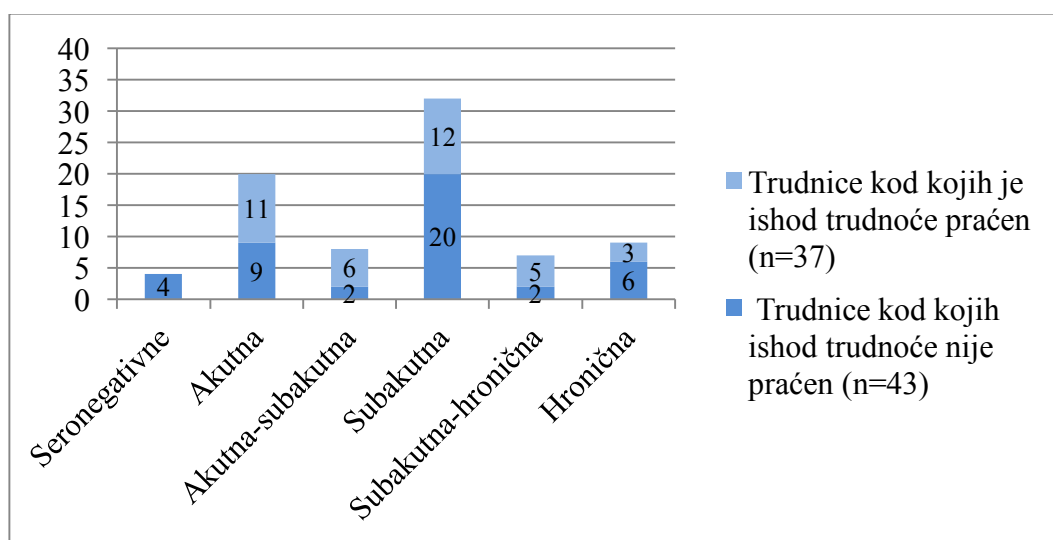
Trimestar	Broj trudnica (n=80)	%
I	18	22,50
II	49	61,25
III	13	16,25

Simptomi infekcije bili su odsutni kod čak 73 trudnice, dok je limfadenopatija, kao jedan od mogućih kliničkih oblika ispoljavanja, zabeležena kod svega sedam trudnica (Grafikon 1).



**Grafikon 1.** Prisustvo kliničke simptomatologije kod ispitivanih trudnica

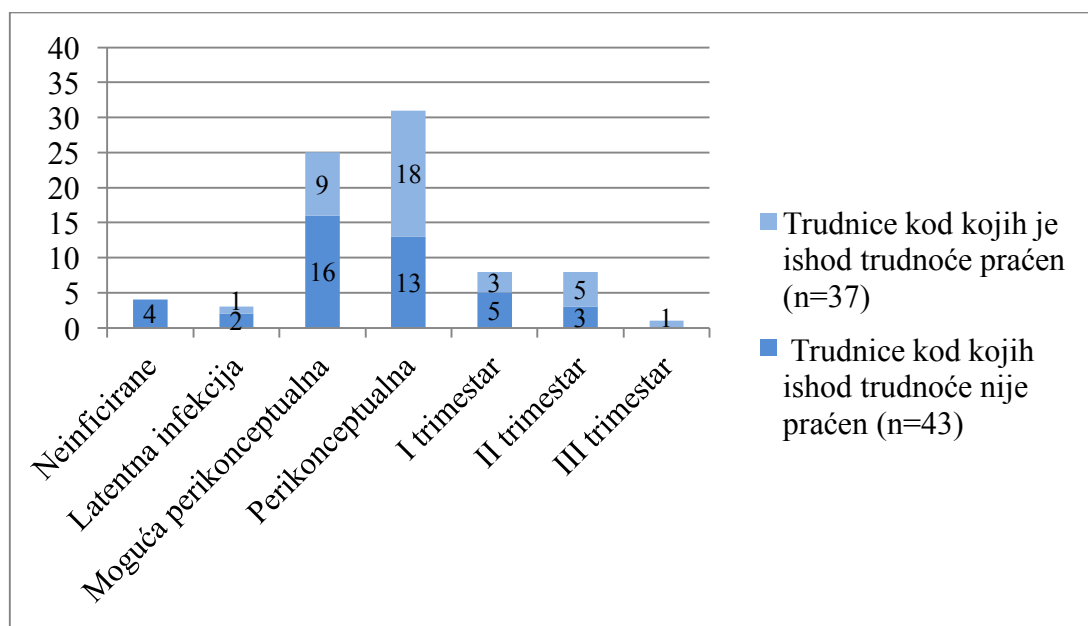
Utvrđivanjem statusa infekcije *T. gondii* prilikom prvog ispitivanja, najveći broj trudnica nalazio se u subakutnoj (40,0%), nešto manji broj u akutnoj fazi infekcije (25,0%), dok je potpuno odsustvo infekcije zabeleženo kod svega 5,0% trudnica (Grafikon 2).



**Grafikon 2.** Status infekcije trudnica određen na osnovu inicijalnog ispitivanja

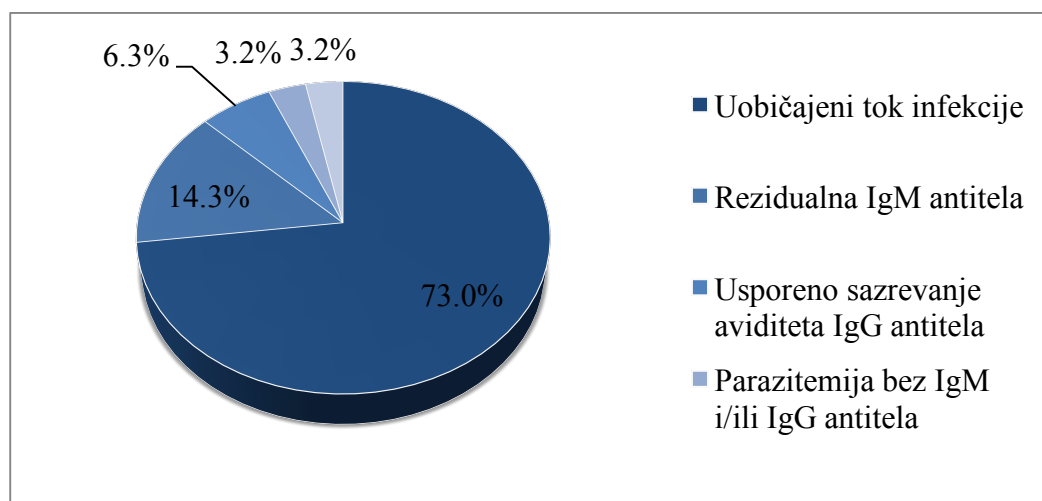
Analizom rezultata serološkog ispitivanja svih 80 trudnica u NRLT, određeno je i vreme infekcije u odnosu na vreme koncepcije. Najveći broj ispitanih trudnica

inficirao se *T. gondii* u perikonceptualnom periodu (38,75%) dok je kod nešto manjeg broja (31,25%) ustanovljena moguća perikonceptualna infekcija (Grafikon 3).



**Grafikon 3.** Vreme infekcije trudnica u odnosu na vreme koncepcije

Od ukupno 80 trudnica obuhvaćenih ovim istraživanjem, 63 je bilo serološki praćeno. Serološka odstupanja od uobičajenog toka infekcije detektovana su kod 27% (17/63) trudnica (Grafikon 4).



\*TXG < 8 IU/ml

**Grafikon 4.** Dijagnostičke neobičnosti detektovane kod ispitivanih trudnica (n=63)



**4.1.1.1. Trudnice koje nisu serološki praćene nakon porođaja**

Ovim delom ispitivanja obuhvaćene su 43 trudnice koje su inicijalno ispitivane u NRLT u različitim fazama trudnoće (Tabela 17).

**Tabela 17.** Faze trudnoće u vreme inicijalnog ispitivanja trudnica u NRLT

Trimestar	Broj trudnica (n=43)	%
I	7	16,28
II	28	65,12
III	8	18,60

Kod 40 trudnica nije bilo klinički značajnih simptoma infekcije, dok je kod tri trudnice (6,97%) zabeležena limfadenopatija. Na osnovu rezultata inicijalnog serološkog ispitivanja određen je status infekcije *T. gondii* kod sve 43 trudnice, prema kriterijumima navedenim u Tabeli 18.

**Tabela 18.** Status infekcije *T. gondii* određen prilikom inicijalnog ispitivanja trudnica u NRLT

Dijagnostički kriterijumi					Status infekcije <i>T. gondii</i>	Broj trudnica (n= 43)	%
HSDA	TXG	IgM-ISAgA	TXM	TXGA			
Neg	Neg	Neg	Neg	/	Neimunizovane	4	9,30
Poz	Poz	Poz	Poz	Niz	Akutna	9	20,93
Poz	Poz	Poz	Poz	Gran	Akutna - subakutna	2	4,65
Poz	Poz	Poz	Poz	Vis	Subakutna	20	46,51
Poz	Poz	Neg/Gran	Neg	Niz			
Poz	Poz	Poz	Gran	Gran			
Poz	Poz	Poz	Gran	Vis	Subakutna - hronična	2	4,65
Poz	Poz	Neg	Neg	Vis	Hronična	6	13,95

Poz = pozitivan; Neg = negativan; Gran = graničan; Vis = visok; Niz = nizak;

Serološkim ispitivanjem trudnica pokazano je odsustvo antitela specifičnih za *T. gondii* kod četiri trudnice, dok je kod preostalih 39/43 (90,7%) vreme infekcije određeno u odnosu na vreme koncepcije (Tabela 19).

**Tabela 19.** Određivanje vremena infekcije trudnica u odnosu na vreme koncepcije

Kriterijumi za određivanje vremena infekcije u odnosu na koncepciju		Vreme infekcije u odnosu na koncepciju	Broj trudnica (n=39)	%
Trimestar u vreme ispitivanja	Status infekcije			
I-III	Hronična bez IgM i sa niskim IgG, TXGA > 0,300 ili nemerljiv	Latentna infekcija	2	5,13
I-II II-III III	Subakutna Subakutna-hronična Hronična	Moguća perikonceptualna	16	41,02
I II III	Akutna sa TXGA > 0,100 Akutna sa TXGA > 0,200 Subakutna sa TXGA > 0,300	Perikonceptualna	13	33,34
I II	Akutna sa TXGA < 0,100 Akutna sa TXGA 0,100-0,200	I trimestar	5	12,82
II III	Akutna sa TXGA < 0,100 Akutna-subakutna sa TXGA 0,200-0,300	II trimestar	3	7,69

Kako su inficirane trudnice u okviru ove grupe serološki praćene i nakon inicijalnog ispitivanja u NRLT, utvrđene su i određene dijagnostičke neobičnosti odnosno odstupanja od uobičajene serološke dinamike tokom infekcije *T. gondii*. Prikaz učestalosti detekcije ovih seroloških fenomena predstavljen je u Tabeli 20.

**Tabela 20.** Neobičnosti serološke dijagnostike registrovane u grupi trudnica koje nisu serološki praćene nakon porođaja

Dijagnostička neobičnost	Broj trudnica (n=39)	%
Rezidualna IgM antitela	3	7,69
Usporeno sazrevanje TXGA	2	5,13
Parazitemija bez IgM i IgG	1	2,56
Nizak IgG u hroničnoj infekciji	2*	5,13
<b>Ukupno</b>	<b>8</b>	<b>20,51</b>

\*TXG < 8 IU/ml

#### 4.1.1.2. Trudnice koje su serološki praćene i nakon porođaja

Ovom grupom obuhvaćeno je 37 trudnica. U Tabeli 21 dat je pregled gestacione zrelosti prilikom prvog ispitivanja trudnica iz ove grupe u NRLT.

**Tabela 21.** Faza trudnoće u vreme inicijalnog ispitivanja trudnica u NRLT

Trimestar	Broj trudnica (n=37)	%
I	11	29,73
II	21	56,76
III	5	13,51

Odsustvo infektivne simptomatologije zabeleženo je kod 33 trudnice, dok je limfadenopatija bila prisutna u četiri slučaja (10,81%).

Stanje infekcije *T. gondii* je kod svih trudnica utvrđeno na osnovu seroloških parametara infekcije (Tabela 22).

**Tabela 22.** Status infekcije *T. gondii* određen prilikom inicijalnog ispitivanja trudnica u NRLT

Dijagnostički kriterijumi					Status infekcije <i>T. gondii</i>	Broj trudnica (n= 37)	%
HSDA	TXG	IgM-ISAgA	TXM	TXGA			
Poz	Poz	Poz	Poz	Niz	Akutna	11	29,73
Poz	Poz	Poz	Poz	Gran	Akutna- subakutna	6	16,22
Poz	Poz	Poz	Poz	Vis	Subakutna	12	32,43
Poz	Poz	Neg/Gran	Neg	Niz			
Poz	Poz	Poz	Gran	Gran			
Poz	Poz	Poz	Gran	Vis	Subakutna -hronična	5	13,51
Poz	Poz	Neg	Neg	Vis	Hronična	3	8,11

Poz = pozitivan; Neg = negativan; Gran = graničan; Vis = visok; Niz = nizak;

Zatim je, na osnovu serološkog statusa, kod svih 37 trudnica izvršena procena vremena nastanka infekcije u odnosu na vreme koncepcije (Tabela 23).

**Tabela 23.** Određivanje vremena infekcije trudnica u odnosu na koncepciju

Kriterijumi za određivanje vremena infekcije u odnosu na koncepciju		Vreme infekcije u odnosu na koncepciju	Broj trudnica (n= 37)	%
Trimestar	Status infekcije			
I	Subakutna-hronična (rezidualni IgM)	Latentna infekcija	1	2,70
I-II II-III III	Subakutna Subakutna-hronična Hronična	Moguća perikonceptualna	9	24,33
I II III	Akutna sa TXGA < 0,100 Akutna sa TXGA < 0,200 Subakutna sa TXGA > 0,300	Perikonceptualna	18	48,65
I II	Akutna sa TXGA < 0,100 Akutna sa TXGA 0,100-0,200	I trimestar	3	8,11
II III	Akutna sa TXGA < 0,100 Akutna-subakutna sa TXGA 0,200-0,300	II trimestar	5	13,51
III	Akutna sa TXGA < 0,100	III trimestar	1	2,70

Kako su trudnice u okviru ove grupe serološki praćene i nakon inicijalnog ispitivanja u NRLT, ustanovljene su određene dijagnostičke neobičnosti odnosno odstupanja od uobičajene serološke dinamike tokom infekcije *T. gondii*. Učestalost detekcije ovih seroloških fenomena predstavljena je u Tabeli 24.

**Tabela 24.** Neobičnosti serološke dijagnostike registrovane u ovoj grupi ispitivanih trudnica

Dijagnostička neobičnost	Broj trudnica (n=37)	%
Rezidualna IgM antitela	6	16,22
Usporeno sazrevanje TXGA	2	5,40
Parazitemija bez IgM	1	2,70
<b>Ukupno</b>	<b>9</b>	<b>24,32</b>

#### 4.1.2. Poređenje qPCR sa konvencionalnim metodama prenatalne dijagnostike KT

#### 4.1.2.1. Prenatalna dijagnostika KT bez postnatalnog ispitivanja

Od 43 trudnice čije potomstvo nije po rođenju bilo dalje ispitivano na toksoplazmozu, prenatalna dijagnostika infekcije ploda preduzeta je kod 41 (95%) trudnice, dok kod dve trudnice nije bilo moguće sprovesti prenatalnu dijagnostiku, u jednom slučaju zbog namernog pobačaja a u drugom zbog intrauterusne smrti ploda u IV mesecu trudnoće.

Kao materijal za prenatalnu dijagnostiku KT korišćeni su plodova voda (dobijena amniocentezom u II trimestru trudnoće) i fetalna krv (dobijena kordocentezom u III trimestru trudnoće) (Tabela 25).

**Tabela 25.** Materijal korišćen za prenatalnu dijagnostiku KT

Materijal	Broj trudnica (n=41)	%	Broj uzoraka (n=42)	%
Plodova voda (PV)	37	90,24	38*	90,47
Fetalna krv (FK)	4	9,76	4	9,53

\* Jedna trudnoća bila je blizanačka (2 uzorka PV)

##### 4.1.2.1.1. Rezultati qPCR analize

Od ukupno 42 uzorka bioloških materijala koji su nam bili na raspolaganju za prenatalnu dijagnostiku KT, 34 (81%) su analizirana pomoću qPCR (ostalih osam uzoraka prikupljeno je u periodu pre uspostavljanja molekularne dijagnostike u NRLT). Rezultati qPCR detekcije *T. gondii* iz prenatalno prikupljenog materijala predstavljeni su u Tabeli 26.

**Tabela 26.** Rezultati qPCR iz materijala korišćenog za prenatalnu dijagnostiku KT

qPCR (n=34)	PV	FK
POZITIVAN	4	0
NEGATIVAN	28	2
<b>Ukupno</b>	<b>32</b>	<b>2</b>

**4.1.2.1.2. Rezultati bioloških oglada**

Biološki ogled (BO) je postavljen iz 39 od 42 (93%) uzorka prikupljenih za prenatalnu dijagnostiku infekcije ploda. Iz tri uzorka (dve PV i jedne FK) nije rađen, zato što je serološkim ispitivanjem trudnica u jednom slučaju utvrđeno odsustvo infekcije, a u preostala dva utvrđena je davnašnja (latentna) infekcija koja nije mogla biti preneti na plod. Ishodi bioloških oglada obavljenih u sklopu prenatalne dijagnostike KT prikazani su u Tabeli 27.

**Tabela 27.** Rezultati bioloških oglada postavljenih iz materijala za prenatalnu dijagnostiku KT

BO	Materijal analiziran pomoću qPCR		Materijal nije analiziran pomoću qPCR		Ukupno	
	PV	FK	PV	FK	PV	FK
POZITIVAN	3	1	3	0	6	1
NEGATIVAN	27	0	3	2	30	2
<b>Ukupno</b>	<b>30</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>36</b>	<b>3</b>

**4.1.2.1.3. Uporedni rezultati direktne parazitološke dijagnostike**

Od ukupno 41 trudnice podvrgnute prenatalnoj dijagnostici infekcije ploda (42 uzorka), KT je dokazana metodama direktne dijagnostike, detekcijom DNK ili vijabilnih parazita u ispitivanom materijalu, u devet (22%) slučajeva. Doprinos qPCR u odnosu na BO u prenatalnoj dijagnostici KT u ovoj grupi pacijenata prikazan je u Tabeli 28.

**Tabela 28.** Uporedni prikaz uspešnosti metoda direktne dijagnostike KT u prenatalnom periodu

Metod prenatalne potvrde KT	Materijal analiziran pomoću qPCR		Materijal nije analiziran pomoću qPCR		KT n (%)
	PV	FK	PV	FK	
Samo qPCR	2	0	/	/	2 (22,22%)

Samo BO	1	1	3	/	5 (55,55%)
qPCR & BO	2	0	/	/	2 (22,22%)
<b>Ukupno</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>/</b>	<b>9</b>

#### 4.1.2.1.4. Rezultati detekcije specifičnih IgM i IgA antitela

Detekcija IgM antitela specifičnih za *T. gondii* preduzeta je u sva 42 uzorka prikupljena u cilju prenatalne dijagnostike KT i to pomoću ISAgA testa kao testa izbora za ovu kategoriju pacijenata. IgM antitela su detektovana u značajnoj koncentraciji (indeks  $\geq 3$ ) samo u dva slučaja, i to u uzorcima seruma dobijenog iz FK (KT potvrđena u jednom slučaju).

S druge strane, specifična IgA antitela određivana su ISAgA testom u svega sedam uzoraka korišćenih za prenatalnu dijagnostiku KT ali su u značajnoj koncentraciji (indeks  $\geq 3$ ) detektovana u pet (u četiri uzorka PV i u jednom uzorku FK) (Tabela 29).

**Tabela 29.** Prikaz slučajeva detektabilnih specifičnih IgA antitela u uzorcima za prenatalnu dijagnostiku KT

Redni broj i vrsta uzorka	Nalaz u PV/FK		Nalaz u serumu majke		Direktna dijagnostika		Dijagnoza KT
	IgA	IgM	IgA	IgM	qPCR	BO	
PV1	9	0	12	12	Neg	Neg	NE
PV2	8	0	10	12	Poz	Neg	DA
PV3	11	0	12	12	Neg	Poz	DA
PV4	4	0	5	12	Poz	Poz	DA
FK	12	11	12	10	Neg	Poz	DA

Neg = negativan; Poz = pozitivan

U Tabeli 30 dat je prikaz rezultata prenatalne dijagnostike u devet slučajeva na osnovu kojih je postavljena dijagnoza KT, u odnosu na procenjeno vreme infekcije majke.

**Tabela 30.** Rezultati prenatalne dijagnostike KT u odnosu na vreme infekcije trudnica u odnosu na koncepciju

R. br.	Materijal	Direktna dijagnostika			Indirektna dijagnostika		Vreme infekcije trudnice
		qPCR (Ct)	Broj parazita/ml	BO	IgM*	IgA*	
1	PV	NR		Poz	0	NR	moguća perikonc.
2	PV	Poz (35,39)	31	Neg	0	NR	moguća perikonc.
3	PV	NR		Poz	0	NR	moguća perikonc.
4	PV	NR		Poz	0	NR	moguća perikonc.
5	PV	Poz (34,30)	74	Neg	0	8	II trim.
6	PV	Poz (35,30)	34	Poz	0	NR	perikonc.
7	PV	Neg		Poz	0	11	perikonc.
8	PV	Poz (31,67)	588	Poz	0	4	moguća perikonc.
9	FK	Neg		Poz	11	12	II trim.

\*IgM odnosno IgA antitela detektovana su specifičnim ISAgA testom

Poz = pozitivan; Neg = negativan; NR = nije rađen

Kao što se iz gornje tabele vidi, infekcija ploda ustanovljena kod dve trudnice inficirane u II trimestru trudnoće, i, zanimljivo, kod sedam trudnica sa perikonceptualnom infekcijom (i to kod dve sa dokazanom a kod pet sa suspektom).

Ishod prenatalne dijagnostike KT procenjivan je kod inficiranih trudnica ne samo u odnosu na vreme infekcije majke već i u odnosu na primenu i dužinu terapije spiramicinom do izvršene amnio-/kordocenteze. Rezultati ove analize predstavljeni su u Tabeli 31.



**Tabela 31.** Ishod prenatalne dijagnostike KT u odnosu na dužinu terapije spiramicinom do amnio-/kordocenteze prema vremenu infekcije majke

Dužina terapije spiramicinom do amnio-/kordocenteze	Infic. trudnice (n)	Prenat. Dg KT n (%)	Vreme infekcije u odnosu na koncepciju (n)	Metod prenatalne potvrde KT (n)			
				qPCR primenjen			qPCR nije primenjen
				Samo qPCR Poz	Samo BO Poz	qPCR & BO Poz	Poz BO
<b>bez terapije</b>	25	6 (24%)	moguća perikonc. (3) perikonc. (1) II trim. (2)	2	2*	1	1
<b>1 mesec</b>	8	1 (12,5%)	moguća perikonc. (1)	/	/	1	/
<b>2 meseca</b>	4	2 (50%)	moguća perikonc. (1) perikonc. (1)	/	/	/	2

\*Jedan od dva uzorka u kojima je qPCR bio negativan je FK

Statističkom analizom rezultata (*Fisher*-ovim testom) ustanovljeno je da nema statistički značajne razlike u odnosu na dužinu terapije spiramicinom i ishod prenatalne dijagnostike ( $p=0,345$ ).

#### 4.1.2.2. Prenatalna dijagnostika KT dopunjena postnatalnim ispitivanjem

U ovoj grupi analizirani su rezultati dobijeni primenom metoda molekularne u odnosu na ostale metode prenatalne dijagnostike KT u grupi od 39 novorođenčadi čije su majke (ukupno 37; dve trudnoće bile su blizanačke) testirane na toksoplazmozu u trudnoći.

Iako je dijagnostika infekcije ploda predložena u svim slučajevima dokazane infekcije u trudnoći i perikonceptualnom periodu, kao i u slučajevima moguće perikonceptualne infekcije, svega 22 trudnice su se odazvale. Kako je kod jedne od 37 trudnica utvrđen status infekcije koji ne ugrožava ishod trudnoće (davnašnja, latentna infekcija), od 36 preostalih pacijentkinja 22 (61%) su podvrgnute prenatalnoj dijagnostici KT. Distribucija materijala korišćenog za prenatalnu dijagnostiku KT predstavljena je u Tabeli 32.

**Tabela 32.** Materijal korišćen za prenatalnu dijagnostiku KT

Materijal	Broj trudnica	Broj uzoraka
PV	21	22*
FK	1	1

\* Blizanačka trudnoća

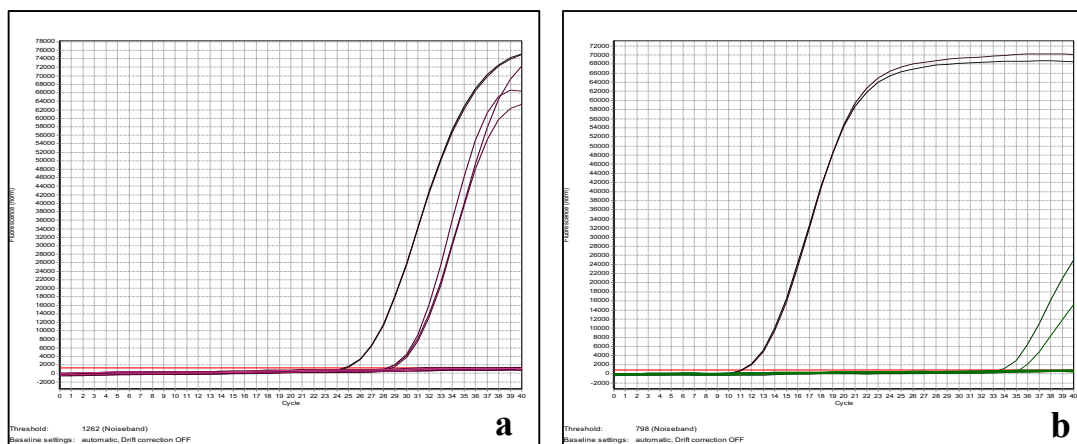
**4.1.2.2.1. Rezultati qPCR analize**

Od ukupno 23 uzorka bioloških materijala od 22 trudnice, molekularna dijagnostika KT sprovedena je u 20 uzoraka plodovih voda (20/23, 87%). Tri uzorka prikupljena su u periodu pre uspostavljanja molekularne dijagnostike u NRLT. Rezultati qPCR analize uzoraka plodovih voda prikazani su u Tabeli 33.

**Tabela 33.** Rezultati qPCR analize uzoraka u sklopu prenatalne dijagnostike KT

qPCR (n=20)	PV	%
POZITIVAN	7	35
NEGATIVAN	13	65

Reprezentivni pozitivni rezultati qPCR analize uzoraka plodove vode prikupljenih u cilju prenatalne dijagnostike KT prikazani su na Slici 8.



**Slika 8.** Prikaz reprezentivnih rezultata qPCR analize uzoraka plodove vode  
a) visoko pozitivan nalaz b) nisko pozitivan nalaz

4.1.2.2.2. *Rezultati bioloških oglada*

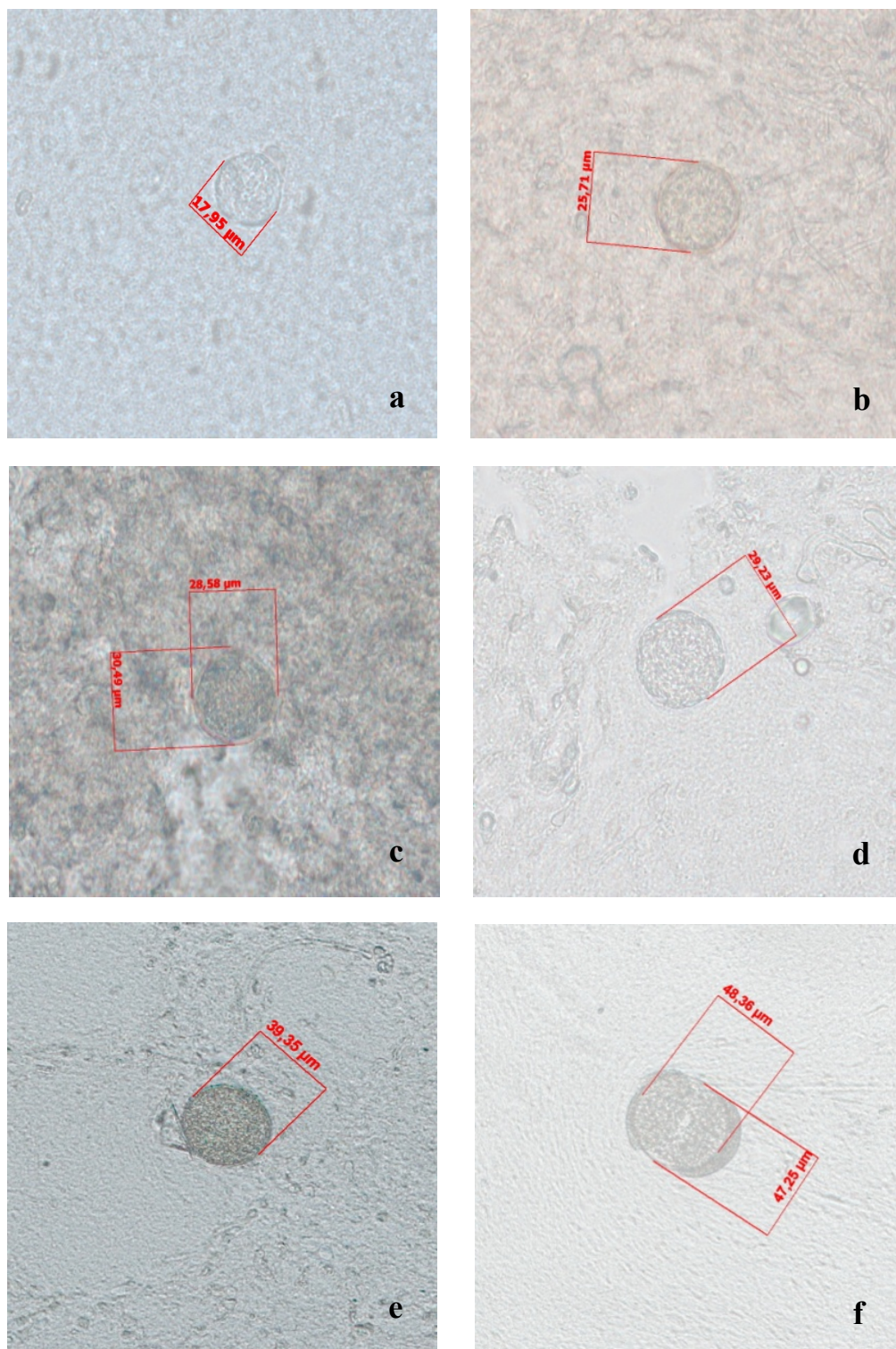
Deo materijala prikupljenog za dijagnostiku fetalne infekcije u svih 23 slučajeva inokulisan je u miševe a rezultati su predstavljeni u Tabeli 34.

**Tabela 34.** Rezultati bioloških oglada postavljenih iz prenatalno prikupljenog materijala

BO	Materijal analiziran pomoću qPCR		Materijal nije analiziran pomoću qPCR		Ukupno	
	PV	FK	PV	FK	PV	FK
POZITIVAN	2*	0	1	0	3	0
NEGATIVAN	18	0	1	1	19	1
<b>Ukupno</b>	<b>20</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>22</b>	<b>1</b>

\*U oba slučaja i qPCR je bio pozitivan

Reprezentativne ciste *T. gondii* iz bioloških oglada kojima je potvrđena dijagnoza KT prikazane su na Slici 9.



**Slika 9.** Reprezentativni prikaz cista *T. gondii* iz pozitivnih bioloških ogleda u sklopu prenatalne a), c), f), odnosno postnatalne b), d), e) dijagnostike KT

**4.1.2.2.3. Uporedni rezultati direktne parazitološke dijagnostike**

Metodama direktne dijagnostike primenjenim u prenatalnom periodu, infekcija ploda u ovoj grupi utvrđena je u osam slučajeva (Tabela 35).

**Tabela 35.** Uporedni rezultati direktnih metoda prenatalne dijagnostike KT u ovoj grupi

Metod prenatalne potvrde KT	Materijal analiziran pomoću qPCR	Materijal nije analiziran pomoću qPCR	KT n (%)
	PV	PV	
Samo qPCR	5	/	5 (62,5%)
Samo BO	/	1	1 (12,5%)
qPCR & BO	2	/	2 (25,0%)
<b>Ukupno</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>8</b>

**4.1.2.2.4. Rezultati detekcije specifičnih IgM i IgA antitela**

IgM antitela specifična za *T. gondii* određivana su u svim uzorcima iz kojih je rađena prenatalna dijagnostika KT ali su u značajnoj koncentraciji (ISAgA indeks  $\geq 3$ ) detektovana u samo 2/23 (8,7%) slučajeva i to u uzorcima plodove vode. U jednom slučaju, serološkim praćenjem deteta nakon rođenja potvrđena je kontaminacija antitelima iz majčine krvi prilikom amniocenteze (hemoragičan uzorak) dok je u drugom slučaju dijagnoza KT potvrđena qPCR analizom.

Specifična IgA antitela određena su u svega osam uzoraka korišćenih za prenatalnu dijagnostiku KT ali su detektovana u čak četiri slučaja i to u sva četiri u uzorcima plodove vode (Tabela 36).

**Tabela 36.** Prikaz slučajeva detektabilnih specifičnih IgA antitela u uzorcima za prenatalnu dijagnostiku KT

Redni broj uzorka	Nalaz u PV		Nalaz u serumu majke		Direktna dijagnostika		Dijagnoza KT
	IgA	IgM	IgA	IgM	qPCR	BO	
PV1	12	0	12	12	Poz	Neg	DA
PV2	3	0	12	12	Neg	Neg	NE
PV3	10	0	12	12	Neg	Neg	NE
PV4	9	0	12	12	Neg	Neg	NE

Poz = pozitivan; Neg = negativan

Ishod prenatalne dijagnostike KT procenjivan je ne samo u odnosu na vreme infekcije majke već i u odnosu na primenu i dužinu terapije spiramicinom do izvršene amnio-/kordocenteze. Rezultati ove analize predstavljeni su u Tabeli 37.

**Tabela 37.** Ishod prenatalne dijagnostike KT u odnosu na dužinu terapije spiramicinom do amnio-/kordocenteze i u odnosu na vreme infekcije majke

Dužina terapije spiramicinom do amniocenteze	Trudnice (n)	Prenat. Dg KT n (%)	Vreme infekcije u odnosu na koncepciju (n)	Metod prenatalne potvrde KT (n)			
				qPCR primenjen			qPCR nije primenjen
				Samo qPCR Poz	Samo BO Poz	qPCR & BO Poz	Poz BO
<b>bez terapije</b>	13	4 (30,8%)	moguća perikonc. (2) perikonc. (1) II trim. (1)	3	/	1	/
<b>1 mesec</b>	3	2 (66,7%)	perikonc. (2)	1	/	1	/
<b>2 meseca</b>	6	2 (33,3%)	moguća perikonc. (1) perikonc. (1)	1	/	/	1

Statističkom analizom (*Fisher*-ovim testom) ustanovljeno je da nema statistički značajne razlike u odnosu na dužinu terapije spiramicinom i ishod prenatalne dijagnostike ( $p=0,685$ ).

### 4.1.3. Poređenje qPCR sa konvencionalnim metodama postnatalne dijagnostike KT

#### 4.1.3.1. Novorođenčad čije su majke ispitivane na toksoplazmozu u trudnoći

Prenatalna dijagnostika KT sprovedena je kod 22 trudnice u okviru ove grupe (22/37; 60%) ali je u neonatalnom periodu preduzeta kod sve (ukupno 39) dece rođene iz 37 trudnoća u kojima je primarna infekcija majke bila visoko suspektna ili dokazana. U osam slučajeva dijagnoza je postavljena i pre rođenja deteta, tako da je analizom neonatalne krvi mogla biti samo potvrđena, dok je u tri slučaja u kojima prenatalna dijagnostika nije sprovedena, dijagnoza KT postavljena na rođenju (u jednom) odnosno u ranom neonatalnom periodu (u dva slučaja).

##### 4.1.3.1.1. Uporedni rezultati direktne parazitološke dijagnostike

U sva tri slučaja u kojima je KT dijagnostikovana postnatalno, dijagnoza je postavljena qPCR-om (Tabela 38). Kod jednog novorođenčeta molekularna dijagnoza potkrepljena je pozitivnim biološkim ogledom iz neonatalne krvi, WB testom i detekcijom specifičnih IgA antitela (indeks 5), kod drugog pozitivnim biološkim ogledom i WB testom a kod trećeg novorođenčeta je sam rezultat qPCR analize predstavljao okosnicu dijagnoze KT.

**Tabela 38.** Uporedni prikaz rezultata direktne dijagnostike KT u neonatalnom periodu

Metod potvrde KT (n=3)	NK n (%)
Samo qPCR	1 (33,33%)
Samo BO	0
qPCR & BO	2 (66,67%)

**4.1.3.1.2. Rezultati detekcije specifičnih IgM i IgA antitela**

Specifična IgM antitela određivana su na rođenju kod svih 39 novorođenčadi, a kasnije u određenim vremenskim intervalima, i to kod inficirane dece shodno kalendaru seroloških kontrola a kod ostalih do potpune seronegativizacije, odnosno eliminacije antitela specifičnih za *T. gondii*.

Na rođenju su specifična IgM antitela (indeks  $\geq 3$ ) detektovana u dva od 39 (5,1%) slučajeva ali je serološkim praćenjem utvrđeno da je u jednom od slučajeva uzrok prisustva IgM specifičnih za *T. gondii* u neonatalnom uzorku kontaminacija majčinim antitelima. Kasnija pojava specifičnih IgM antitela zabeležena je kod dva novorođenčeta, i to - u jednom slučaju u uzrastu od pet meseci kao odraz loše komplijanse sa terapijom (dijagnoza KT postavljena na rođenju) i u drugom u uzrastu od 15 meseci kao posledica serološkog *rebounda*-a nakon jednogodišnje terapije (dijagnoza KT postavljena prenatalno).

Za razliku od specifičnih IgM, specifična IgA antitela određena su kod 25 od 39 (64%) novorođenčadi a u značajnoj koncentraciji (ISAgA indeks  $\geq 3$ ) detektovana kod osam novorođenčadi (Tabela 39).

**Tabela 39.** Uporedni nalaz specifičnih IgA i IgM antitela majke i novorođenčeta i korelacija sa dijagnozom KT

Redni br. novorođenčeta	Nalaz kod majke na porođaju		Nalaz kod novorođenčeta		KT	Metod potvrde KT (materijal)
	IgA	IgM	IgA	IgM		
1	5	12	3	0	NE*	/
2	11	12	4	0	DA	qPCR & BO (PV)
3	6	9	4	5	DA	qPCR (PV)
4	11	12	5	0	DA	qPCR & BO (PV)
5	11	12	5	0	DA	qPCR & BO (NK)
6	12	10	12	0	NE*	/
7	12	12	12	8	NE*	/
8	12	12	12	0	DA	qPCR & IgA (PV)

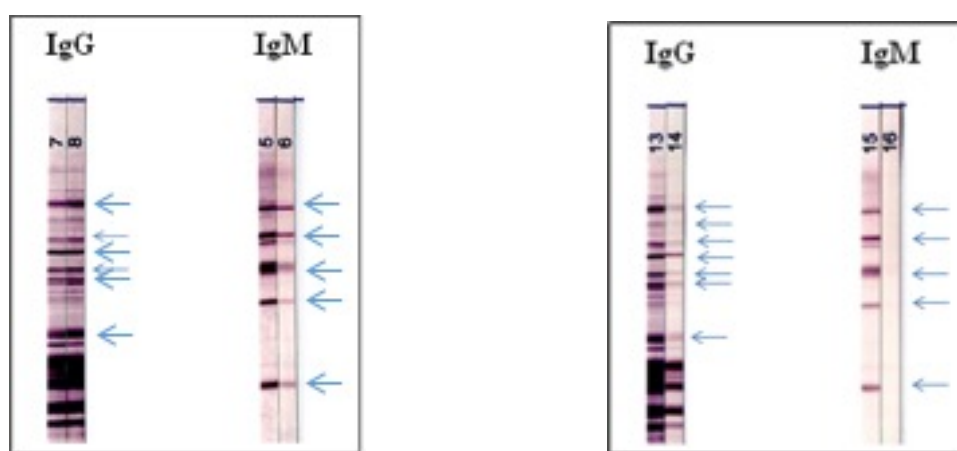
\*Kontaminacija majčinim antitelima



**4.1.3.1.3. Rezultati poređenja imunoloških profila majke i novorođenčeta WB testom**

Poređenje IgG i IgM profila majke i deteta WB testom izvršeno je u 31 od 39 (79,5% slučajeva). Pozitivan ishod testa (neosinteza IgG/IgM antitela kod neonatusa) zabeležen je u četiri slučaja (sve kongenitalno inficirana novorođenčad, Tabela 40) dok je bilo pet slučajeva u kojima je dijagnoza KT postavljena metodama direktne dijagnostike kod kojih je WB test bio negativan.

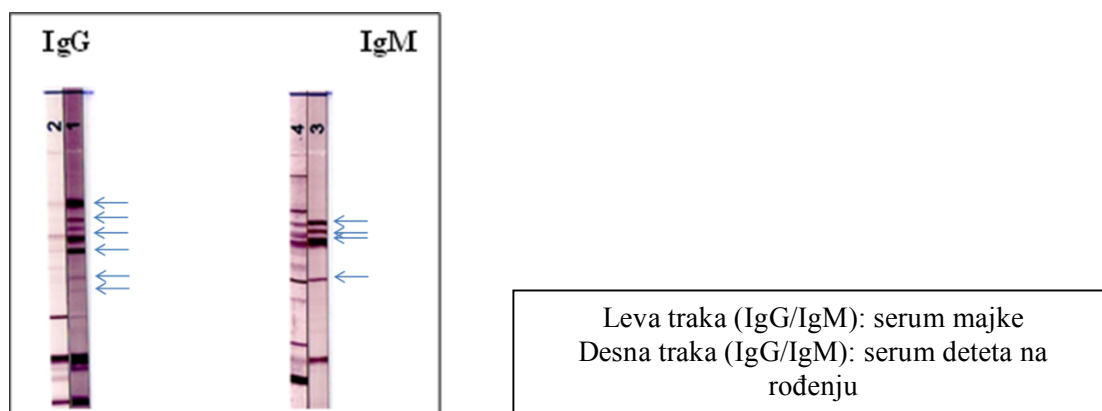
Reprezentativni rezultati WB testa u sklopu dijagnostike KT prikazani su na Slici 10 i na Slici 11.



a) Leva traka (IgG/IgM): serum majke  
Desna traka (IgG/IgM): serum deteta na rođenju

b) Leva traka (IgG/IgM): serum na rođenju  
Desna traka (IgG/IgM): serum deteta nakon 2 nedelje

**Slika 10.** Prikaz rezultata WB testa u slučaju kontaminacije neonatalnog seruma IgM antitelima majke prilikom porođaja: a) antitela prisutna u obe klase u serumu deteta na rođenju (traka desno) identične su molekulske težine (istovetni bendovi) kao ona u serumu majke; b) rezultat testa izvedenog 2 nedelje kasnije pokazuje slabljenje intenziteta obojenosti bendova u IgG klasi a potpuno odsustvo specifičnih IgM bendova



**Slika 11.** Prikaz rezultata WB testa u slučaju fetalne neosinteze antitela detektabilne na rođenju u obe klase (’’novi’’ bendovi označeni strelicama)

Sumiranjem rezultata prenatalne i postnatalne dijagnostike, kongenitalna infekcija je u ovoj grupi detektovana u 11 slučajeva – osam je dijagnostikovano prenatalno a tri nakon rođenja (Tabela 40).

**Tabela 40.** Korelacija nalaza molekularnim i/ili konvencionalnim metodama pre-/postnatalno dijagnostikovane KT sa vremenom infekcije majke u odnosu na koncepciju

R. br	Prenatalna dijagnostika (PV)					Postnatalna dijagnostika (NK)						Vreme infekcije majke
	Molekularna		Konvencionalna			Molekularna		Konvencionalna				
	qPCR (Ct)	Br. paraz. /ml	BO	IgM	IgA	qPCR (Ct)	Br. paraz. /ml	BO	WB	IgM	IgA	
1	Poz (36,96)	9	Neg	3	NR	Poz (38,92)	< 1	/	NR	0	0	perikonc.
2	NR		Poz	0	NR	NR		Poz	NR	0	0	moguća perikonc.
3	Poz (36,72)	11	Poz	0	NR	NR		NR	Neg	0	4	perikonc.
4	Poz (34,60)	58	Neg	0	NR	Neg		Poz	Poz	5	4	perikonc.
5	Poz (35,76)	23	Neg	0	12	Neg		Neg	Neg	0	12	perikonc.
6	Poz (37,01)	13	Neg	0	0	Neg		Neg	Neg	0	0	moguća perikonc.
7	Poz (36,48)	8	Neg	0	NR	NR		NR	Neg	0	0	moguća perikonc.
8	Poz (29,96)	844	Poz	0	0	Neg		Poz	Poz	0	5	II trim.
9	/					Poz (34,45)	24	Poz	Poz	0	0	perikonc.
10	/					Poz (36,86)	4	Poz	Poz	0	5	III trim.
11	/					Poz (36,63)	4	Neg	Neg	0	0	perikonc.

\*IgM odnosno IgA antitela detektovana su specifičnim ISAgA testom  
 Poz = pozitivan; Neg = negativan; NR = nije raden

#### 4.1.3.2. Novorođenčad čije majke nisu ispitivane na toksoplazmozu u trudnoći

Uzorci neonatalne krvi ukupno 16 novorođenčadi sa specifičnim kliničkim manifestacijama koje su ukazivale na moguću *in utero* infekciju *T. gondii* (morfološke i funkcionalne malformacije CNS-a, promene na očnom dnu) kao i novorođenčadi sa nespecifičnom infektivnom simptomatologijom sa/bez zastoja u intrauterusnom razvoju analizirani su u NRLT u prvih mesec dana po rođenju.

Kako je komparativna analiza u odnosu na uzorak majčinog seruma (zbog prisustva transmitovanih antitela u neonatalnom serumu) neophodan preduslov za uspešnu dijagnostiku KT, prikupljeni su i odgovarajući uzorci periferne krvi porodilja. Majke novorođenčadi iz ove grupe tom prilikom su prvi put testirane na toksoplazmozu što je rezultiralo podacima o statusu infekcije žena nakon porođaja, a potom i (približnim) određivanjem vremena infekcije u odnosu na začeće, shodno unapred određenim kriterijumima (Tabela 41 i Tabela 42).

**Tabela 41.** Status infekcije *T. gondii* određen prilikom inicijalnog ispitivanja porodilja u NRLT

Dijagnostički kriterijumi					Status infekcije <i>T. gondii</i>	Broj porodilja (n= 16)	%
HSDA	TXG	IgM-ISAgA	TXM	TXGA			
Neg	Neg	Neg	Neg	/	Neimunizovane	2	12,50
Poz	Poz	Poz	Poz	Niz	Akutna	3	18,75
Poz	Poz	Poz	Neg	Vis	Subakutna	2	12,50
Poz	Poz	Poz/Gran	Gran	Niz			
Poz	Poz	Poz	Poz	Vis			
Poz	Poz	Neg	Neg	Vis	Hronična	9	56,25

Poz = pozitivan; Neg = negativan; Gran = graničan; Vis = visok; Niz = nizak;

Kod 14 porodilja kod kojih je na osnovu rezultata serološkog ispitivanja ustanovljena, infekcija *T. gondii* je vremenski pozicionirana u odnosu na začeće primenom kriterijuma predstavljenim u Tabeli 42.

**Tabela 42.** Kriterijumi za (približno) određivanje vremena infekcije porodilja u odnosu na koncepciju

Status infekcije	Vreme infekcije u odnosu na koncepciju	Broj porodilja (n= 14)	%
Hronična (IgM negativna, TXGA $\geq 0,600$ )	Latentna infekcija	3	21,43
Hronična (IgM negativna, TXGA 0,300-0,600)	> 6 meseci od porođaja (moguća perikonc.)	6	42,86
Subakutna	II trimestar	2	14,28
Akutna	III trimestar	3	21,43

#### 4.1.3.2.1. Rezultati qPCR analize

Od ukupno 16 novorođenčadi u ovoj grupi, qPCR je primenjen u dijagnostici KT kod 13 (Tabela 43).

**Tabela 43.** Rezultati qPCR analize uzoraka neonatalne krvi (NK)

qPCR	NK
POZITIVAN	2
NEGATIVAN	11

#### 4.1.3.2.2. Rezultati bioloških oglada

Deo materijala prikupljenog za dijagnostiku infekcije novorođenčadi u četiri slučaja inokulisan je u miševе a rezultati su predstavljeni u Tabeli 44.

**Tabela 44.** Rezultati bioloških oglada postavljenih iz postnatalno prikupljenog materijala

BO	NK
POZITIVAN	2
NEGATIVAN	2

#### 4.1.3.2.3. *Uporedni rezultati direktne parazitološke dijagnostike*

Metodama direktne dijagnostike primenjenim u postnatalnom periodu, infekcija ploda je utvrđena u 3 slučaja (Tabela 45).

**Tabela 45.** Direktnim metodama dijagnostikovane KT u ovoj grupi ispitanika

Metoda potvrde KT	NK	%
Samo qPCR	1	33,33
Samo BO	1	33,33
qPCR & BO	1	33,33

#### 4.1.3.2.4. *Rezultati detekcije specifičnih IgM i IgA antitela*

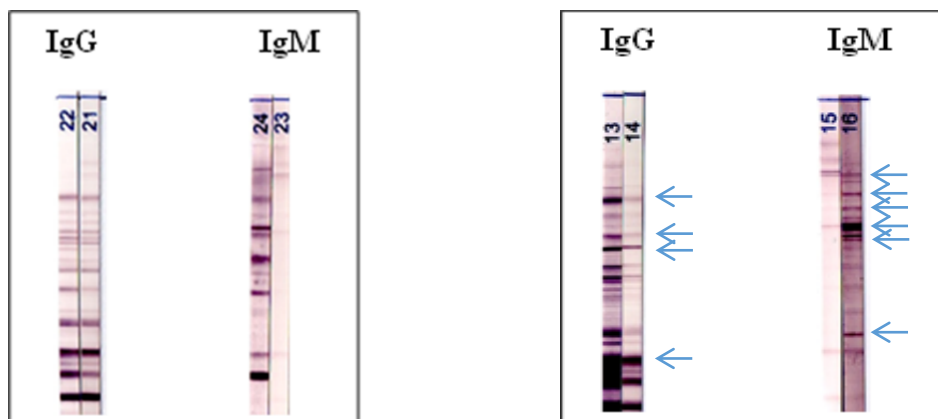
Specifična IgM antitela određivana su kod svih 16 novorođenčadi a kod pet su detektovana u značajnoj koncentraciji (ISAgA indeks  $\geq 3$ ). Kod svih pet novorođenčadi postavljena je dijagnoza KT.

Koncentracija IgA antitela specifičnih za *T. gondii* ispitivana je u uzorcima seruma devet od 16 (56,25%) novorođenčadi a značajna (indeks  $\geq 3$ ) je bila u pet. Od pet novorođenčadi sa detektabilnim IgA antitelima, KT ustanovljena je kod 4/5 (80%), dok je kod jednog serološkim praćenjem isključena dijagnoza KT (analiza novog uzorka u razmaku od 2-3 nedelje ukazala je na odsustvo ne samo specifičnih IgA antitela već i drugih parametara infekcije, čime je indirektno potvrđeno da je u pitanju bila kontaminacija majčinim antitelima u toku porođaja).

#### 4.1.3.2.5. *Rezultati poređenja imunoloških profila majke i novorođenčeta WB testom*

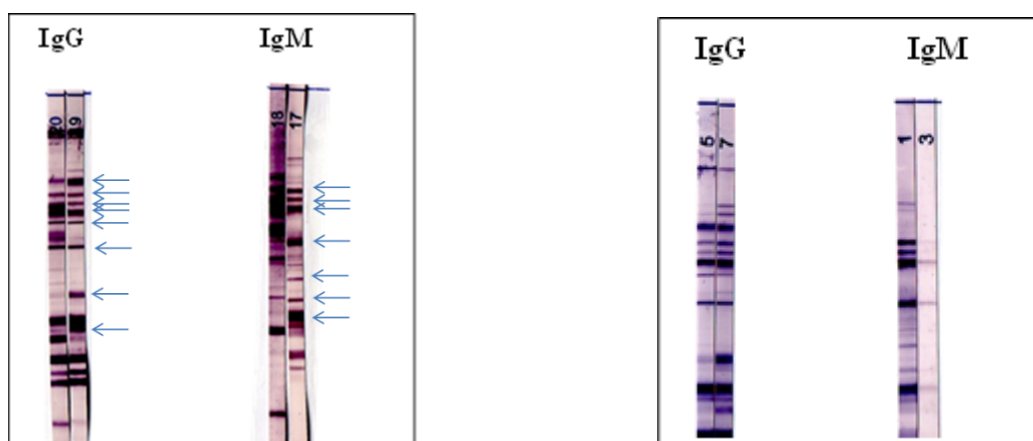
WB test je u cilju detekcije eventualne neosinteze specifičnih IgG i/ili IgM antitela, nalazom bendova prisutnih kod novorođenčeta a odsutnih kod majke, primenjen kod 10 od 16 (62,5%) novorođenčadi sa suspektom KT u ovoj grupi. Ishod WB testa koji je ukazivao na odsustvo neosinteze zabeležen je kod četiri novorođenčeta, u jednom slučaju nalaz je bio "inconclusive" (verovatno zbog visoke koncentracije nespecifičnih antitela u ispitivanom serumu novorođenčeta), a u pet slučajeva je bio pozitivan čime je u tim slučajevima potvrđena dijagnoza KT.

Reprezentativni rezultati WB testa u ovoj grupi ispitivanih novorođenčadi prikazani su na Slici 12 i na Slici 13.



a) Leva traka (IgG/IgM): serum majke Desna traka (IgG/IgM): serum deteta (3 ned)	b) Leva traka (IgG/IgM): serum deteta (3 ned) Desna traka (IgG/IgM): serum deteta (2 mes)
---	--

**Slika 12.** Reprerentivan prikaz rezultata WB testa u slučaju neonatalne neosinteze specifičnih antitela: a) odsustvo neosinteze u obe klase antitela u serumu novorođenčeta (infekcija majke u III trimestru, izolacija parazita biološkim ogledom iz krvi novorođenčeta uzrasta tri nedelje); b) rezultat testa izvedenog 1,5 mes. kasnije pokazuje neosintezu u obe klase antitela (bendovi koji ukazuju na neosintezu antitela obeleženi strelicama).



a) Leva traka (IgG/IgM): serum majke Desna traka (IgG/IgM): serum deteta (1 mes)	b) Leva traka (IgG/IgM): serum deteta (1 mes) Desna traka (IgG/IgM): serum deteta (2,5 mes)
---	--

**Slika 13.** Prikaz rezultata WB testa u slučaju fetalne/neonatalne neosinteze specifičnih antitela: a) Neosinteza detektovana u obe klase antitela u serumu deteta uzrasta mesec dana (infekcija majke u III trimestru, dijagnoza KT potvrđena pozitivnim qPCR iz istog uzorka) (bendovi koji ukazuju na neosintezu antitela obeleženi strelicama); b) rezultat testa izvedenog 1,5 mes. kasnije (nakon skoro dva meseca specifične terapije) pokazuje iščezavanje specifičnih bendova u IgM klasi

Rezultati direktne i indirektna dijagnostike u potvrđenim slučajevima KT u ovoj grupi novorođenčadi, kao i njihova korelacija sa kliničkom slikom i vremenom infekcije majke prikazani su u Tabeli 46.

**Tabela 46.** Korelacija pozitivnog ishoda postnatalne dijagnostike KT sa kliničkom slikom i vremenom infekcije majke u odnosu na koncepciju

R. br. KT (NK)	Direktna dijagnostika			Indirektna dijagnostika			Klinička slika	Vreme infekcije majke
	qPCR (Ct)	Br. parazita /ml	BO	WB	IgM	IgA		
1	Neg	/	Poz	Neg (3 ned) Poz (2 mes)	0 (3 ned) 4 (2 mes)	0	NIS*, IUZR**	III trim.
2	Poz (34,70)	20	Neg	Poz	12	12	NIS, IUZR	III trim.
3	NR	/	NR	Poz	12	12	Hidrocefalus	> 6 mes od P
4	Poz (37,26)	3	Poz	Poz	12	11	IUZR	III trim.
5	Neg	/	NR	Poz	3	4	Oštećenje CNS	> 6 mes od P

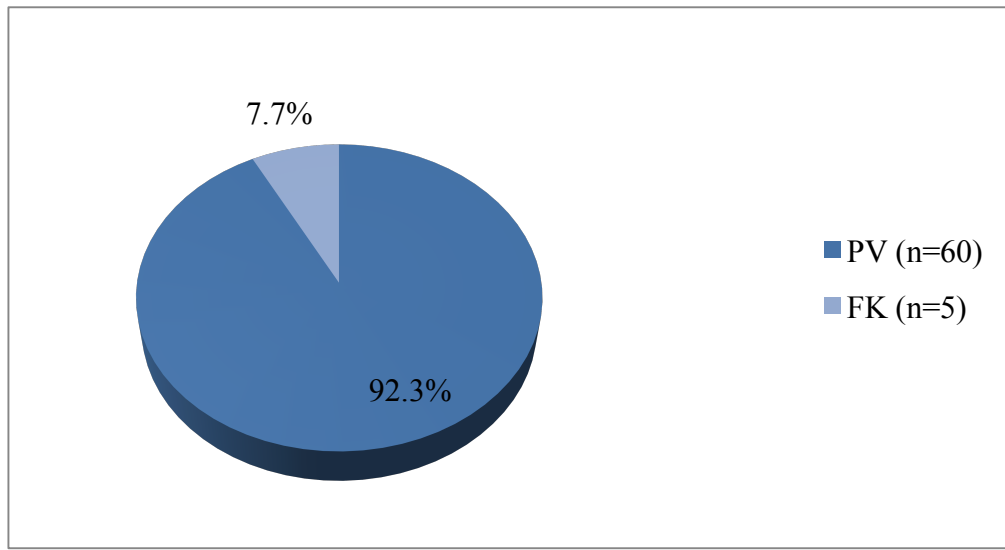
Poz=pozitivan; Neg=negativan; NR=nije rađen; P=porodaj

\*NIS=Nespecifična infektivna simptomatologija

\*\*IUZR=Intrauterusni zastoj rasta

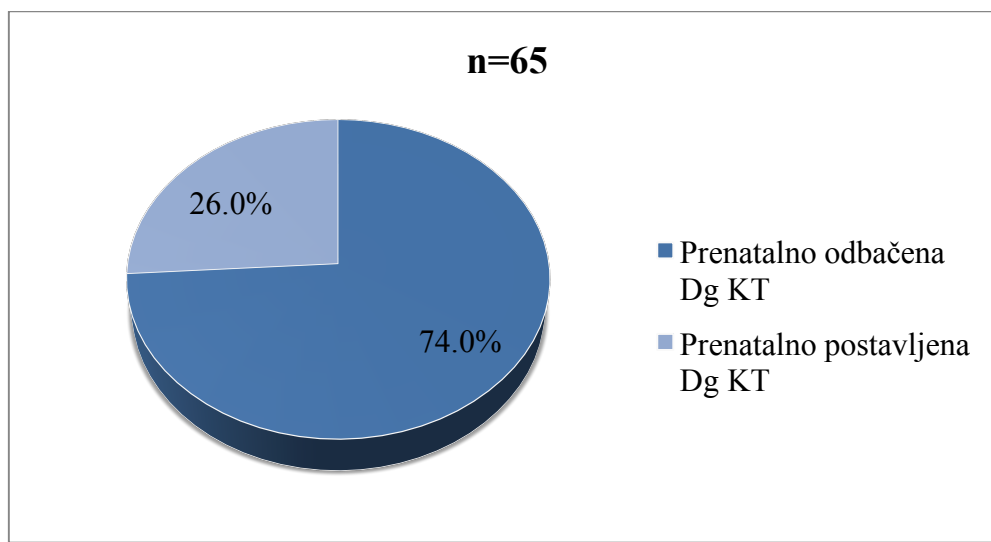
#### 4.1.4. Analiza sumiranih rezultata prenatalne dijagnostike kongenitalne toksoplazmoze

Prenatalna dijagnostika infekcije ploda preduzeta je kod 63 trudnice (78,75% od ukupno testiranih 80 trudnica). Kako su dve trudnoće bile blizanačke, prikupljeno je ukupno 65 uzoraka plodove vode i fetalne krvi (Grafikon 5).



**Grafikon 5.** Materijal korišćen za prenatalnu dijagnostiku KT

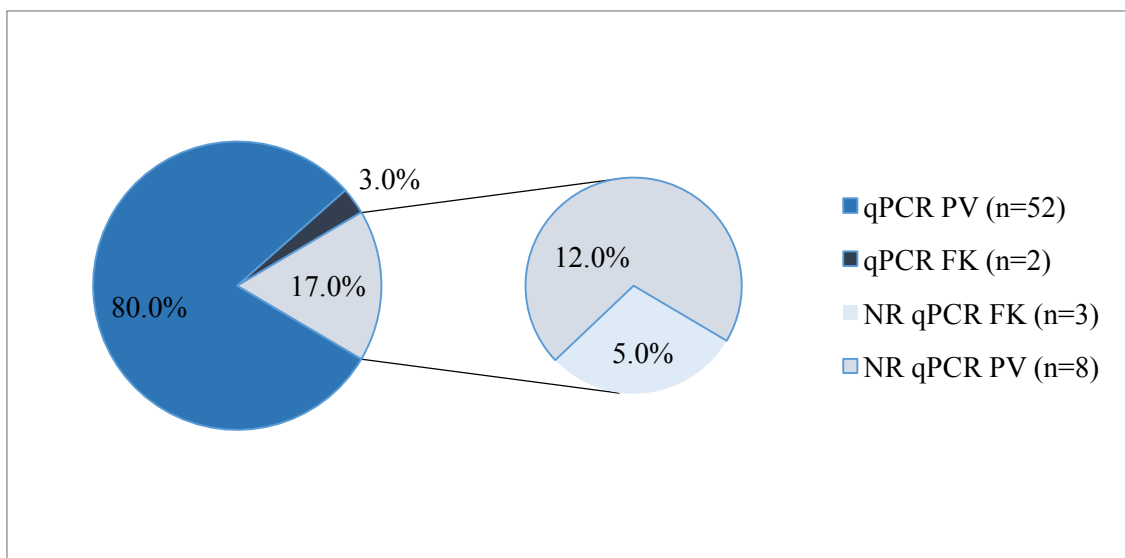
Dijagnoza KT postavljena je, kombinovanom primenom metoda direktne i indirektne dijagnostike u prenatalnom periodu u 17 slučajeva od ukupno 65 pregledanih uzoraka (Grafikon 6).



**Grafikon 6.** Prevalenca KT u ispitivanoj grupi

Zastupljenost primenjenih molekularnih metoda u sklopu prenatalne dijagnostike KT predstavljena je Grafikonom 7.

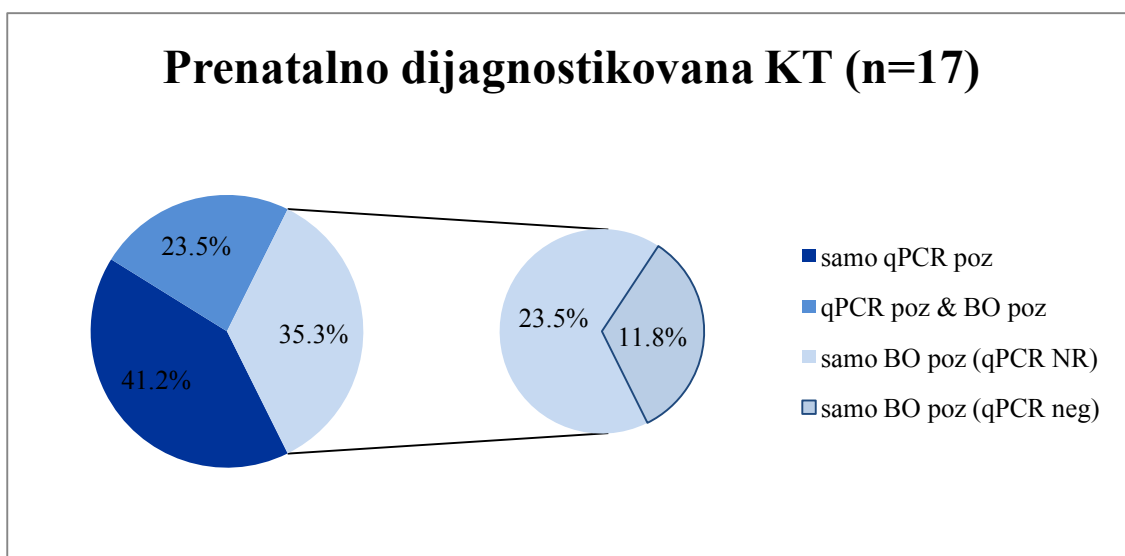




\*NR= nije rađen

**Grafikon 7.** Udeo urađenih qPCR u prenatalnoj dijagnostici KT iz uzoraka PV i FK

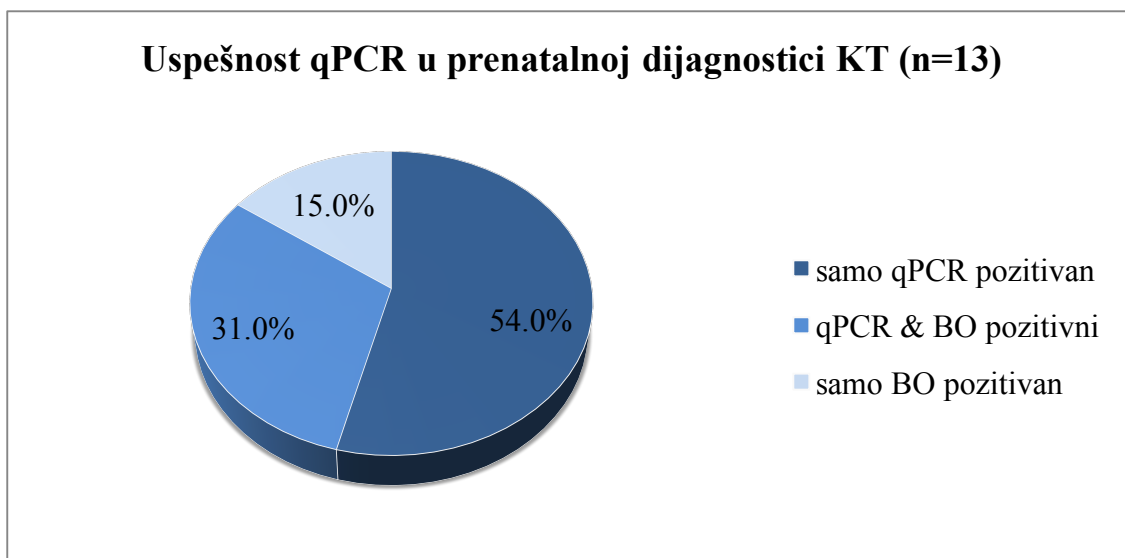
Doprinos primene qPCR i biološkog ogleda u svih 17 slučajeva prenatalno dijagnostikovane KT predstavljen je na Grafikonu 8.



Poz=pozitivan; neg=negativan; NR=nije rađen

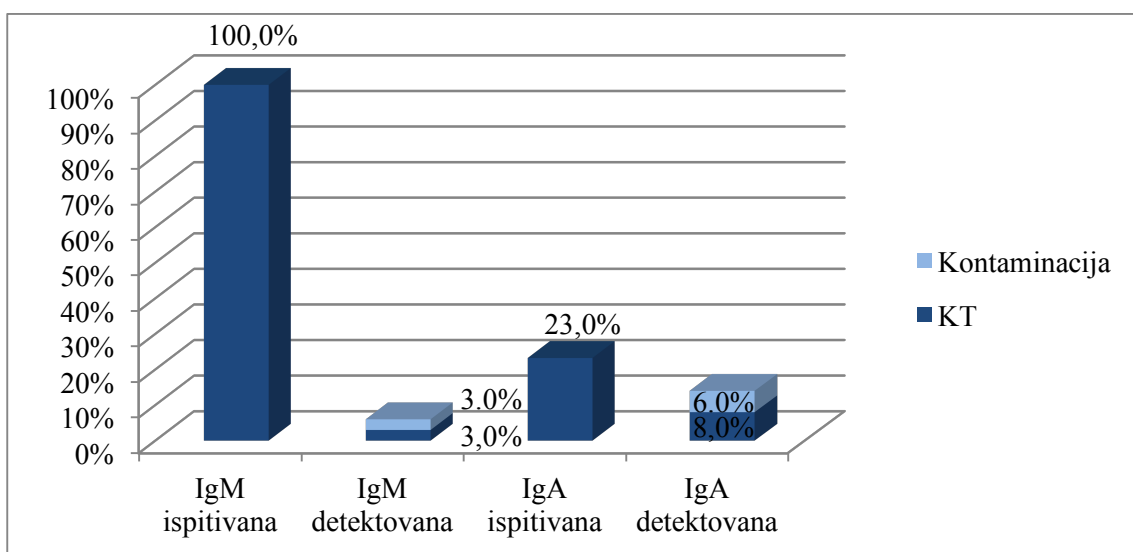
**Grafikon 8.** Uspešnost metoda direktne dijagnostike KT (qPCR i BO) u prenatalnom periodu

Uspešnost qPCR u prenatalnoj identifikaciji kongenitalno inficiranih fetusa u odnosu na biološki ogled predstavljena je Grafikonom 9.



**Grafikon 9.** Uspešnost qPCR u odnosu na BO u prenatalnoj dijagnostici KT

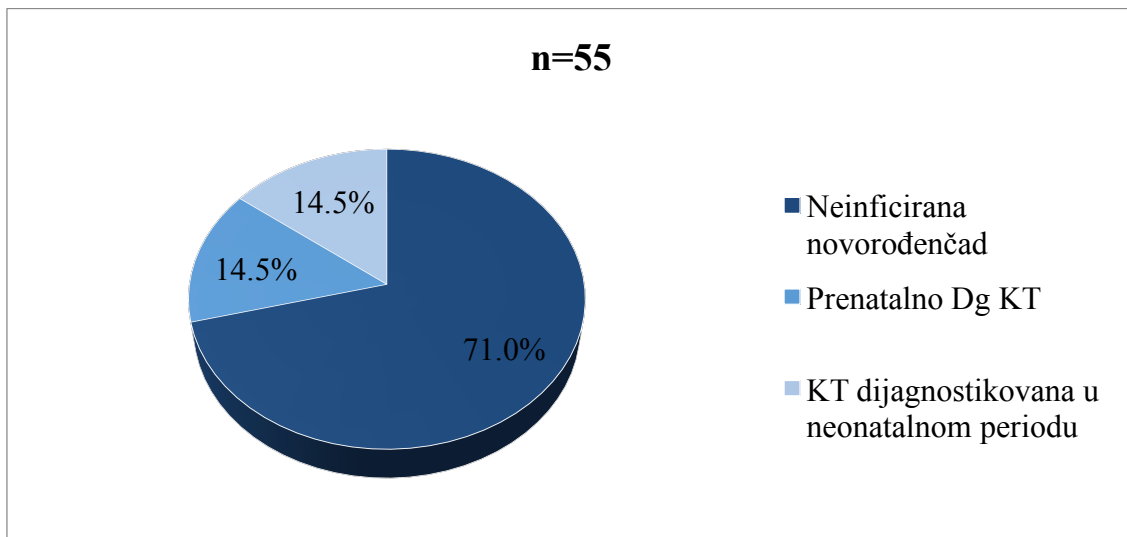
Zastupljenost specifičnih IgM i IgA antitela u uzorcima prikupljenim u cilju prenatalne dijagnostike KT, kao i dijagnostički doprinos IgM-, odnosno IgA-ISAgA testa u prenatalnom periodu, predstavljeni su na Grafikonu 10.



**Grafikon 10.** Doprinos detekcije specifičnih IgM i IgA antitela prenatalnoj dijagnostici KT (n=65)

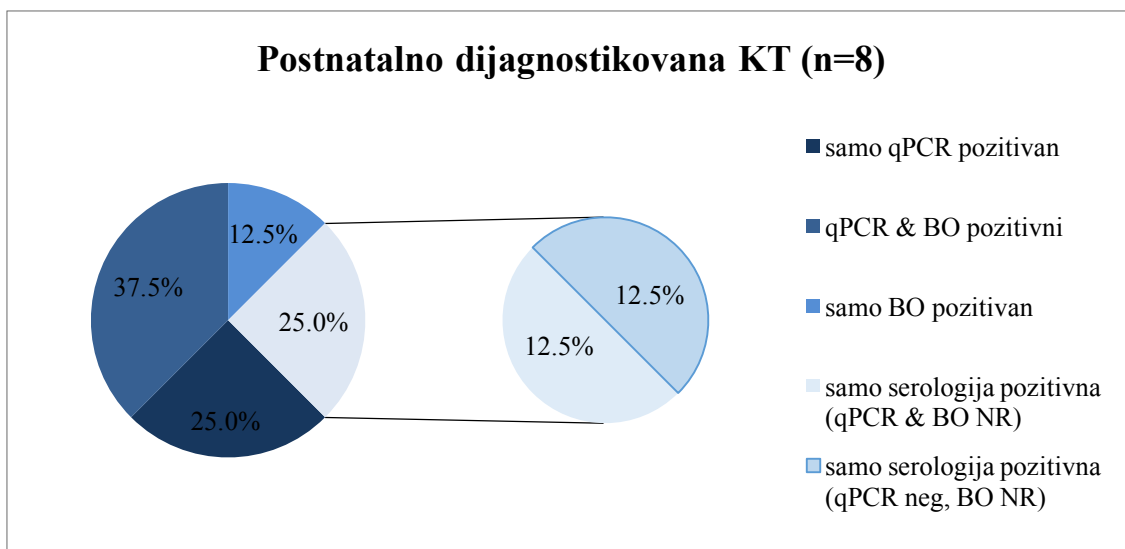
#### 4.1.5. Analiza sumiranih rezultata dijagnostike kongenitalne toksoplazmoze u postnatalnom periodu

Ovim delom analize obuhvaćeno je 55 novorođenčadi (grupa 4.1.3.1. i grupa 4.1.3.2.). Kod dela novorođenčadi iz grupe 4.1.3.1. (majke praćene u trudnoći) dijagnostika KT obavljena je u prenatalnom (23/39, 59%) a u postnatalnom periodu kod svih 39. Kod 16 novorođenčadi (grupa 4.1.3.2., majke inicijalno ispitane u NRLT nakon porođaja) je KT dijagnostikovana samo postnatalno. Samim tim, jedan deo novorođenčadi došao je na svet sa dijagnozom KT postavljenom pre rođenja (n=8) dok je kod drugog dela novorođenčadi (dijagnoza postavljena tek po rođenju (n=8)) (Grafikon 11).



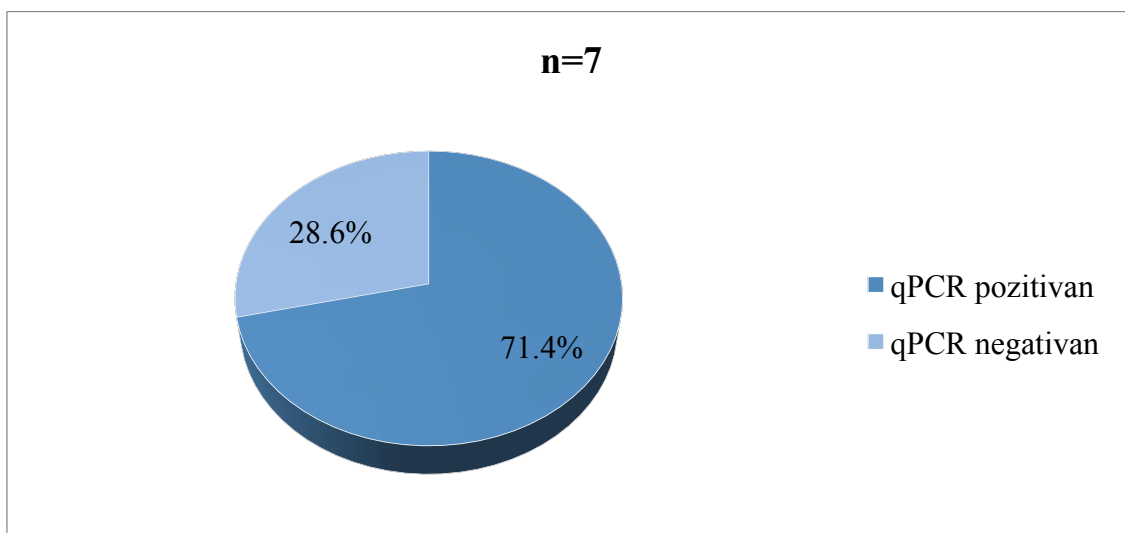
**Grafikon 11.** Odnos postavljene i odbačene dijagnoze KT u prenatalnom i neonatalnom periodu

Analiziran je i pojedinačni doprinos metoda primenjenih u dijagnostici KT nakon rođenja deteta, kako direktnih, tako i indirektnih (Grafikon 12).

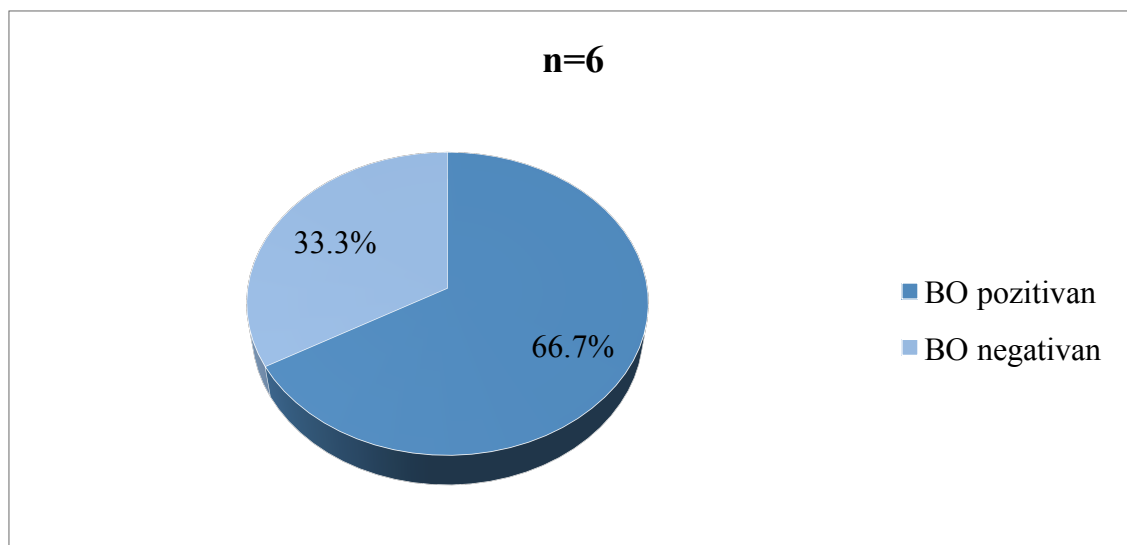


**Grafikon 12.** Uspešnost metoda dijagnostike KT u neonatalnom periodu

Posebno je procenjivana uspešnost primene qPCR a posebno biološkog oglada u dijagnostici KT korišćenjem uzoraka periferne krvi novorođenčadi (Grafikon 13 i Grafikon 14).

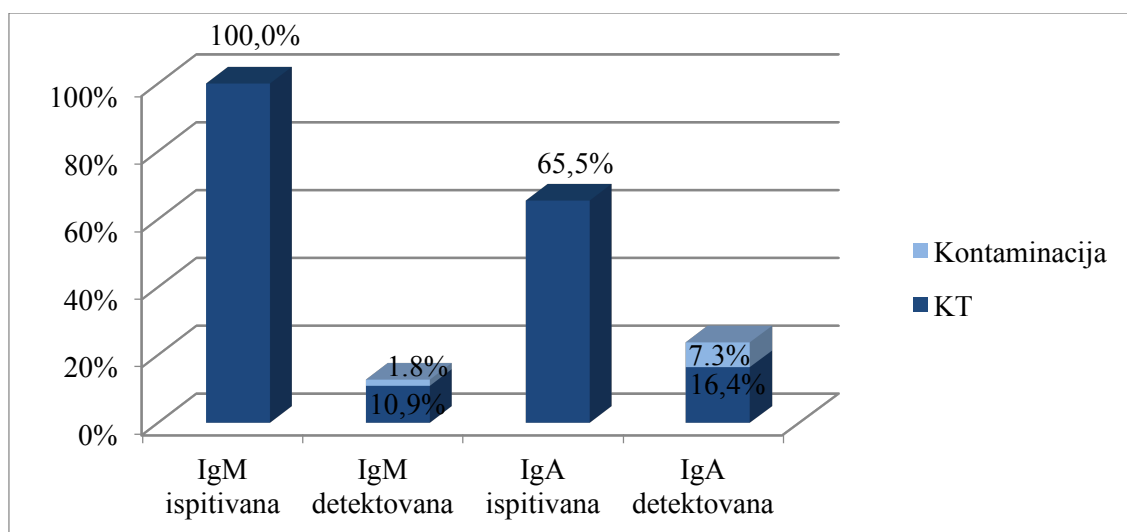


**Grafikon 13.** Uspešnost qPCR u dijagnostici KT u neonatalnom periodu (n=7, kongenitalno inficirana novorođenčad kod koje je primenjen qPCR)



**Grafikon 14.** Uspešnost BO u dijagnostici KT u neonatalnom periodu (n=6, kongenitalno inficirana novorođenčad kod koje je primenjen biološki ogled)

Zastupljenost specifičnih IgM i IgA antitela u uzorcima neonatalnih seruma i njihov dijagnostički značaj prikazani su na Grafikonu 15.



**Grafikon 15.** Doprinos detekcije specifičnih IgM i IgA antitela u neonatalnoj dijagnostici KT (n=55)

Statističkom analizom određena je uspešnost detekcije specifičnih IgM (Tabela 47) odnosno IgA antitela (Tabela 48) ISAgA testom u neonatalnim uzorcima u sklopu dijagnostike KT.

**Tabela 47.** Uspešnost detekcije specifičnih IgM antitela u uzorcima neonatalne krvi ISAgA testom

		KT		
		+	-	Σ
IgM-ISAgA	+	6	1	7
	-	10	38	48
	Σ	16	39	55

Senzitivnost = 37,5%

Specifičnost = 97,4%

Stvarno slaganje = 80,0%

PPV = 85,7%

NPV = 79,2%

$\kappa = 0,419$  ( $p < 0,001$ )

**Tabela 48.** Uspešnost detekcije specifičnih IgA antitela u uzorcima neonatalne krvi ISAgA testom

		KT		
		+	-	Σ
IgA-ISAgA	+	9	4	13
	-	7	16	23
	Σ	16	20	36

Senzitivnost = 56,3%

Specifičnost = 80,0%

Stvarno slaganje = 69,4%

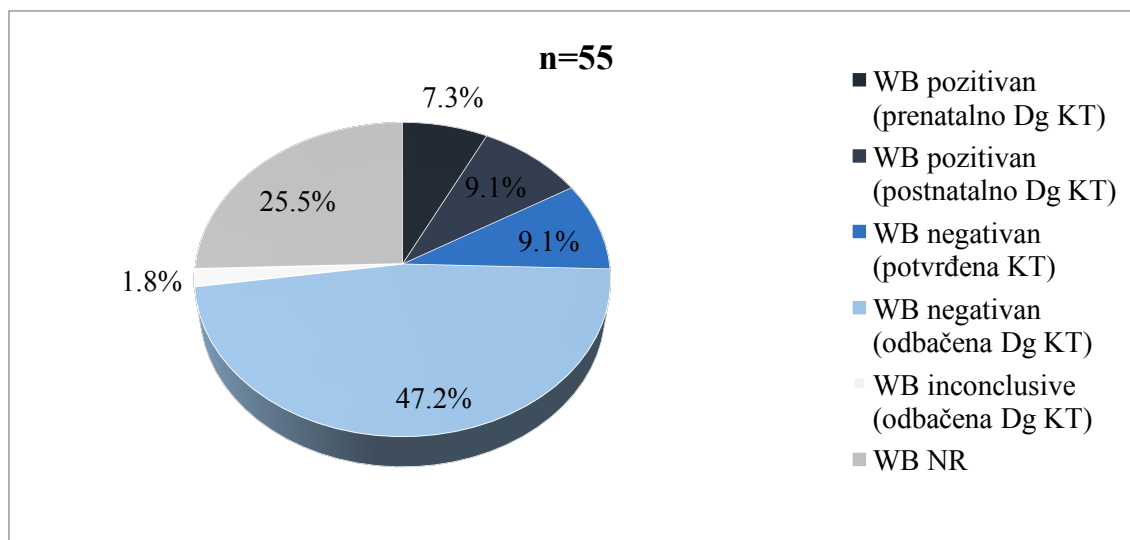
PPV = 69,2%

NPV = 69,6%

$\kappa = 0,369$  ( $p < 0,024$ )

IgA-ISAgA test (Tabela 48) pokazao je znatno višu osetljivost u odnosu na IgM-ISAgA test (Tabela 47), odnosno nalaz IgA antitela u neonatalnoj krvi mogao je ranije i u većem broju slučajeva da otkrije prisustvo infekcije. Osetljivost IgA-ISAgA testa praktično je bila jednaka osetljivosti WB testa (Tabela 49).

Zastupljenost i uspešnost WB testa u dijagnostici KT prikazane su na Grafikonu 16.



**Grafikon 16.** Prikaz zastupljenosti i uspešnosti primene WB u dijagnostici KT u neonatalnom periodu

Rezultati statističke analize uspešnosti primene WB testa u dijagnostici KT prikazani su u Tabeli 49.

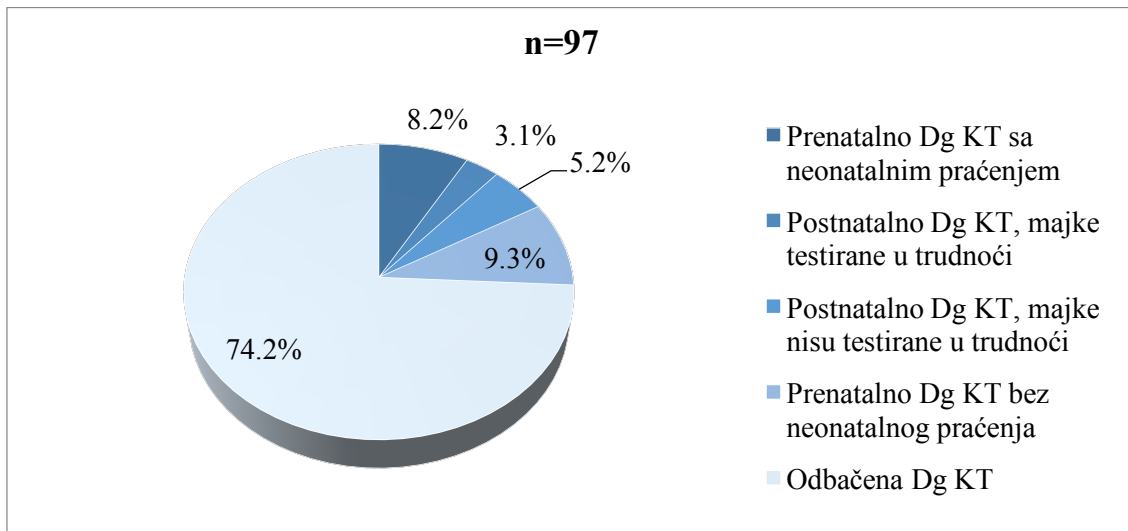
**Tabela 49.** Uspešnost WB testa u otkrivanju kongenitalno inficirane novorođenčadi

	KT			
	+	-	Σ	
WB IgM/IgG				
+	9	0	9	Senzitivnost = 64,3% Specifičnost = 100,0% Stvarno slaganje = 87,5% PPV = 100,0% NPV = 83,9% $\kappa = 0,701$ ( $p < 0,001$ )
-	5	26	31	
Σ	14	26	40	

Od analiziranih indirektnih dijagnostičkih testova, specifičnost je bila najviša kod WB testa, jednaka onoj kod direktnih dijagnostičkih metoda - qPCR i BO (100% kod svih).

**4.1.6. Analiza sumiranih rezultata dijagnostike kongenitalne toksoplazmoze**

Dakle, kao rezultat inicijalne dijagnostike preduzete u prenatalnom (65 fetusa poreklom od 63 trudnice), odnosno postnatalnom periodu (32 novorođenčadi poreklom od 31 porodilje), dijagnoza KT postavljena je kod 25 (25,8%) od u ovom istraživanju ukupno ispitanih 97 fetusa odnosno neonatusa (Grafikon 17).



**Grafikon 17.** Zastupljenost slučajeva KT u ispitivanim grupama pacijenata (n = 97)

Doprinos direktnih metoda (qPCR i biološkog oglada) pravovremenoj, odnosno prenatalnoj i ranoj postnatalnoj dijagnostici KT analiziran je i primenom statističkih testova (Tabela 50 i Tabela 51).

**Tabela 50.** Uspešnost qPCR u dijagnostici KT

		KT		
		+	-	Σ
qPCR	+	16	0	16
	-	4	41	45
	Σ	20	41	61

Senzitivnost = 80,0%

Specifičnost = 100,0%

Stvarno slaganje = 93,4%

PPV = 100,0%

NPV = 91,1%

$\kappa = 0,843$  ( $p < 0,001$ )



**Tabela 51.** Uspešnost BO u dijagnostici KT

		KT		
		+	-	Σ
BO	+	10	0	10
	-	14	19	33
	Σ	24	19	43

Senzitivnost = 41,7%

Specifičnost = 100,0%

Stvarno slaganje = 67,4%

PPV = 100,0%

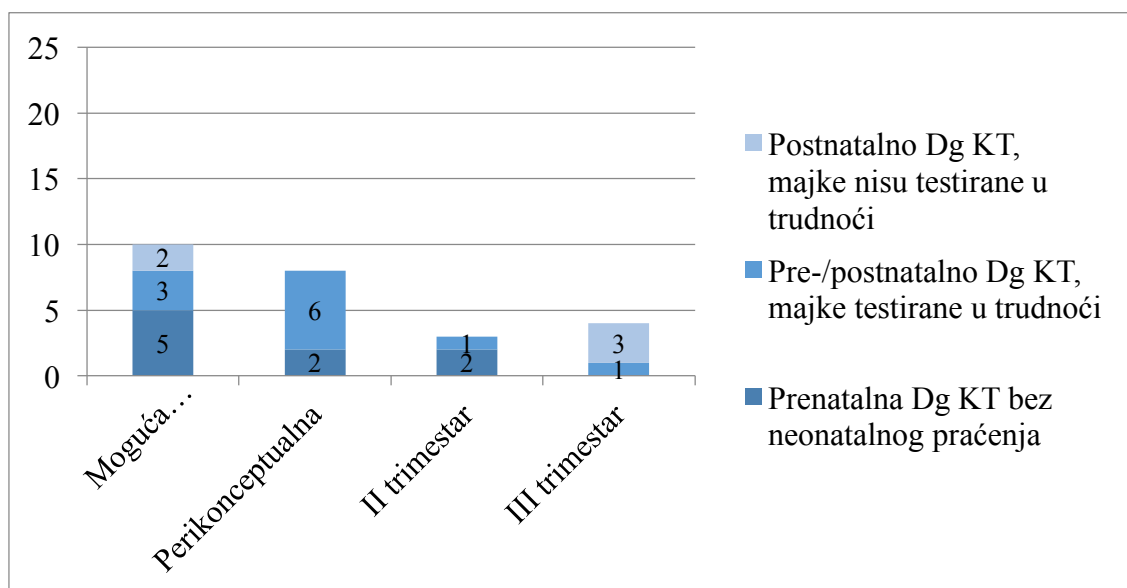
NPV = 57,6%

$\kappa = 0,387$  ( $p < 0,001$ )

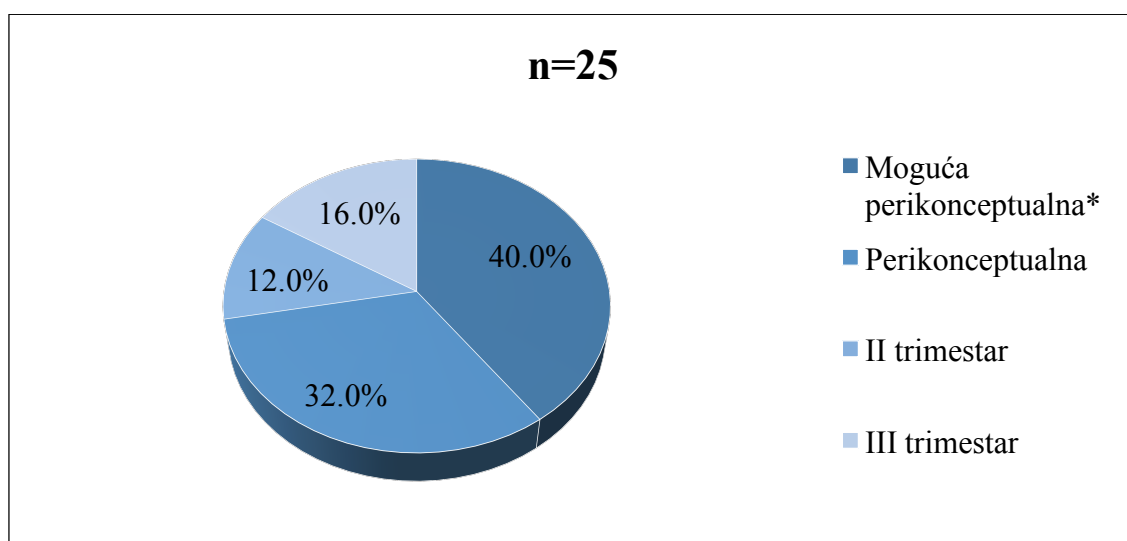
Dok je specifičnost metoda direktne dijagnostike bila jednako visoka (100,0%), qPCR je pokazao gotovo dvostruko višu osetljivost u detekciji kongenitalne infekcije u odnosu na biološki ogled (80,0% u odnosu na 41,7%). Takođe, NPV primenjenog qPCR protokola (91,1%) bila je značajno viša u odnosu na biološki ogled (57,6%) (Tabela 50 i Tabela 51).

Analizom podataka o vremenu infekcije majki kongenitalno inficiranih fetusa/neonatusa identifikovanih ovim istraživanjem, a u odnosu na vreme koncepcije, utvrđeno je da je KT prevashodno proistekla kao posledica perikonceptualne infekcije majke – bilo potvrđene (32%) ili suspektne (40%) (Grafikon 18 i Grafikon 19).

**Grafikon 18.** Uporedni prikaz vremena infekcije majki kongenitalno inficirane dece u ispitivanim grupama pacijenata (n=25)



**Grafikon 19.** Sumarni prikaz vremena infekcije majki kongenitalno inficirane dece

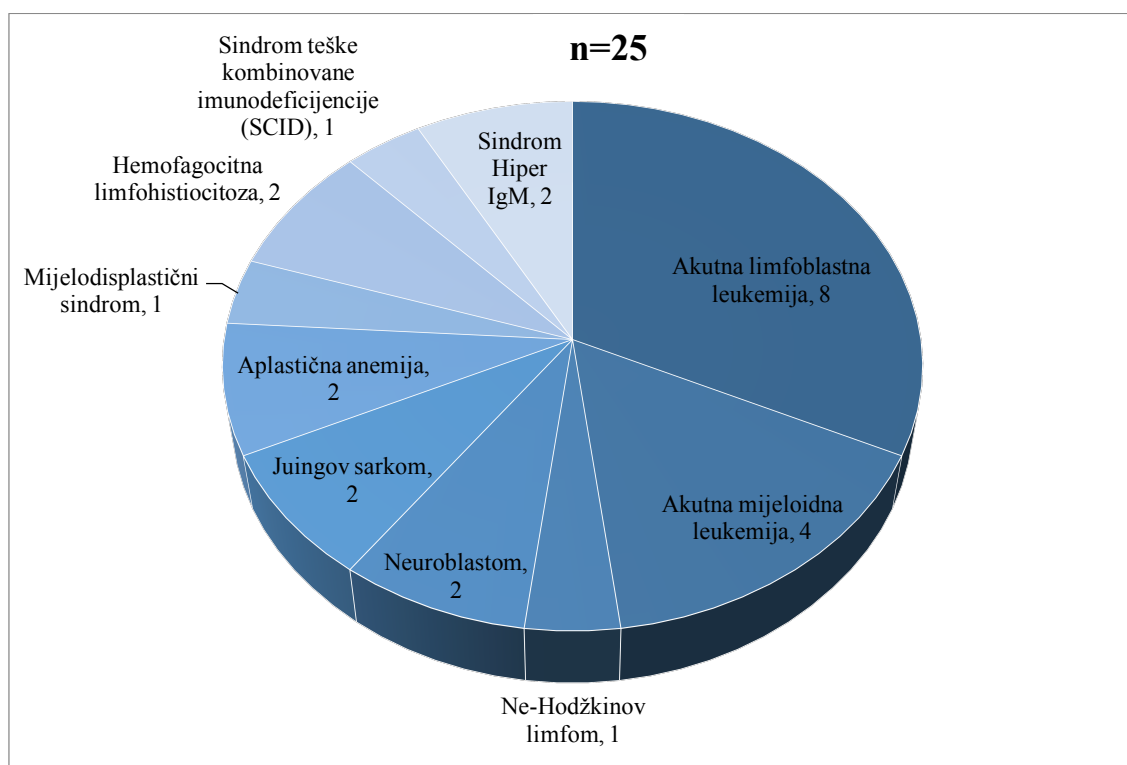


\*U ovu kategoriju svrstane su i majke dva deteta sa dijagnozom KT postavljenom na rođenju, koje nisu testirane u trudnoći a vreme infekcije je procenjeno na > 6 meseci od porođaja

#### 4.2. ANALIZA USPEŠNOSTI MOLEKULARNE DIJAGNOSTIKE REAKTIVIRANE TOKSOPLAZMOZE PRIMENOM qPCR

Ovim delom istraživanja obuhvaćeno je 25 bolesnika kod kojih je određivan status infekcije *T. gondii* pre i/ili nakon HSCT a u cilju detekcije potencijalne reaktivacije infekcije u posttransplantacionom periodu.

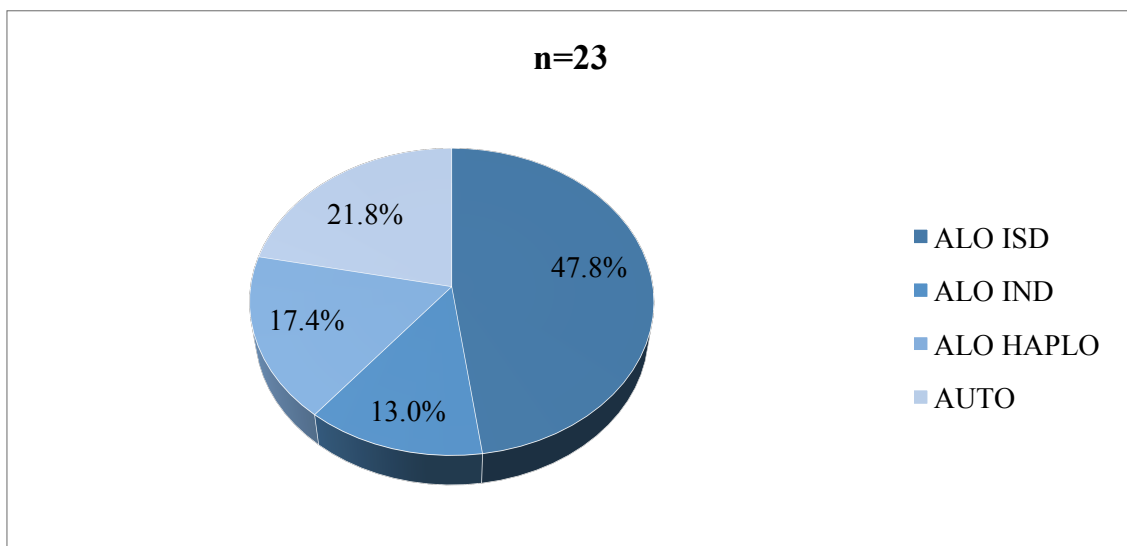
Kod ovih bolesnika, HSCT je standardni metod lečenja osnovne bolesti. Grafikon 20 prikazuje distribuciju bolesnika prema dijagnozama.



**Grafikon 20.** Distribucija bolesnika prema dijagnozama

Zbog progresije osnovne bolesti, HSCT nije izvršena kod dva bolesnika (8%). Kod 23 bolesnika urađena je alogena (ALO, n=18), odnosno autologna HSCT (AUTO, n=5). Kod 11 bolesnika urađena je transplantacija od srodnog podudarnog davaoca (ALO ISD), kod troje od nesrodnog podudarnog davaoca (ALO IND) a kod četiri bolesnika od haploidentičnog davaoca (ALO HAPLO). Kod bolesnika kod kojih je

urađena transplantacija od identičnog srodnog davaoca primenjene su matične ćelije hematopoeze iz kostne srži, a kod ostalih iz periferne krvi (Grafikon 21).



**Grafikon 21.** Distribucija bolesnika prema tipu transplantacije matičnih ćelija hematopoeze

Status infekcije *T. gondii* određivan je kod svih 25 bolesnika (Tabela 52) dok je praćenje potencijalne reaktivacije korišćenjem seroloških i molekularnih metoda (qPCR) primenjen kod svih seropozitivnih bolesnika u posttransplantacionom periodu.

**Tabela 52.** Status infekcije *T. gondii* kod bolesnika u pripremi za HSCT

HSCT	<i>T. gondii</i> seropozitivni	<i>T. gondii</i> seronegativni	Ukupno
ALO ISD	9	2	11
ALO IND	3	0	3
ALO HAPLO	3	1	4
AUTO	2	3	5
NR	1	1	2
<b>Ukupno</b>	<b>18</b>	<b>7</b>	<b>25</b>

ALO ISD = alogena HSCT od identičnog/podudarnog srodnog davaoca; ALO IND = alogena HSCT od podudarnog nesrodnog davaoca; ALO HAPLO = alogena HSCT od haploidentičnog davaoca; AUTO = autologna HSCT; NR = HSCT nije rađena

Kod pacijenata lečenih alogenom HSCT određen je i status infekcije *T. gondii* davalaca HSC (Tabela 53).

**Tabela 53.** Status infekcije *T. gondii* kod davalaca HSC

Status infekcije <i>T. gondii</i>	Davaoci HSC		
	ALO ISD	ALO IND	ALO HAPLO
Seropozitivni	2	/	2
Seronegativni	9	1	1
Nepoznat	/	2	1
<b>Ukupno</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>4</b>

ALO ISD = alogena HSCT od identičnog/podudarnog srodnog davaoca; ALO IND = alogena HSCT od podudarnog nesrodnog davaoca; ALO HAPLO = alogena HSCT od haploidentičnog davaoca

Zbog mogućeg uticaja na pojavu reaktivacije tokosplazmoze u posttransplantacionom periodu, analizirana je podudarnost serološkog statusa infekcije parova davalac - primalac, a u cilju detekcije tzv. *mismatch*-a (Tabela 54).

**Tabela 54.** Nepodudarnosti serološkog statusa infekcije *T. gondii* primalaca i davalaca HSC

Serološki <i>mismatch</i>	ALO ISD	ALO IND	ALO HAPLO
R+/D-	7	1	1
<b>Ukupno</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

+ = seropozitivan; - = seronegativan;

Zbog potencijalnog uticaja na tok i ishod transplantacije, kod bolesnika je beležen broj datih CD34+ ćelija/kg telesne mase. Broj datih transfuzija eritrocita i trombocita je u korelaciji sa brzinom prihvatanja kalema. Profilaksa ko-trimoksazolom primenjivana je kod bolesnika posle prihvatanja kalema granulocitne loze (tri dana za redom apsolutni broj granulocita 500 i preko 500) i megakariocitne loze (broj trombocita 20000 i preko 20000, pet dana za redom bez transfuziološke potpore). Stoga je i razmak od transplantacije do rekonstituisanja relevantnih ćelijskih loza procenjivan u odnosu na status infekcije *T. gondii*.

Kod bolesnika inficiranih *T. gondii*, broj datih CD34+ ćelija kretao se od 1,7 do  $23 \times 10^6$ /kg telesne mase (u proseku  $9,65 \times 10^6$ /kg). Kod seronegativnih primalaca HSC, dato je od  $4,3$  do  $8,4 \times 10^6$  CD34+ ćelija po kilogramu telesne mase (u proseku  $6,07 \times 10^6$ /kg) (Tabela 55).

Kod seropozitivnih bolesnika prihvatanje kalema granulocitne loze registrovano je između 14. i 33. dana posle HSCT (u proseku 19. dana), dok kod četiri (23,5% seropozitivnih transplantiranih) nije došlo do uspostavljanja linije neutrofilnih

ćelija. U odsustvu infekcije *T. gondii*, prihvatanje kalema granulocitne loze registrovano je između 15. i 21. dana posle transplantacije (u proseku 19. dana). Kod pet (29,4%) *T. gondii*-seropozitivnih nije došlo do prihvatanja kalema megakariocitne loze, dok je kod preostalih bolesnika broj trombocita porastao na preko 20000/ $\mu$ l u proseku 17. posttransplantacionog dana (od 10-24. dana). Kod bolesnika koji nisu bili u kontaktu sa *T. gondii*, trombocitna loza je uspešno restituisana u proseku 26. posttransplantacionog dana (od 8-100. dana) (Tabela 55).

U posttransplantacionom periodu kod pet (29,4%) inficiranih bolesnika nije bilo potrebe za transfuziološkom potporom trombocitima i eritrocitima a ostalih 70,6% bolesnika je primilo od jedne do 17 transfuzija eritrocita (u proseku pet) i od dve do 20 transfuzija trombocita (prosečno devet). Transfuzija nije primenjena kod troje (50%) neinficiranih bolesnika a a kod troje kod kojih jeste, bilo ih je 1-23 (prosečno devet) za eritrocite i 1-51 (prosečno 18) za trombocite (Tabela 55).

**Tabela 55.** Prikaz distribucije uspostavljanja granulocitne/trombocitne loze i datih transfuzija eritrocita/trombocita u odnosu na vrstu transplantacije kod bolesnika inficiranih *T. gondii*

	Vrsta HSCT			
	ALO ISD	ALO IND	ALO HAPLO	AUTO
CD34+ x 10 <sup>6</sup> /kg *(SD)	8,72 (6,01)	8,22 (3,93)	18 (7,07)	8,14 (4,32)
Odsustvo Gr (N)	3	/	1	/
Prihvatanje Gr kalema (post-HSCT dan)* (SD)	14,25 (8,89)	16,67 (3,78)	16,67 (16,5)	17,5 (3,53)
Odsustvo Tr (N)	4	/	1	/
Prihvatanje Tr kalema (post-HSCT dan)* (SD)	10 (8,73)	17,33 (4,51)	12,67 (12,05)	14 (1,41)
Bez transfuzije Er (N)	2	2	1	/
Broj transfuzija Er* (SD)	5,28 (5,82)	2 (2,82)	7,5 (3,53)	2,5 (2,12)
Bez transfuzije Tr (N)	3	1	1	/
Broj transfuzija Tr* (SD)	7,85 (7,05)	7,5 (7,77)	10,5 (2,12)	8 (7,07)
<b>Broj primalaca</b>	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>

\* aritmetička sredina; SD=standardna devijacija; Gr=granulociti; Tr=trombociti; Er=eritrociti; N=broj bolesnika

#### 4.2.1. Rezultati posttransplantacione serološke dijagnostike toksoplazmoze

U posttransplantacionom periodu nije došlo do pojave specifičnih IgM antitela ni kod jednog latentno inficiranog primaoca HSC, dok su specifična IgG antitela

detektovana u koncentraciji od 1-288 IU/ml VIDAS-TOXO IgG testom odnosno u titru 1:20-1:5.120 HSDA testom.

#### 4.2.2. Rezultati posttransplantacione molekularne dijagnostike toksoplazmoze

Od ukupno 17 bolesnika sa latentnom toksoplazmozom koji su lečeni transplantacijom HSC, reaktivacija toksoplazmoze u posttransplantacionom periodu dijagnostikovana je na osnovu rezultata qPCR analize uzoraka periferne krvi kod tri bolesnika (3/17, odnosno 17,6%; zapravo 3/15, tj. 20% seropozitivnih alogeno transplantiranih a 3/9, tj. 33,3% svih seropozitivnih ALO ISD) (Tabela 56). Kod sva tri bolesnika izvršena je alogena transplantacija HSC poreklom od HLA-identičnog, srodnog davaoca neinficiranog *T. gondii* (serološki R+/D- *mismatch*).

**Tabela 56.** Tok i ishod transplantacije kod bolesnika sa reaktiviranom toksoplazmozom

	Reaktivacija <i>T. gondii</i> infekcije nakon ALO ISD HSCT		
	Bolesnik 1	Bolesnik 2	Bolesnik 3
Broj CD34+/kg	9,05 x 10 <sup>6</sup>	5,36 x 10 <sup>6</sup>	9,1 x 10 <sup>6</sup>
Uspostavljanje Gr loze (post-HSCT dan)	/	/	18
Uspostavljanje Tr loze (post-HSCT dan)	/	/	10
Broj transfuzija Er	/	17	1
Broj transfuzija Tr	/	20	2
Komplikacije nakon HSCT	Akutna GVHD gr. I, neprihvatanje kalema, pleuropneumonija, ARDS	Akutna GVHD gr. I, neprihvatanje kalema	Akutna GVHD gr. I, odbacivanje kalema
Profilaksa ko-trimoksazolom	Od 22. post-HSCT dana	/	Od 18. post-HSCT dana
Ishod HSCT	Exitus letalis 39. post-HSCT dana	Exitus letalis 6,5 meseci nakon HSCT	Odbacivanje kalema

GVHD – bolest "kalem protiv domaćina" (eng. *graft vs. host disease*);

ARDS – akutni respiratorni distres sindrom

Genetski materijal *T. gondii* detektovan je u perifernoj krvi ovih bolesnika dve nedelje nakon transplantacije (bolesnik 3), 21. post-HSCT dana (bolesnik 1) odnosno tri meseca od transplantacije (bolesnik 2) (Tabela 57, Slika 14 i Slika 15).

**Tabela 57.** Rezultati serološke i molekularne dijagnostike toksoplazmoze kod bolesnika sa reaktivacijom infekcije u posttransplantacionom periodu

Post-HSCT reaktivacija toksoplazmoze	Redni br. uzorka	Vrsta uzorka	Dan post-HSCT	HSDA	TXG [IU/ml]	TXGA	TXM	qPCR (Ct)	Broj parazita /1 mL uzorka
Bolesnik 1	1.	PK	21.	1:640	144	0,566	0,09	Pozitivan (22,87)	223245
	2.	BAL	23.	/	/	/	/	Pozitivan (19,30)	3702209
	3.	PK	30.	1:1280	288	/	0,10	Pozitivan (28,34)	3019
Bolesnik 2	1.	PK	2,5 mes	640	6	/	0,06	Negativan	/
	2.	PK	3 mes	320	3	/	0,04	Pozitivan (36,23)	6
	3.	PK	3,5 mes	160	1	/	0,06	Negativan	/
	4.	PK	4 mes	5.120	57	/	0,04	Negativan	/
	5.	PK	6 mes	/	6	/	0,02	Negativan	/
Bolesnik 3	1.	PK	14.	160	8	/	0,09	Pozitivan (32,22)	142
	2.	PK	21.	20	1	/	0,1	Pozitivan (29,87)	906
	3.	PK	28.	20	6	/	0,09	Negativan	/
	4.	PK	35.	20	4	/	0,09	Negativan	/
	5.	PK	42.	20	4	/	0,08	Negativan	/
	6.	PK	49.	20	3	/	0,07	Negativan	/

PK=periferna krv; BAL=bronhoalveolarni lavat; mes=meseći

Kod jednog od tri bolesnika kod kojih je došlo do reaktivacije toksoplazmoze u posttransplantacionom periodu, reaktivacija latentne infekcije praćena je diseminacijom bolesti što je dovelo do multiorganske disfunkcije i smrtnog ishoda (bolesnik 1) (Slika 14), dok je kod druga dva bolesnika parazitarija detektovana samo na molekularnom nivou, bez manifestnih kliničkih znakova sistemske toksoplazmoze (bolesnik 2 i bolesnik 3, Tabela 57).

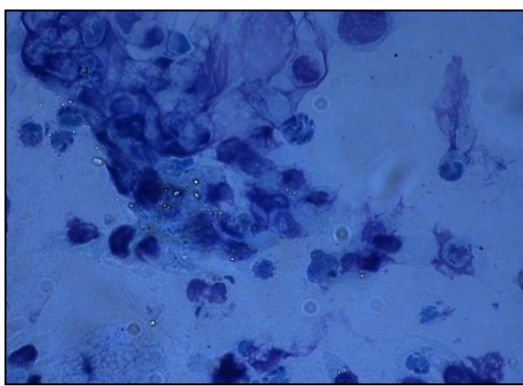
Od 23 primaoca HSC praćena u posttransplantacionom periodu, smrtni ishod zabeležen je u pet slučajeva. Reaktivacija latentne toksoplazmoze kao doprinosaća ili pridružena komponenta najnepovoljnijeg ishoda HSCT detektovana je u 2/5 (40%) slučajeva (Tabela 58).



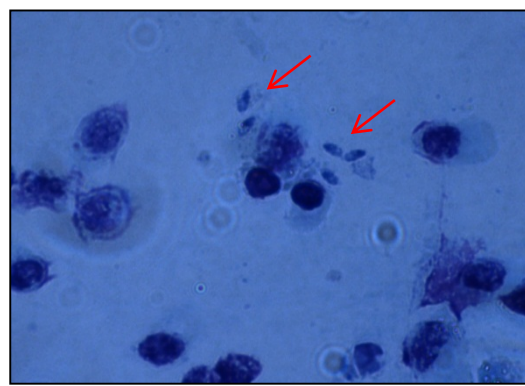
**Tabela 58.** Relevantni parametri HSCT koje su rezultirale smrtnim ishodom

Redni br. bolesnika	Vrsta HSCT	Prihvatanje kalema	Status infekcije <i>T. gondii</i>	Reaktivacija (post-HSCT)	Smrtni ishod (post-HSCT)
1	ALO ISD	Nepotpuno*	Hronična	Ne	1 mesec
2	ALO ISD	Ne	Hronična	21. dan	39. dan
3	ALO ISD	Da	Hronična	Ne	2 meseca
4	ALO HAPLO	Da	Hronična	Ne	3 meseca
5	ALO ISD	Ne	Hronična	3 meseca	6,5 meseci

\*Bez uspostavljanja trombocitne loze

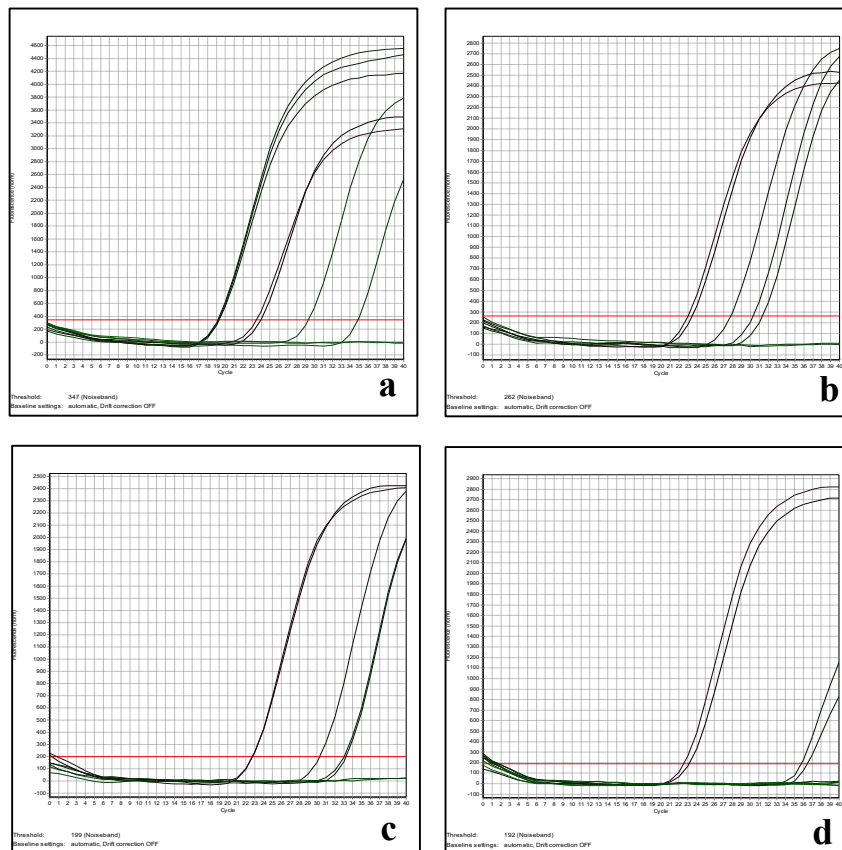


a)



b)

**Slika 14. a), b)** Tahizoiti *T. gondii* na mikroskopskim preparatima BAL-a primaoca HSC sa plućnom manifestacijom reaktivirane toksoplazmoze (bolesnik 1, Tabela 57; bojenje po *Giemsa*-i) (preuzeto iz Štajner i sar., 2013)



**Slika 15.** Prikaz reprezentativnih rezultata qPCR analize:

- a) nalaz u BAL-u u toku post-HSCT reaktivacije
- b) nalaz u PK u toku post-HSCT reaktivacije
- c) nalaz u PK kao dokaz povoljnog efekta terapije u post-HSCT reaktivaciji
- d) nalaz u PK u ranoj fazi reaktivacije (niska parazitemija)

**DISKUSIJA**

Dijagnoza infekcije *T. gondii*, iako zasnovana na laboratorijskim metodama, zahteva primenu holističkog pristupa u tumačenju rezultata, odnosno uvažavanje specifičnosti svakog bolesnika ponaosob, uključujući kliničke manifestacije, životnu dob i stanje imunskog sistema. Kod bolesnika sa urođenim ili stečenim slabostima imunskog sistema, toksoplazmoza može imati nepovoljan tok sa smrtnim ishodom. Kod imunokompetentnih osoba, toksoplazmoza najčešće protiče klinički inaparentno i obično se dijagnostikuje slučajno, najčešće u hroničnoj fazi infekcije. Međutim, među osobama inficiranim parazitom *T. gondii* očuvanog imunskog odgovora, trudnice predstavljaju kategoriju koja zahteva budnost, promptnu reakciju i kooperaciju kliničkog lekara i mikrobiologa. Ovim istraživanjem je bilo obuhvaćeno 80 trudnica.

Kod sumnje na primoinfekciju trudnice, prioritet je utvrđivanje potencijalnog rizika za razvoj fetalne infekcije, primenom laboratorijskih metoda pomoću kojih se infekcija trudnice vremenski pozicionira u odnosu na začeće. Međutim, najpre se mora utvrditi status infekcije *T. gondii* kod trudnice. Osnovu dijagnostike već više decenija čine imunodijagnostički (serološki testovi), kojima se u serumu i drugim telesnim tečnostima dokazuju IgG, IgM, eventualno i IgA antitela specifična za *T. gondii*. Praćenje dinamike u koncentraciji specifičnih IgG i IgM antitela u nekoliko sukcesivnih uzoraka seruma decenijama je bio jedini metod za utvrđivanje faze infekcije trudnica, čime se gubilo dragoceno vreme za primenu specifične antitoksoplazmatske terapije. Test uspostavljen 90-tih godina prošlog veka (Hedman i sar., 1989; Lappalainen i sar., 1993) koji je, određivanjem funkcionalnog afiniteta specifičnih IgG antitela za vezivanje *T. gondii* antigena, trebalo da ispitivanjem jednog jedinog uzorka seruma odgovori na pitanje da li je reč o skorašnjoj ili davnašnjoj infekciji, naišao je na veliki komercijalni uspeh i sledstvenu evaluaciju u brojnim dijagnostičkim studijama u 2000-tim

(Liesenfeld i sar., 2001; Fricker-Hidalgo i sar., 2006; Lachaud i sar., 2009; Bobić i sar., 2009). Visok aviditet specifičnih IgG antitela (određen većinom komercijalno dostupnih testova) isključuje nastanak infekcije tokom poslednja četiri meseca, što je od izuzetne važnosti jer omogućava isključenje rizika od infekcije ploda kod trudnica u prvim nedeljama trudnoće (3/80, 3,75% pregledanih trudnica u ovom istraživanju). S druge strane, nizak aviditet ne odražava nužno akutnu infekciju. Naime, nizak aviditet specifičnih IgG antitela može perzistirati mesecima i godinama posle akutne infekcije (Remington i sar., 2004; Montoya i sar., 2004). U nedavnoj studiji sprovedenoj u NRLT kojom je obuhvaćen 151 uzorak seruma, usporeno sazrevanje aviditeta registrovano je u 15,4% pacijenata (Bobić i sar., 2009). Međutim, u ovom istraživanju, prolongirana detekcija niskog aviditeta specifičnih IgG antitela zabeležena je kod ne više od 6,3% serološki praćenih trudnica. Iako je usporeno sazrevanje aviditeta detektovano nešto ređe nego što bi se po rezultatima Bobića i sar. moglo očekivati, predstavljalo je dijagnostički problem. Nisu do kraja poznati svi razlozi koji mogu dovesti do usporenog sazrevanja aviditeta, ali više prospektivnih studija je pokazalo da je ova pojava povezana sa primenom antitoksoplazmatske terapije (Petersen i sar., 2005; Fricker-Hidalgo i sar., 2006; Meroni i sar., 2009). U našem istraživanju je nakon inicijalnog testiranja kod svih trudnica sa sumnjom na akutnu toksoplazmozu preporučena specifična terapija. Stoga, i pored nesumnjivog doprinosa u određivanju statusa infekcije trudnoće, odnosno potencijalne ugroženosti ploda, aviditet specifičnih IgG antitela mora se tumačiti u kontekstu starosti trudnoće, primene specifične terapije, dužine serološkog praćenja ali i rezultata drugih seroloških testova, pre svega prisustva/odsustva specifičnih IgM antitela.

Iako se IgM antitela specifična za *T. gondii* smatraju markerima akutne infekcije čija koncentracija u serumu po pravilu opada nakon šest meseci, dostižući negativne vrednosti unutar godinu dana od infekcije, u određenom broju slučajeva mogu se detektovati mesecima pa i godinama nakon infekcije. Tako su se npr. u istraživanju Gras i sar. kojim je obuhvaćeno 446 žena primoinficiranih u trudnoći, specifična IgM antitela zadržala na detektabilnom nivou duže od dve godine kod 9-27% (u zavisnosti od osetljivosti korišćenog testa) (Gras i sar., 2004), dok su Bobić i sar. opisali slučaj detektabilnih specifičnih IgM antitela visoko osetljivim ISAgA testom 12 godina nakon klinički manifestovane toksoplazmoze u trudnoći (Bobić i sar., 1991).

Detekcija IgM antitela specifičnih za *T. gondii* u serumu trudnice nakon više od godinu dana od primoinfekcije, gotovo po pravilu u prisustvu visoko avidnih specifičnih IgG antitela, ne odslikava prolongiranu aktivnost infekcije već naprotiv, potvrđuje rezidualnost detektovanih specifičnih IgM antitela u hroničnoj infekciji koja nemaju klinički značaj i otuda ni ne ukazuju na rizik od infekcije ploda. Od trudnica serološki praćenih u ovom istraživanju (63/80, 78,75%), rezidualna specifična IgM antitela detektovana su kod devet trudnica (14,3%) koje su nakon višemesečnog praćenja u nereferentnim laboratorijama upućene u NRLT. Dijagnoza je postavljena na osnovu odsustva značajnih promena u dinamici specifičnih IgM antitela u periodu dužem od godinu dana od inicijalnog testiranja, potkrepljena visokim aviditetom specifičnih IgG antitela a ponegde i nedetektabilnim specifičnim IgA antitelima, čije odsustvo dodatno potvrđuje dijagnozu (Gorgievski-Hrisoho i sar., 1991). Međutim, usporeno sazrevanje aviditeta i rezidualna IgM antitela nisu bila jedini varijetet imunskog odgovora registrovan u ovom uzorku trudnica. Naime, kod 3,2% (2/63) praćenih trudnica ustanovljena je akutna infekcija u fazi parazitemije bez specifičnog imunskog odgovora, što je u odsustvu imunodeficientnog stanja redak ali prepoznat fenomen (Fricker-Hidalgo i sar., 2013), dok je kod 3,2% (2/63) trudnice detektovana niska koncentracija specifičnih IgG antitela u hroničnoj infekciji (Robert-Gangneux i Darde, 2012).

Interesantno, u našem istraživanju je čak 27% serološki praćenih trudnica (serološki je praćeno 63/80 trudnica, odnosno 78,75%) ispoljilo neuobičajen obrazac dinamike specifičnih antitela, čime je i u ovom istraživanju naglašen značaj komplementarnog tumačenja rezultata testova za ispitivanje različitih imunskih parametara, pre svega u kontekstu gestacijske starosti u trenutku dijagnoze ali i primene specifične terapije.

Pored individualnih varijacija u imunskom odgovoru na infekciju *T. gondii*, određivanje vremena infekcije trudnica dodatno je otežano činjenicom da su žene upućivane na inicijalno ispitivanje u NRLT u različitim fazama trudnoće, pa čak i nakon porođaja. Najveći broj trudnica upućen je u NRLT u II trimestru graviditeta (61,25%), dok je status infekcije *T. gondii* kod 16,25% žena određen u poslednjim mesecima trudnoće, pri čemu je manje od 10% (8,75%) od ukupnog broja trudnica u trenutku pregleda u NRLT imalo klinički manifestnu toksoplazmozu (limfoglandularna forma), što je u saglasnosti sa podacima iz literature (Dunn i sar., 1999; Remington, 2001).

Poteškoće u proceni potencijalne ugroženosti ploda infekcijom majke ilustrovane su i podatkom da se većina inficiranih trudnica u trenutku prvog testiranja u NRLT nalazila na prelazu iz akutne u hroničnu fazu infekcije (58,75%), što je zahtevalo simultanu analizu različitih seroloških i kliničkih parametara (koncentracija specifičnih IgM antitela, aviditet specifičnih IgG antitela, starost trudnoće...) u cilju procene opravdanosti preduzimanja prenatalne dijagnostike KT. Za nešto više od petine (21,25%, 17/80) ispitivanih trudnica je moglo sa sigurnošću biti utvrđeno da su inficirane *T. gondii* nakon što je trudnoća potvrđena, čime je rizik po plod postao realan. Nalaz koji je međutim daleko interesantniji ogleda se u podatku da je kod čak 70% (56/80) ispitanih trudnica vreme infekcije procenjeno na perikonceptualni period, dakle 6-8 nedelja pre, odnosno nakon začeća.

Perikonceptualna infekcija majke dugo je smatrana gotovo bezopasnom za plod. Međutim, prve indicije o značaju perikonceptualne infekcije potiču iz istraživanja Daffos-a i sar., koji su prospektivnim praćenjem 746 trudnica identifikovali 159 žena inficiranih *T. gondii* u perikonceptualnom periodu, a koje su u 1,8% slučajeva prenele infekciju na plod (Daffos i sar., 1988). Do sličnih podataka došli su i Hohlfeld i sar. koji su kombinovanom primenom metoda konvencionalne i molekularne dijagnostike (pionirska primena PCR tehnike namenjene detekciji B1 gena *T. gondii* u plodovoj vodi) dokazali KT ploda u šest slučajeva (1,3%) od ukupno 484 perikonceptualno inficiranih trudnica (Hohlfeld i sar., 1994). Kako su izveštaji o slučajevima kongenitalne infekcije praćene teškim malformacijama u razvoju ploda nastalim kao posledica infekcije majke dva ili više meseci pre začeća vremenom postajali sve brojniji (Marty i sar., 1991; Pons i sar., 1995; Vogel i sar., 1996; Villena i sar., 1998), nametnula se potreba za proširenjem indikacija za prenatalnu dijagnostiku KT sa potvrđene primoinfekcije u trudnoći i na slučajeve prekonceptualne infekcije majke. Takva praksa zahtevala je evaluaciju, što je i učinjeno u opsežnoj prospektivnoj studiji koja je, zahvaljujući programu obaveznog serološkog ispitivanja trudnica i sledstvene dijagnostike KT sprovedena na teritoriji Francuske (Wallon i sar., 2002). Istraživanjem Wallon i sar. obuhvaćeno je 360 perikonceptualno inficiranih trudnica od kojih je kod 12 (3,3%) potvrđena transplacentna transmisija parazita. Do sličnih rezultata, baziranih na 10-godišnjem retrospektivnom praćenju 79 perikonceptualno inficiranih trudnica, došli su Garabedian i sar. koji su infekciju ploda identifikovali u tri slučaja

(3,8%) od kojih su dva rezultirala spontanom pobačajem (66%) a jedan rađanjem klinički zdravog deteta (Garabedian i sar., 2012).

Ovim istraživanjem, među 80 trudnica i 16 porodilja ispitivanih na toksoplazmozu, obuhvaćena je 31 trudnica sa utvrđenom, kao i 25 trudnica i šest porodilja sa suspektnom perikonceptualnom infekcijom. Kombinovanom primenom molekularne i konvencionalne dijagnostike, KT je potvrđena kao ishod u osam slučajeva dokazane i u deset slučajeva suspektne perikonceptualne infekcije majke (29% od ukupnog broja perikonceptualno inficiranih žena). Postoji više mogućih objašnjenja za ovako visoku stopu KT nakon infekcije *T. gondii* u ranom gestacionom periodu, odnosno u nedeljama pre začeća. Pre svega, kako u Srbiji ne postoji program obaveznog serološkog ispitivanja trudnica na infekciju *T. gondii*, većina trudnica prvi put je ispitana u NRLT u poodmakloj trudnoći (61,25% u II, odnosno 16,25% u III trimestru), dok 16 porodilja nije ispitivano tokom trudnoće. Ovi objektivni činoci umnogome otežavaju precizno utvrđivanje vremena infekcije u odnosu na koncepciju, tako da se, i pored precizno definisanog dijagnostičkog algoritma, ne može isključiti mogućnost da je određen broj infekcija koje su svrstane u perikonceptualne nastao više od osam nedelja pre ili nakon začeća. Ipak, prilikom tumačenja visoke učestalosti KT nakon infekcija u ranoj trudnoći ili pre začeća ne sme se zanemariti možda i odlučujuća uloga pravovremene primene kompleksne i precizne dijagnostike bazirane na molekularnoj identifikaciji uzročnika pomoću qPCR u prenatalnom ili ranom postnatalnom periodu. Zapravo, korišćenjem optimizovanog qPCR protokola, KT je prenatalno utvrđena u pet slučajeva dokazane i četiri slučaja suspektne perikonceptualne infekcije, odnosno po rođenju u dva slučaja dokazane perikonceptualne infekcije majke (ukupno pre-/postnatalno u 87,5% slučajeva dokazane, odnosno 40% suspektne perikonceptualne infekcije). Ovi nalazi su u suprotnosti sa uverenjem da je vertikalna transmisija kod infekcija u prvim nedeljama trudnoće veoma retka (Desmonts i Couvreur, 1984; Hohlfeld i sar., 1994; Dunn i sar., 1999) i govore u prilog hipoteze o postojanju odložene migracije parazita iz posteljice na plod, nedeljama i mesecima nakon infekcije majke (Hezard i sar., 1997; Villena i sar., 2003), fenomena koji je bio prepoznat i decenijama ranije kao „prenatalni inkubacioni period“ (Thalhammer i sar., 1955; Thalhammer i sar., 1975). Uspešna izolacija DNK *T. gondii* iz plodove vode perikonceptualno inficiranih trudnica u ovom istraživanju ukazuje na značaj prenatalne



dijagnostike kako bi se omogućila terapija infekcije ploda pre rođenja, uz pažljivo ultrazvučno praćenje razvoja ploda čak i ukoliko je majka inficirana nekoliko (6-8) nedelja pre, odnosno nakon začeća.

Prenatalna dijagnostika infekcije ploda predložena je svim trudnicama ispitivanim u NRLT kod kojih je serokonverzija u trudnoći ili u perikonceptualnom periodu bila dokazana ili visoko suspektna, a sprovedena je u 63 slučaja (78,75%). Kao dijagnostički materijal, u većini slučajeva korišćena je amnionska tečnost i u mnogo manjem broju, fetalna krv (odnos 12:1). Dostupnost metoda prenatalne dijagnostike KT u većini evropskih zemalja potisnula je iz dijagnostičkih algoritama potrebu za analizom tkiva placente (uzorkovane na porođaju) kao do tada jedine raspoložive metode za potencijalnu izolaciju *T. gondii*, čiji je nalaz u placenti predstavljao najraniju moguću parazitološku potvrdu infekcije ploda (Desmonts i Couvreur, 1974a). Odlaganjem dijagnostike do rođenja deteta se ne samo gubilo dragoceno vreme za primenu specifične terapije, već bi se u slučaju pozitivnog rezultata dijagnostičar našao pred pitanjem da li je došlo i do migracije parazita iz posteljice na plod. Naime, iako nema infekcije ploda bez infekcije placente, prisustvo parazita u tkivu posteljice ne podrazumeva nužno i prelazak parazita iz posteljice u tkiva ploda, posebno ukoliko je majka uzimala spiramicin. Medicinski opravdani dijagnostički pristup predstavljao je pokušaj izolacije *T. gondii* iz fetalne krvi uzorkovane kordocentezom (Hohlfeld i sar., 1989), što je omogućavalo potvrdu dijagnoze KT pre rođenja deteta. Međutim, kontinuirani napredak u dijagnostici toksoplazmoze, utemeljen na progresivnom razvoju molekularnih metoda identifikacije parazita, rezultirao je potiskivanjem fetalne krvi iz spektra raspoloživog optimalnog materijala za prenatalnu dijagnostiku KT, ka plodovoj vodi kao biološkom materijalu koji se ispostavio kao dijagnostički pouzdaniji. Naime, ne samo što je fetalna krv, zbog svojih bioloških svojstava (prisustvo hema, hemoglobina i drugih potencijalnih inhibitora PCR reakcije), daleko nepouzdaniji materijal za PCR analizu čija je upotreba često skopčana sa lažno negativnim nalazima (Hohlfeld i sar., 1994), nego je štaviše, u odnosu na amniocentezu, kordocenteza i invazivniji postupak, skopčan sa brojnijim neželjenim efektima (D'Alton i sar., 1993; Ghidini i sar., 1993). S druge strane, agens koji se izoluje iz amnionske tečnosti sasvim sigurno je savladao placentnu barijeru i dospao do ploda.

Preimućstva primene PCR metodologije u cilju brze i precizne identifikacije uzročnika KT u plodovoj vodi široko su prepoznata nakon objavljivanja rezultata 10-godišnje prospektivne studije kojom je obuhvaćeno 2632 žena primoinficiranih u trudnoći od kojih je 339 podvrgnuto udruženoj amnio- i kordocentezi (od 18-38. nedelje gestacije). Performanse PCR detekcije B1 gena *T. gondii* u plodovoj vodi nadmašile su uporedo primenjene konvencionalne dijagnostičke metode (izolaciju parazita biološkim ogledom ili u kulturi ćelija, određivanje koncentracije specifičnih IgM antitela u fetalnoj krvi) u smislu osetljivosti (97,4% u odnosu na 89,5%) i negativne prediktivne vrednosti (NPV; 99,7% naspram 98,7%). Specifičnost i pozitivna prediktivna vrednost (PPV) u oba slučaja bile su 100% što je rezultiralo zaključkom da istinska vrednost dijagnostičkog PCR leži u zavidnom kapacitetu da ne samo potvrdi dijagnozu pre rođenja deteta već, mnogo značajnije, da na osnovu negativnog rezultata dijagnoza KT bude odbačena unutar 24h od amniocenteze, pre nepotrebnog otpočinjanja specifične terapije i prolongirane zabrinutosti roditelja za ishod trudnoće (Hohlfeld i sar., 1994). Od uvođenja prvih PCR protokola u dijagnostiku KT, tokom poslednjih 20 godina došlo je do evolutivnog napretka kako u samoj metodologiji (od konvencionalnog, preko *nested* ka *real-time* PCR) tako i u izboru fragmenta u okviru DNK *T. gondii* koji je cilj detekcije (od B1 gena koji se ponavlja 35 puta do 529 bp repetitivnog elementa koji se ponavlja 200-300 puta u genomu parazita).

Kombinovanom primenom metoda konvencionalne (biološki ogled i serološke analize) i molekularne dijagnostike (qPCR) u NRLT, dijagnoza KT postavljena je u prenatalnom periodu u 26% (17/65) slučajeva. Molekularna dijagnostika primenjena je u 83% (54/65) prenatalno prikupljenog materijala (52 plodove vode i dve fetalne krvi). Zapravo, od 17 prenatalno dijagnostikovanih slučajeva KT, četiri (23,5%) su poticala iz perioda pre uspostavljanja molekularne dijagnostike u NRLT. Od preostalih 13 slučajeva KT u kojima je molekularna dijagnostika primenjena, qPCR je bio pozitivan u četiri slučaja (31%) u kojima je i BO bio pozitivan, ali i u čak sedam (54%) slučajeva u kojima je biološki ogled (BO) bio negativan. Dakle, primenom optimizovanog qPCR protokola dijagnoza KT je postavljena kod 85% svih inficiranih fetusa. Ovi podaci su od izuzetnog značaja imajući u vidu da, iako se molekularne metode bazirane na PCR gotovo dve decenije primenjuju u cilju prenatalne dijagnostike KT u referentnim laboratorijama širom Evrope, tehničke karakteristike različitih protokola se umnogome

razlikuju, što uslovljava i razlike u performansama, pa je praktično nemoguća standardizacija metoda (Pelloux i sar., 1998). Štaviše, većina studija koja se bavila ispitivanjem osetljivosti PCR protokola u sklopu prenatalne dijagnostike KT sprovedena je kasnih 90-tih i ranih 2000-tih, bazirajući se na konvencionalnoj PCR tehnici amplifikacije B1 gena. Prikazana osetljivost ovih procedura kretala se od 65% do 80% (Foulon i sar., 1999; Robert-Gangneux i sar., 1999; Romand i sar., 2001). Opsežna multicentrična studija kojom je obuhvaćeno devet evropskih centara takođe je istakla značajne razlike u performansama PCR protokola učesnika (Thalib i sar., 2005).

Uspešnost detekcije genetskog materijala parazita u čak 85% prenatalno dijagnostikovanih slučajeva KT u kojima je primenjen optimizovani qPCR protokol rezultat je sadejstva više činilaca. Prvo, sama primena *real-time* PCR tehnologije predstavlja daleko brži i pouzdaniji vid dijagnostike u odnosu na konvencionalni PCR, posebno u uzorcima sa manjom koncentracijom ciljne DNK (Costa i sar., 2000). Drugo, unapređenju molekularne identifikacije uzročnika toksoplazmoze očekivano je doprinela i promena PCR targeta, odnosno detekcija 529 bp repetitivnog elementa (*AF146527 Genebank sequence*) koji je u genomu ovog parazita gotovo 10 puta zastupljeniji od B1 gena (Homan i sar., 2000). Zapravo, u francuskim referentnim centrima gde se prenatalna dijagnostika toksoplazmoze tokom poslednje dve decenije sprovodi rutinski sprovedene su opsežne multicentrične studije koje su, primenom qPCR, dokumentovale višu osetljivost detekcije *AF146527* gena u odnosu na ranije korišćeni B1 gen (Bastien i sar., 2007; Sterkers i sar., 2010), dok je u nedavno objavljenoj prospektivnoj studiji ovom metodom DNK *T. gondii* detektovana u čak 92% (42/51) uzoraka plodove vode inficiranih fetusa (Wallon i sar., 2010). Neosporna vrednost primene qPCR u isključenju dijagnoze KT analizom uzorka amnionske tečnosti ogleđa se i u nalazima prospektivnih studija kojima je NPV PCR protokola baziranog na detekciji B1 gena *T. gondii* procenjena na 87,8% (analizom je obuhvaćeno 270 uzoraka plodove vode) (Romand i sar., 2001), dok je primena qPCR baziranog na detekciji 529 bp fragmenta u 261 uzorku plodove vode pokazala NPV od 98,1% (Wallon M i sar., 2010). S druge strane, specifičnost i PPV su u obe studije iznosili 100%, uz sledstveni zaključak, potvrđen i rezultatima ovog istraživanja, da molekularna detekcija uzročnika KT u plodovoj vodi, ako je izvedena u referentnoj laboratoriji uz poštovanje smernica za izbegavanje kontaminacije, nesumnjivo omogućava najraniju i

najbržu moguću potvrdu fetalne infekcije, čime se obezbeđuje dragoceno vreme za primenu i delovanje specifične terapije.

Važno je istaći da je u istraživanju sprovedenom u NRLT posebnu korist od dijagnostičke primene qPCR imalo sedmero dece (63,6% od 11 slučajeva) kod kojih biološkim ogledom nisu izolovani vijabilni paraziti, ali je KT prenatalno dijagnostikovana pomoću qPCR, te je i specifična terapija primenjena pre njihovog rođenja.

Iako qPCR, kao najsavremenija raspoloživa tehnika utire put daljem razvoju i unapređenju dijagnostike toksoplazmoze, to ne znači da su u toj kompleksnoj dijagnostičkoj jednačini zanemarene bazične, konvencionalne metode. Do uvođenja molekularne dijagnostike u NRLT, biološki ogled je predstavljao jedini raspoloživi vid potencijalne izolacije parazita iz plodove vode, odnosno fetalne krvi, a samim tim i prenatalne potvrde infekcije ploda. Međutim, i nakon uvođenja qPCR, biološki ogled je zadržan u algoritmu prenatalne dijagnostike, kao dopunska metoda direktne dijagnostike u NRLT. Zapravo, u 15% (2/13) slučajeva u kojima prenatalna molekularna dijagnostika nije rezultirala detekcijom uzročnika KT, vijabilni paraziti su izolovani upravo biološkim ogledom. Ovo se može objasniti time što je zapremina plodove vode izdvojena za molekularnu dijagnostiku (ekstrakciju DNK) bila 5 puta manja od zapremine istog materijala upotrebljene za biološki ogled (200 µl naspram 1 ml), a verovatnoća izolacije *T. gondii* raste sa zapreminom materijala koji se ispituje, jer je broj parazita po pravilu neveliki. Takođe, u jednom od ta dva slučaja je kao dijagnostički materijal korišćena fetalna krv koja zbog prisustva inhibitora *Taq* polimeraze ne predstavlja optimalan materijal za molekularnu dijagnostiku (Hohlfeld i sar., 1994). Naime, biološki ogled je bio jedini način detekcije parazita do kasnih 80-tih godina prošlog veka (Desmonts i Couvreur, 1974b; Desmonts i sar., 1985) ali se zbog višenedeljnog perioda potrebnog za dobijanje rezultata i niže osetljivosti u odnosu na PCR danas mahom koristi u cilju izolacije živog soja za dalju molekularnu analizu genotipa. Ipak, upravo slučajevi u kojima *T. gondii* izmiče detekciji i najosetljivijim molekularnim metodama potenciraju važnost kontinuirane primene biološkog ogleda kao konvencionalne metode direktne dijagnostike KT. I druga istraživanja sprovedena u specijalizovanim laboratorijama čiji su dijagnostički algoritmi zasnovani na komplementarnoj primeni molekularnih i konvencionalnih metoda, pokazala su da je

doprinos biološkog oglada prenatalnoj dijagnostici KT iz amnionske tečnosti (Robert-Gangneux i sar., 1999), odnosno na rođenju iz umbilikalne ili periferne neonatalne krvi (Bessieres i sar., 2001; Naessens i sar., 1999; Živković i sar., 2011) nesumnjiv, posebno u slučajevima kada je PCR negativan zbog prisustva inhibitora *Taq* polimeraze.

Prilikom razmatranja mogućih uzroka lažno negativnog nalaza prenatalne dijagnostike, treba uzeti u obzir i vremensku distancu od infekcije majke do uzorkovanja plodove vode. Naime, iako je opšteprihvaćeno da se amniocentezi pristupa posle 16. nedelje graviditeta i bar četiri nedelje nakon serokonverzije majke (Remington i sar., 2001), uvažavanje tog uslova je veliki izazov u zemljama bez programa obaveznog serološkog testiranja trudnica kao što je Srbija, čime je dodatno otežana mogućnost preciznog utvrđivanja vremena serokonverzije u odnosu na gestacijsku starost. Stoga su neretki slučajevi u kojima se amniocentezi pristupa prerano ili prekasno, čime se kompromituje validnost rezultata prenatalne dijagnostike KT. Treba imati u vidu i da je precizno trajanje parazitemije tokom akutne toksoplazmoze ljudi još uvek predmet brojnih kontroverzi, kao i da su raniji podaci o trajanju parazitemije od 2-3 nedelje (Desmots i Couvreur, 1984) izloženi reevaluaciji, posebno u svetlu novijih eksperimentalnih podataka o produženoj parazitemiji (Djurković-Djaković i sar., 2012), kao i sve učestalijih primera vertikalne transmisije *T. gondii* u uslovima primoinfekcije majke i do dva meseca pre začeća (Villena i sar., 1998; Gay-Andrieu i sar., 2003). Takođe, osetljivost prenatalne dijagnostike je dokumentovano niža kod infekcija u ranoj trudnoći, pretpostavlja se kako zbog moguće odložene transplacentne transmisije parazita (nakon amniocenteze) (Hezard i sar., 1997; Romand i sar., 2001; Gay-Andrieu i sar., 2003; Thalib i sar., 2005; Wallon i sar., 2010), tako i zbog malog broja fetalnih ćelija dostupnih za analizu, odnosno veoma malog broja parazita u amnionskoj tečnosti (Romand i sar., 2004; Sterkers i sar., 2010). Interesantno, broj parazita u 1 ml plodove vode, određen pomoću qPCR u ovom istraživanju kretao se od 8-844 parazita/ml. Ovakav nalaz je razumljiv imajući u vidu da je u gotovo 82% (9/11) slučajeva uspešne molekularne detekcije uzročnika KT u prenatalnom periodu u pitanju bila perikonceptualna (dokazana ili suspektna) infekcija majke. Samim tim, nameće se zaključak da je amniocenteza izvršena mesecima nakon okončanja parazitemije majke i da će stoga paraziti, ukoliko se uopšte detektuju u plodovoj vodi, biti prisutni u malom broju. Mali broj parazita u plodovoj vodi može da bude i posledica rane primene

specifične terapije kod majke, što je ilustrovano podacima Desmonts i Couvreur-a (1974.) koji su, analizom uzoraka posteljice, ukazali na redukciju stope vertikalne transmisije parazita sa 56% na 24% nakon primene terapije spiramicinom u ranoj trudnoći (Desmonts i Couvreur, 1974a). Od 59 trudnica inficiranih *T. gondii* kod kojih je u NRLT obavljena prenatalna dijagnostika infekcije ploda, 64,4% (38/59) nije primalo spiramicin do amnio-/ kordocenteze (qPCR primenjen kod 35/38), 18,6% (11/59) uzimalo je spiramicin mesec dana (qPCR primenjen kod 9/11) a 16,9% (10/59) dva meseca do uzorkovanja (qPCR primenjen kod 6/10). Ishod molekularne dijagnostike bio je pozitivan u 77,8% (7/9) potvrđenih slučajeva u odsustvu terapije spiramicinom, kao i u 100% (3/3) i 100% (1/1) slučajeva u kojima je trudnica lečena mesec dana, odnosno dva meseca do prenatalne dijagnostike. Ovi podaci, potkrepljeni rezultatima statističke analize ( $p=0,345$ , odnosno  $p=0,685$ ), potvrđuju da, kada je reč o qPCR protokolu primenjenom u NRLT u cilju prenatalne dijagnostike KT, rezultati nisu kompromitovani kako samom primenom terapije, tako ni dužinom njenog trajanja.

Od ukupno 55 novorođenčadi obuhvaćenih ovim istraživanjem, dijagnoza KT je postavljena u prenatalnom periodu kod 14,5% (8/55), dok je kod takođe 14,5% (8/55) dijagnoza inicijalno postavljena po rođenju, analizom uzorka neonatalne krvi. Od osam novorođenčadi sa dijagnozom KT postavljenom u neonatalnom periodu, uzorak krvi nije podvrgnut qPCR analizi u jednom slučaju (12,5%; 1/8). Zahvaljujući molekularnoj dijagnostici, KT je identifikovana u 71,4% (5/7) slučajeva u kojima je primenjena, dok je biološki ogled bio pozitivan u jednom slučaju (14,3%; 1/7) u kojem je qPCR bio negativan. Interesantno, zabeležen je i slučaj KT u kojem je, uprkos primeni direktne dijagnostike, dijagnoza postavljena serološkim metodama (14,3%; 1/7).

Iskustva proistekla iz ovog istraživanja potvrđuju da detekcija parazitske DNK iz neonatalne krvi uzorkovane na rođenju ili u prvim danima života, iako skopčana sa mogućim tehničkim poteškoćama (prisustvo inhibitora *Taq* polimeraze u krvi - hem, hemoglobin...), umnogome doprinosi identifikaciji kongenitalno inficirane dece u trenutku kada još uvek nije kasno za primenu specifične terapije. Naime, mada je uspešnost qPCR u identifikaciji *T. gondii* u plodovoj vodi bila (očekivano) viša u odnosu na neonatalnu krv (85% u odnosu na 71,4%), ne treba smetnuti s uma da je primena ove metode doprinela potvrdi dijagnoze kod dva novorođenčeta kod kojih je biološki ogled bio negativan, po svemu sudeći zbog niske koncentracije parazita u krvi

(20 parazita/ml u jednom i 4 parazita/ml u drugom slučaju, određeno pomoću qPCR). Inače, koncentracija parazita u neonatalnoj krvi je na osnovu qPCR procenjena na 3-24 parazita/ml (u proseku 11 parazita/ml; SD=10,15), bez značajnih razlika nakon perikonceptualne infekcije majke (u proseku 14 parazita/ml; SD=14,14) u odnosu na infekcije u III trimestru trudnoće (u proseku 9 parazita/ml; SD=9,54). Primena qPCR u cilju dijagnoze toksoplazmoze kod neonatusa je posebno važna kod infekcija majki u III trimestru, kada se, zbog mogućeg rizika od prevremenog porođaja, retko pristupa amniocentezi (Robert-Gangneux i sar., 1999; Bessieres i sar., 2001; Wallon i sar., 2010). Takođe, molekularna dijagnostika iz krvi novorođenčeta može doprineti rasvetljenju dijagnostičkih nedoumica u slučajevima negativnog ili neubedljivog nalaza molekularnih i drugih metoda u sklopu prenatalne dijagnostike. Međutim, u zemljama u kojima se serološki skrining trudnica i prenatalna dijagnostika KT ne sprovode rutinski, visoko osetljivi qPCR protokoli namenjeni detekciji genetskog materijala parazita u neonatalnoj krvi predstavljaju najbrži vid direktne dijagnostike infekcije deteta na rođenju (Sterkers i sar., 2011).

Kada se najzad sumiraju rezultati metoda direktne dijagnostike KT primenjenih u ovom istraživanju u prenatalnom i postnatalnom periodu, važno je istaći da je statistička analiza rezultata potvrdila nadmoć qPCR u odnosu na biološki ogled. Osetljivost qPCR od 80,0% bila je bezmalo dvostruko viša u odnosu na izolaciju parazita biološkim ogledom (41,7%), dok su specifičnost i PPV obe metode bile identične i maksimalne (100%), čime je iznova potvrđeno da izolacija bilo vijabilnog parazita ili pak genetskog materijala *T. gondii* nedvosmisleno ukazuje na dijagnozu KT. Visoka NPV, odnosno sposobnost testa da pravovremeno isključi dijagnozu KT zavidna je karakteristika qPCR protokola primenjenog u ovom istraživanju (NPV od 91,1%), dok negativan rezultat biološkog oglada neretko nije omogućio odbacivanje KT kao mogućeg krajnjeg ishoda (NPV od 57,6%).

Imunodijagnostički testovi su u ovom istraživanju predstavljali okosnicu indirektno dijagnostike KT kako tokom intrauterusnog razvoja, tako i nakon rođenja deteta. Rezultati detekcije antitela specifičnih za *T. gondii* kod fetusa, odnosno neonatusa predstavljali su najčešće korisnu dopunu nalaza dobijenih direktnim metodama (qPCR i biološki ogled) ali u pojedinim slučajevima i jedini dijagnostički parametar koji je nedvosmisleno ukazivao na KT. Kako za razliku od specifičnih IgG

antitela majke, specifična IgM i IgA antitela ne prolaze placentnu barijeru, njihova detekcija u amnionskoj tečnosti ili u fetalnoj krvi označava fetalni imunski odgovor na infekciju *T. gondii*. Specifična IgM antitela detektovana su u 6% (4/65) prenatalno prikupljenih uzoraka, pri čemu je KT potvrđena u 3% (2/65), dok je u 3% (2/65) slučajeva u pitanju bio lažno pozitivan rezultat (kontaminacija majčinim antitelima). S druge strane, iako određivana u 23% (15/65) uzoraka, detekcija specifičnih IgA antitela doprinela je prenatalnoj dijagnostici KT u 8% (5/65) dok je kontaminacija dokazana u 6% (4/65) slučajeva. Od posebnog značaja je podatak da je od devet uzoraka (kod kojih je direktnom dijagnostikom potvrđena KT) sa detektabilnim IgA antitelima, osam (88,9%) predstavljalo uzorke amnionske tečnosti a svega jedan uzorak (11,1%) fetalnu krv. Za razliku od specifičnih IgM, specifična IgA antitela su detektovana u svih osam uzoraka plodove vode, uprkos činjenici da je prisustvo specifičnih IgM, kao i specifičnih IgA antitela, dokazano u serumu trudnica u vreme amniocenteze. Kako je za detekciju obe klase specifičnih antitela primenjen isti test (ISAgA), ova diskrepanca zasigurno nije uslovljena osobinama dijagnostičke metode. Slična disocijacija u detekciji specifičnih IgM i IgA antitela pokazana je u studijama u kojima je u cilju dijagnostike KT korišćena fetalna (Bessieres i sar., 1992), odnosno neonatalna krv (Bessieres i sar., 2001), ukazujući na često prisustvo specifičnih IgA antitela u uzorcima fetalnih ali i neonatalnih seruma nakon infekcije majki u prvoj polovini trudnoće. Međutim, u dosadašnjoj literaturi nema podataka o prisustvu ovog fenomena u studijama sprovedenim na uzorcima amnionske tečnosti. Interesantno, dijagnoza KT postavljena je direktnim metodama u 50% (4/8) slučajeva u kojima su u plodovoj vodi specifična IgA antitela detektovana u odsustvu specifičnih IgM. Naime, iako neki autori smatraju da su specifična IgA antitela u amnionskoj tečnosti posledica povećane propustljivosti placente usled njene inflamacije i shodno tome, majčinog porekla (Cotty i sar., 1995), moguće je da se ova antitela sintetišu u sklopu fetalnog imunskog odgovora na infekciju *T. gondii* počev od 14. nedelje intrauterusnog razvoja (Cleveland i sar., 1991). Iako je uloga specifičnih IgA antitela u diferencijaciji skorašnje od ranije infekcije trudnice i shodno tome, kao mogućeg markera infekcije fetusa, predmet brojnih kontroverzi (Patel i sar., 1993; Gorgievski-Hrisoho i sar., 1996; Nascimento i sar., 2008), izloženi rezultati predstavljaju dodatni podstrek da se prisustvu specifičnih



IgA antitela u amnionskoj tečnosti pokloni dodatna pažnja i da se ovo pitanje ispita u sklopu opsežnijih prospektivnih studija.

S druge strane, nalaz specifičnih IgM i IgA antitela u uzorku krvi na rođenju je ključni serološki marker intrauterusne infekcije, mada zahteva potvrdu u neonatalnoj krvi 10-14 dana od rođenja, kako bi se isključila kontaminacija majčinim antitelima (fenomen "curenja" antitela kroz posteljicu prilikom porođaja) (Robert-Gangneaux i Darde, 2012). Osetljivost većine komercijalno dostupnih seroloških testova nije adekvatna za uspešnu detekciju specifičnih IgM i IgA antitela u serumu novorođenčeta, dok je ISAgA dokazano najosetljiviji raspoloživi test za detekciju ovih antitela (Desmonts i sar., 1981). Ipak, osetljivost ISAgA testa za detekciju specifičnih IgM, odnosno IgA antitela ne prelazi 70%, odnosno 65% (Naessens i sar., 1999; Robert-Gangneux i sar., 1999; Bessieres i sar., 2001; Gilbert i sar., 2007). U sklopu algoritma koji se primenjuje u cilju postnatalne dijagnostike KT u NRLT, upravo je ISAgA test primenjen za detekciju specifičnih IgM kod svih 55 (100%) novorođenčadi, dok su specifična IgA antitela određivana u uzorcima seruma 65,5% (36/55) novorođenčadi. IgA antitela specifična za *T. gondii*, mada određivana u svega 65,5% novorođenčadi, detektovana su u serumu 56,25% (9/16) kongenitalno inficirane novorođenčadi, dok su specifična IgM detektovana u 37,5% (6/16) slučajeva KT. S druge strane, obe klase antitela detektovane su i kod određenog broja neinficirane novorođenčadi – specifična IgM u 14,3% (1/7) a specifična IgA u 30,7% (4/13). Rezultati statističke analize ukazuju na diskrepantne osobine ISAgA testa u detekciji specifičnih IgM (manje osetljiv ali specifičniji test; osetljivost 37,5%, specifičnost 97,4%) i specifičnih IgA antitela (osetljiviji test niže specifičnosti; osetljivost 56,3% a specifičnost 80%). Dok je nisku specifičnost ISAgA testa moguće prevazići kontinuiranim serološkim praćenjem novorođenčadi u cilju eliminacije kontaminacije uzorka antitelima majke kao potencijalnog uzroka pozitivnog nalaza, povećanje osetljivosti testa je mnogo zahtevniji zadatak. Naime, ISAgA test je u ovom istraživanju ispoljio nižu osetljivost u odnosu na slične studije sprovedene u francuskim referentnim centrima – osetljivost 75,2% u prospektivnom istraživanju Wallon i sar. (2010.) (Wallon i sar., 2010), osetljivost od 73% a specifičnost od 90% u studiji Bessieres i sar. (2009.) (Bessieres i sar., 2009), osetljivost od 80% i specifičnost oko 90% kod Robert-Gangneux i sar. (1999.) (Robert-Gangneux i sar., 1999). Pokazano je, međutim, da su rezultati ISAgA testa u velikoj

meri uslovljeni gestacijskom starošću u trenutku infekcije majke, tako da se specifična IgM i IgA antitela najčešće detektuju kod neonatusa čije su majke inficirane u III trimestru trudnoće (Bessieres i sar., 2009), što bi se moglo objasniti kratkotrajnom i prolaznom sintezom fetalnih IgM odnosno IgA i njihovim iščezavanjem pre rođenja kada se maternalna infekcija dogodi u ranoj trudnoći. Kako je postnatalnoj dijagnostici u ovom istraživanju podvrgnuta novorođenčad 37 žena od kojih je 73% (27/37) inficirano (dokazano ili suspektno) u perikonceptualnom periodu a svega 2,7% (1/37) u III trimestru, kao i novorođenčad 16 porodilja inficiranih u perikonceptualnom periodu u 37,5% a u III trimestru u 18,7% slučajeva, ne čudi odsustvo detekcije pre svega specifičnog IgM imunskog odgovora novorođenčadi. Takođe, uspješnija detekcija specifičnih IgA kod novorođenčadi obuhvaćene ovim ispitivanjem u saglasnosti je sa nalazima studije Bessieres i sar. (2001.) koji ukazuju na češću detekciju specifičnih IgA kod dece majki inficiranih u ranoj trudnoći (Bessieres i sar., 2001). S druge strane, ovakvi nalazi u postnatalnom periodu indirektno potenciraju značaj prenatalne detekcije specifičnih IgM i IgA antitela (u plodovoj vodi, odnosno fetalnoj krvi), kojom bi se pravovremeno demonstrirala intrauterusna sinteza ovih antitela od strane inficiranog fetusa, pre svega kod sumnje na infekciju u ranoj trudnoći odnosno u perikonceptualnom periodu.

Drugi mogući razlog niže osetljivosti detekcije specifičnih IgM i IgA antitela kod novorođenčadi potencijalno leži u supresiji fetalnog imunskog odgovora pod uticajem antitoksoplazmatske terapije majke, što je sugerisala jedna multicentrična evropska studija (Naessens i sar., 1999), dok je u francuskoj studiji sprovedenoj deset godina kasnije pokazana niža osetljivost detekcije specifičnih IgM antitela kod neonatusa čije su majke lečene kombinovanom terapijom pirimetamin-sulfadiazin (PYR-SDZ) u odnosu na novorođenčad čije su majke primale samo spiramicin (Robert-Gangneux i sar., 2010). Kako je kod svih trudnica ispitanih u NRLT kod kojih je bila utvrđena ili suspektna infekcija u trudnoći ili perikonceptualnom periodu preporučena terapija spiramicinom koja je, u slučaju prenatalne dijagnoze KT bila zamenjena kombinacijom PYR-SDZ (uz dodatak folinske kiseline), ne može se zanemariti mogući uticaj terapije KT u prenatalnom periodu na smanjenje osetljivosti ISAgA testa u uzorcima seruma novorođenčadi.

Kako se IgG antitela pasivno transmituju *in utero*, iz cirkulacije majke u cirkulaciju ploda, kvantitativni testovi za njihovu detekciju nisu od velike pomoći u dijagnozi fetalne infekcije pošto uglavnom reprezentuju transmitovana antitela bez mogućnosti potvrde eventualne neosinteze specifičnih IgG od strane fetusa/neonatusa. Time je akcentovan značaj primene kvalitativnih testova koji nude mogućnost diferencijacije majčinih, transmitovanih antitela od *in utero* neosintetisanih i detektovanih u serumu inficiranog neonatusa. Komparativna *Western blot* (WB) analiza seroloških IgG i IgM profila majke i novorođenčeta poređenjem rasporeda bendova i šablona precipitacije od posebnog je značaja za dijagnozu intrauterusne infekcije u odsustvu detektabilnih specifičnih IgM i IgA kod neonatusa visoko osetljivim ISAgA testom (Remington i sar., 1985; Remington i sar., 2004). U sklopu postnatalne dijagnostike KT u NRLT, kod novorođenčadi sa pozitivnim WB nalazom zabeleženo je odsustvo detektabilnih specifičnih IgM antitela u 22,2% (2/9), specifičnih IgA u 11,1% (1/9) a odsustvo specifičnih antitela obe klase u 11,1% (1/9; perikonceptualna infekcija majke) slučajeva. Osetljivost WB testa primenjenog u ovom istraživanju iznosila je 64,3%, specifičnost i PPV 100% a NPV 83,9%. Ovi rezultati saglasni su sa podacima iz studije Tissot-Dupont i sar. (2003.) koji su pokazali veću osetljivost i specifičnost WB analize u odnosu na IgM-ISAgA test primenjen u neonatalnom periodu (osetljivost od 86,9% naspram 69,6% i specifičnost od 96,1% naspram 92,2%) (Tissot Dupont i sar., 2003). U ovom istraživanju, WB testom potkrepljena je prenatalna dijagnoza KT kod 7,3% (4/55), odnosno postnatalna dijagnoza kod 9,1% (5/55) ukupno ispitivane novorođenčadi. Ipak, nalaz WB testa bio je negativan kod 9,1% (5/55) novorođenčadi kod kojih je toksoplazmoza potvrđena direktnim metodama. Interesantno, majke novorođenčadi sa lažno negativnim WB nalazom inficirane su u perikonceptualnom periodu, potvrđeno (5,5%) ili suspektno (3,6%). Kako je u svim slučajevima nalaz potvrđen qPCR analizom, ovaj rezultat predstavlja svojevrsnu potvrdu nadmoći molekularne nad serološkom dijagnostikom kod infekcija u ranoj trudnoći, odnosno pre začeća. Ipak, ne sme se zanemariti činjenica da je ovaj test posebno značajan u dijagnostici KT na rođenju, odnosno u prva tri meseca života, kao i u potvrdi kontaminacije krvi iz pupčanika majčinom krvlju, što rezultira identičnim IgM obrascima. U slučaju dobre komplijanse sa specifičnom terapijom primenjene kod inficiranog deteta na rođenju (PYR-SDZ-FA), WB testom može se detektovati gubitak

intenziteta obojenosti bendova koji predstavljaju neosintetisana antitela, mada je pad koncentracije potrebno verifikovati odgovarajućim kvantitativnim testovima (IgM-ISAgA, odnosno HSDA test).

Na kraju razmatranja sveukupnih rezultata dobijenih uvođenjem qPCR u dijagnostički algoritam KT, odnosno doprinosa molekularne dijagnostike pravovremenom otkrivanju i lečenju kongenitalno inficirane dece, treba naglasiti da gotovo tri četvrtine potvrđenih slučajeva KT (72%) u ovom istraživanju predstavlja posledicu dokazane vertikalne transmisije infekcije nakon perikonceptualne infekcije majke na plod. Kako je optimizacija qPCR protokola za dijagnostiku toksoplazmoze, uz ispunjenje adekvatnih tehničkih uslova, zahtevala značajno vreme za evaluaciju i validaciju rezultata, od ukupno 25 slučajeva KT identifikovanih ovim istraživanjem, molekularne metode nisu primenjene u 20% (5/25). Inkorporacijom qPCR u dijagnostički algoritam pružen je dragocen doprinos unapređenju prenatalne (85%; 11/13) ali i postnatalne dijagnostike KT (71,4%; 5/7), čime je omogućena promptna dijagnoza (unutar 24h od dopremanja uzorka u NRLT) i pravovremeno započinjanje specifične terapije.

Druga kategorija vulnerabilnih bolesnika kod kojih je u ovom radu ispitivan značaj primene molekularne dijagnostike toksoplazmoze obuhvata primaoce matičnih ćelija hematopoeze. Infekcija *T. gondi* posle transplantacije matičnih ćelija hematopoeze može biti neposredan uzrok smrtnog ishoda.

Za razliku od primalaca solidnih organa kod kojih je presađeni organ (transplantat) čest izvor infekcije, toksoplazmoza primalaca HSC po pravilu predstavlja reaktivaciju latentne (hronične) infekcije. Usled prolongirane duboke imunosupresije prestaje imunska kontrola nad parazitom koja je održavala infekciju u stanju latencije, te dolazi do rupture tkivnih cista, oslobađanja bradizoita i njihove konverzije u tahizoite koji se potom krvotokom diseminuju po čitavom organizmu (Derouin i sar., 1992; Remington i sar., 2001; Lyons i sar., 2002). Tok infekcije je neretko fulminantan, kliničke manifestacije zavisne od organa u kome je došlo do ekscistacije parazita, a rezultati seroloških testova zbog imunosupresije nedovoljno informativni, zbog čega je pravovremena dijagnoza pre uvođenja molekularnih metoda bila veoma otežana,

neretko se svodeći na histopatološku potvrdu u tkivu uzorkovanom prilikom autopsije (Slavin i sar., 1994).

Autologna transplantacija HSC retko se komplikuje reaktivacijom infekcije *T. gondii*. Nasuprot tome, transplantacioni protokoli kod alogene HSCT podrazumevaju prolongiranu primenu imunosupresivnih lekova, zbog čega je rizik od reaktivacije toksoplazmoze kod seropozitivnih primalaca visok. Reaktivacioni rizik se kod latentno inficiranih primalaca alogenih HSC dodatno uvećava ukoliko davalac HSC nikada nije bio u kontaktu sa *T. gondii*. Našim istraživanjem je obuhvaćeno ukupno 25 primalaca HSCT kod kojih je potencijalni rizik od reaktivacije infekcije procenjen pretransplantacionim serološkim ispitivanjem. Antitela specifična za *T. gondii* detektovana su kod 72% (18/25) bolesnika. HSCT je urađena kod 92% bolesnika (23/25) i to alogena kod 78,3% (18/23) a autologna kod 21,7% (5/23). Zbog potencijalnog doprinosa seronegativnog statusa davaoca razvoju reaktivacije, pre transplantacije je serološki ispitano i 83,3% (15/18) davalaca HSC dostupnih za ispitivanje na toksoplazmozu, pri čemu je serološka nepodudarnost R+/D- (seropozitivan primalac/seronegativan davalac) detektovana u 50% (9/18) alogenih HSCT, ukazujući na visok reaktivacioni rizik.

Reaktivacija toksoplazmoze je detektovana primenom qPCR kod ukupno 17,6% seropozitivnih primalaca HSC (tačnije kod 20% seropozitivnih bolesnika podvrgnutih alogenoj HSCT, od kojih je kod 33,3% urađena HSCT od identičnog/podudarnog srodnog davaoca). Ovakva incidenca reaktivacije nešto je viša od incidence zabeležene u multicentričnoj prospektivnoj studiji tokom koje je reaktivacija detektovana molekularnim metodama u 16% od ukupno 106 seropozitivnih primalaca, dok je diseminovana forma bolesti registrovana kod 38% reaktiviranih bolesnika (Martino i sar., 2005). Diseminacija infekcije praćena dramatičnim kliničkim manifestacijama plućne toksoplazmoze počev od 14-og post-HSCT dana sa fulminantnim tokom bolesti zabeležena je kod jednog od tri bolesnika kod kojih je došlo do reaktivacije. To je interesantno, jer podaci iz literature pokazuju da ukoliko se reaktivacija toksoplazmoze klinički manifestuje (što nije uvek slučaj), simptomi se najčešće zapažaju u prva 2-4 meseca nakon transplantacije (Derouin i sar., 2008), u proseku tokom prva 64 dana (Martino i sar., 2000), dok se u manje od 10% slučajeva ispoljavaju u prvih mesec dana (Derouin i sar., 2008). Iako je zbog predilekcije *T.*

*gondii* ka moždanom tkivu toksoplazmatski encefalitis najčešća inicijalna manifestacija, neretko su pluća žarište reaktivacije, sa sledstvenim pneumonitisom i akutnom respiratornom insuficijencijom. Već je zapaženo da, ukoliko se plućna toksoplazmoza razvije unutar 30 dana od HSCT, u odsustvu rapidne dijagnostike (i sledstvene terapije), postoji velika opasnost od brze diseminacije i fatalnog ishoda (Chandrasekar i sar., 1997; Mulanovich i sar., 2011). Kako nespecifična i plejotropna simptomatologija praktično onemogućava adekvatnu kliničku dijagnozu, okosnicu pravovremenog prepoznavanja reaktivacije predstavlja laboratorijska dijagnostika.

Tokom ovog istraživanja, u sva tri slučaja detektovane reaktivacije nakon alogene HSCT u pitanju je bilo serološko R+/D- neslaganje (eng. *mismatch*). Zapravo, na osnovu podataka proisteklih iz svih dosadašnjih relevantnih prospektivnih studija, serološki *mismatch* (eng.) povezan je sa čak 80% zabeleženih slučajeva reaktivacije toksoplazmoze u post-HSCT periodu (Derouin i sar., 1992; Martino i sar., 2005).

Koliko god serološki skrining bio od presudnog značaja za pretransplantacionu procenu reaktivacionog rizika, toliko je serološko ispitivanje u posttransplantacionom periodu, zbog imunosupresije, dijagnostički nepouzđano. Specifična IgM i IgA antitela detektuju se veoma retko (Fricker-Hidalgo i sar., 2008), dok je porast u koncentraciji specifičnih IgG antitela uglavnom nedetektabilan. Kod najvećeg broja bolesnika, koncentracija specifičnih IgG antitela je tokom reaktivacije (čak i u prisustvu izražene kliničke simptomatologije) niža od pretransplantacionih vrednosti (Derouin i sar., 1992), dok njihov visok aviditet potvrđuje da je reč o imunskoj memoriji a ne o inicijalnom imunskom odgovoru. Ove manjkavosti indirektno dijagnostike u stanju imunosupresije potvrđene su i nalazima bolesnika sa reaktivacijom koji su ispitivani u NRLT. Iz svih ovih podataka sledi da se dijagnoza reaktivirane toksoplazmoze nužno mora bazirati na direktnim metodama izolacije vijabilnih parazita ili parazitske DNK iz krvi, telesnih tečnosti ili tkiva bolesnika. U eri molekularne dijagnostike, metode bazirane na PCR detekciji genetskog materijala parazita preuzele su primat nad konvencionalnim metodama koje su danas, zbog niske osetljivosti (direktna mikroskopija) i višenedeljnog iščekivanja rezultata (biološki ogled), gotovo napuštene.

Pravovremena primena PCR tehnike omogućava detekciju i veoma malog broja parazita u krvi, kada je šansa za uspeh specifične terapije najveća (Bretagne i sar.,

2000; Martino i sar., 2005, Meers i sar., 2010). S druge strane, mada negativan PCR rezultat ne isključuje u potpunosti reaktivaciju, ima visoku negativnu prediktivnu vrednost (Martino i sar., 2005). Primena savremene qPCR tehnike omogućava ne samo detekciju niskih koncentracija parazitske DNK u krvi i telesnim tečnostima već i kvantifikaciju, koja ima ne samo prognostički značaj već predstavlja i vrlo efikasan vid praćenja efekta specifične terapije. Ova svojstva qPCR direktno su potvrđena u našem istraživanju kod pacijenata sa asimptomatskom reaktivacijom infekcije, detekcijom svega 6 parazita/ml krvi i potpunim odsustvom *T. gondii* u tri sukcesivna uzorka periferne krvi kod jednog od tri bolesnika, kao i rastućom parazitemijom do primene specifične terapije kod drugog bolesnika. S druge strane, broj parazita detektovan u krvi i BAL-u trećeg bolesnika kod kojeg se reaktivacija manifestovala progresivnom toksoplazmozom pluća bio je daleko veći od parazitemije dokumentovane u drugim studijama baziranim na dijagnostici i posttransplantacionom praćenju primenom qPCR (Martino i sar., 2005; Patrat-Delon i sar., 2010). Visoka koncentracija parazita u telesnim tečnostima korelirala je sa težinom kliničkih manifestacija u trenutku dijagnoze, dok je značajno smanjenje broja parazita u sukcesivnom uzorku krvi (nakon devet dana) predstavljalo rezultat primene specifične terapije (TMP-SMX i klindamicin), kako je opisano u literaturi (Martino i sar., 2005; Patrat-Delon i sar., 2010). Preporuka je da se u slučaju suspektne reaktivacije toksoplazmoze monitoring sprovodi najmanje jednom u dve nedelje tokom prvih 100 posttransplantacionih dana (dakle, tokom perioda intenzivne imunosupresije i shodno tome, maksimalnog rizika od reaktivacije) i to qPCR analizom uzorka periferne krvi (Bretagne i sar., 2000; Martino i sar., 2005; Meers i sar., 2010; Patrat-Delon i sar., 2010; Mulanovich i sar., 2011; Busemann i sar., 2012). Kod dokazane reaktivacije, preporučljivo je da se praćenje pomoću qPCR sprovodi češće, odnosno bar jednom nedeljno kako bi se pratio efekat primenjene terapije na smanjenje broja parazita u krvi bolesnika. Međutim, monitoring je u slučaju našeg bolesnika sa fulminantnim tokom plućne toksoplazmoze bio onemogućen jer je smrtni ishod nastupio 39-og post-HSCT dana. Autopsija nije izvršena, tako da *T. gondii* nije potvrđena kao uzrok smrti ali se prema podacima iz literature može smatrati da je bila doprinoseći faktor u nastupanju smrtnog ishoda (Matsuo i sar., 2000).

Kada je reč o profilaksi reaktivirane toksoplazmoze, u stručnoj javnosti nema zajedničkog stanovišta kako po pitanju određenih antibiotika ili njihovih kombinacija, tako ni po pitanju vremena primene, trajanja i čak, potencijalne koristi od primenjene profilakse. Ovaj problem dodatno otežava činjenica da idealan antitoksoplazmatski lek čija bi primena dovela do eradikacije tkivnih cista prisutnih u latentnoj infekciji - ne postoji. Savremena terapija ograničena je na primenu lekova koji su aktivni jedino protiv tahizoita i samim tim, usmerena na prevenciju i lečenje diseminacije infekcije. Mada najefikasnija protiv *T. gondii*, kombinacija (PYR-SDZ) zbog potencijalnog mijelotoksičnog efekta ne može biti primenjena u profilaksi kod primalaca HSC (Foot i sar., 1994). U transplantacionim centrima u Evropi i SAD danas se najčešće primenjuje profilaksa trimetoprim-sulfametoksazolom (TMP-SMX), koja je istovremeno i profilaksa *P. jirovecii* (Bretagne i sar., 2000; Martino i sar., 2005; Cavattoni i sar., 2010; Busemann i sar., 2012, Bautista i sar., 2012). Ukoliko posttransplantacioni tok dozvoljava, TMP-SMX se primenjuje tokom najmanje šest meseci nakon transplantacije, odnosno sve dok je odgovor imunskog sistema na infekciju suprimiran terapijom u cilju sprečavanja odbacivanja kalema. Preporučuje se i redovni qPCR monitoring iz periferne krvi, čime se omogućava (u slučaju qPCR analizom potvrđene reaktivacije) pravovremeni prelazak na terapiju PYR-SDZ (Martino i sar., 2005), pirimetamin-klindamicinom (PYR-CLI) (Meers i sar., 2010) ili na visokodozni režim TMP-SMX, obično tokom 4-6 nedelja, odnosno do dobijanja dva uzastopna negativna qPCR nalaza. Komplijansa je osnovni problem u primeni medikamentne profilakse, pre svega zbog potencijalno ozbiljnih neželjenih efekata (mijelotoksičnost, hepatotoksičnost, nefrotoksičnost...). Zbog mogućeg negativnog uticaja na prihvatanje kalema (eng. *engraftment*), kao i zbog potencijalne mijelotoksičnosti, profilaksa se posle HSCT započinje tek posle prihvatanja kalema granulocitne i megakariocitne loze (Chandrasedkar i sar., 1997; Meers i sar., 2010), što je praksa i u transplantacionom centru u kojem su lečeni bolesnici obuhvaćeni ovim istraživanjem. Kod najvećeg broja bolesnika prihvatanje kalema datih HSC registruje se u prvih 30 dana od HSCT, a kako se daleko najčešće (u preko 90% slučajeva) toksoplazmoza reaktivira po isteku ovog perioda (Derouin i sar., 2008), odluka o odlaganju profilakse je, sa medicinske tačke gledišta, opravdana. Međutim, kod dva od tri bolesnika sa toksoplazmatskom reaktivacijom obuhvaćena ovom studijom, dijagnoza je postavljena pomoću qPCR 14-



og, odnosno 21-og post-HSCT dana, dok je kod svega jednog od tri bolesnika reaktivacija nastupila tri meseca nakon transplantacije. Kod sva tri bolesnika zabeležena je i pojava bolesti "kalem protiv domaćina" (eng. *graft versus host disease*, GVHD) zbog čije je kontrole imunosupresivna terapija intenzivirana, što je moglo usloviti ranu reaktivaciju infekcije (Derouin i sar., 1992; Martino i sar., 2000). Do prihvatanja kalema došlo je samo kod jednog bolesnika, što je omogućilo primenu profilakse od 18-og posttransplantacionog dana kojom je infekcija stavljena pod kontrolu, mada je krajnji ishod HSCT bio neuspešan (odbacivanje kalema). Kako je kod preostala dva bolesnika reaktivacija toksoplazmoze i posledična primena TMP-SMX prethodila odbacivanju kalema, moguće je da je i to bio jedan od doprinosećih faktora krajnjeg fatalnog ishoda.

Iz svih navedenih podataka sledi da odluka o odlaganju profilakse do prihvatanja kalema zahteva praćenje qPCR analizom uzoraka periferne krvi primalaca na nedeljnom nivou. Ovim se omogućava, u slučaju detekcije DNK parazita, pravovremena primena specifične terapije kojom se u 80% slučajeva prevenira fatalni ishod izazvan toksoplazmozom (Bretagne i sar., 2000; Martino i sar., 2005; Meers i sar., 2010).

Ovaj rad predstavlja prve rezultate organizovane primene savremenih molekularnih metoda u postojećem algoritmu dijagnostike KT u Srbiji koji se do uvođenja i optimizacije aktuelnog qPCR protokola bazirao na metodama konvencionalne dijagnostike. Osim što je doprineo brzom i preciznoj dijagnozi infekcije *T. gondii* i pre rođenja deteta, više nego i jedna metoda do sada, primena qPCR u dijagnostici KT omogućila je ne samo pravovremeno lečenje u slučaju pozitivnog nalaza već i smanjenje broja nepotrebno lečenih trudnica odnosno novorođenčadi u slučaju negativnog qPCR nalaza. Takođe, ovo istraživanje predstavlja i prvu organizovanu primenu molekularne metodologije u cilju dijagnoze reaktivacije latentne toksoplazmoze nakon HSCT ali i organizovani monitoring efekta specifične terapije reaktivirane toksoplazmoze pomoću qPCR. Prikazani rezultati nedvosmisleno ukazuju na doprinos kontinuiranog praćenja primalaca HSC qPCR analizom uzoraka periferne krvi smanjenju stope reaktivacije infekcije *T. gondii*, pre svega pravovremenom primenom medikamentne profilakse, shodno qPCR nalazu. Rezultati ovog istraživanja ukazuju i na povoljan efekat primene specifične terapije na smanjenje obima parazitemije, nezavisno od toga da li je reaktivacija praćena kliničkim simptomima.

Stoga, rezultati proistekli iz ovog rada predstavljaju smernicu za pravovremeno otkrivanje potencijalno devastirajuće oportunističke infekcije a time i unapređenje zdravstvene zaštite bolesnika nakon uspešno izvedenih transplantacija matičnih ćelija hematopoeze.

**ZAKLJUČCI**

Na osnovu rezultata opsežnog istraživanja kliničkog značaja molekularne u odnosu na konvencionalnu dijagnostiku kod visokorizičnih bolesnika, iz dela u kojem je procenjivan doprinos molekularne detekcije *T. gondii* u sklopu prenatalne i postnatalne dijagnostike KT, izvedeni su sledeći zaključci:

1. U cilju unapređenja dijagnostike toksoplazmoze kod visokorizičnih bolesnika, u ovom istraživanju primenjen je optimizovani qPCR protokol. Na osnovu rezultata učešća NRLT u programu kontrole kvaliteta molekularne dijagnostike (QCMD), verifikovana je osetljivost metode u granicama detekcije 1 parazita/ml biološkog materijala.

2. Prenatalna dijagnoza KT postavljena je u 85% slučajeva pomoću qPCR. Molekularna dijagnostika pokazala se uspešnijom od konvencionalne u ispitivanju uzoraka plodove vode sa niskom koncentracijom parazita (od 8 parazita/ml, u proseku 29 parazita/ml plodove vode). Interesantno, pomoću qPCR uspešno je postavljena dijagnoza KT ploda u 87,5% dokazane i 40,0% slučajeva suspektne perikonceptualne infekcije majke. Plodova voda je i ovim istraživanjem potvrđena kao optimalan materijal za molekularnu dijagnostiku.

3. Terapija spiramicinom ne utiče na efikasnost molekularne dijagnostike u prenatalnom periodu. KT je dijagnostikovana pomoću qPCR u svim slučajevima vertikalne transmisije u kojima su majke lečene spiramicinom do amnio-/kordocenteze, bez obzira na dužinu terapije.

4. Molekularna dijagnostika u ranom postnatalnom periodu doprinela je potvrdi KT u 71,4% ispitivane novorođenčadi suspektne na intrauterusnu infekciju. Iako je uspešnost detekcije bila nešto niža u odnosu na prenatalnu dijagnostiku, važno je istaći da su koncentracije parazita u neonatalnoj krvi (određene pomoću qPCR) bile čak niže od onih u ispitivanim uzorcima plodovih voda (u rasponu od 3-24 parazita/ml, u proseku 11 parazita/ml krvi), čime se može objasniti odsustvo težih kliničkih manifestacija kod inficirane dece.

5. Osetljivost qPCR od 80,0%, uz 100% specifičnost i PPV potvrdila je nadmoć molekularne u odnosu na konvencionalnu direktnu dijagnostiku KT (osetljivost biološkog oglada od 41,7%). Visoka NPV, odnosno sposobnost testa da pravovremeno isključi dijagnozu KT zavidna je karakteristika qPCR protokola primenjenog u ovom istraživanju (NPV od 91,1%), dok negativan rezultat biološkog oglada neretko nije omogućio odbacivanje KT kao mogućeg krajnjeg ishoda (NPV od 57,6%).

6. Mada je u najvećem broju slučajeva biološki ogled doprineo potvrdi dijagnoze postavljene pomoću qPCR, u 11,8% prenatalno (u 50% materijal je bila fetalna krv) i 12,5% postnatalno (neonatalna krv) dijagnostikovanih KT biološki ogled bio je pozitivan uprkos negativnom nalazu molekularne dijagnostike. Ovi rezultati pokazuju da ukoliko se kao materijal za dijagnostiku KT koristi krv (fetalna ili neonatalna), nužno je primeniti i biološki ogled.

7. Dokazivanje specifičnih IgA antitela u plodovoj vodi pokazalo se informativnim u cilju detekcije fetalnog imunskog odgovora na infekciju, posebno kod infekcija majki u perikonceptualnom periodu, dok se detekcija IgM antitela pokazala nedovoljno osetljivom, jer su specifična IgA detektovana u odsustvu specifičnih IgM antitela. Takođe, mada su specifična IgA antitela (za razliku od specifičnih IgM) ispitivana kod svega 2/3 novorođenčadi suspektne na KT, detektovana su kod 56,25% inficiranih (osetljivost 56,3%, specifičnost 80,0%), dok su specifična IgM nađena kod 37,5% (osetljivost 37,5%, specifičnost 97,4%). Stoga se može zaključiti da je, pored WB testa, određivanje specifičnih IgA antitela glavni dopunski parametar za imunodijagnostiku KT.

8. Komparativna WB analiza uporednih IgG/IgM profila majke i novorođenčeta, kao i sukcesivnih neonatalnih uzoraka u odnosu na uzorak seruma na rođenju, pokazala se uspešnijom od kvantitativnih seroloških metoda u dijagnostici KT na rođenju, odnosno u prva tri meseca života. WB se pokazao jednako uspešnim u potvrdi prenatalne (9,1%) kao i postnatalne dijagnoze KT (9,1%), ali je korist od WB testa bila posebno evidentna u slučaju nedektabilnih specifičnih IgM i IgA antitela. Osetljivost WB testa od 64,3% viša je od osetljivosti IgM- ali i IgA-ISAgA testa, dok je specifičnost jednaka onoj kod direktnih dijagnostičkih metoda (100%).

9. Kod većine trudnica koje su ispitivane u cilju procene rizika po plod, vreme infekcije je određeno na perikonceptualni period (70%). Perikonceptualna infekcija majke rezultirala je KT ploda u gotovo trećini slučajeva (29%), što ukazuje na prolongirani inkubacioni period.

10. Serološkim ispitivanjem trudnica otkrivena su odstupanja u uobičajenoj dinamici specifičnih antitela kod više od četvrtine slučajeva (27%). Najučestalija je bila pojava rezidualnih specifičnih IgM antitela (14,3%) i, u manjoj meri, usporenog sazrevanja aviditeta specifičnih IgG antitela (6,3%). Detektovane neobičnosti, u kontekstu podatka da većina trudnica biva upućena na inicijalno ispitivanje u NRLT u podmakloj trudnoći (61,25% u II i 16,25% u III trimestru), zahtevaju utvrđivanje preciznih kriterijuma za

određivanje vremena infekcije u odnosu na začće, na osnovu kojeg se procenjuje potreba za prenatalnom dijagnostikom KT u konkretnom slučaju.

Na osnovu rezultata dela istraživanja u kojem je procenjivan doprinos molekularne detekcije *T. gondii* u sklopu dijagnostike reaktivacije latentne infekcije posle HSCT, izvedeni su sledeći zaključci:

11. Reaktivacija toksoplazmoze je detektovana kod ukupno 17,6% seropozitivnih primalaca HSC, tačnije kod 20% seropozitivnih bolesnika podvrgnutih alogenoj HSCT, od kojih je kod 33,3% urađena HSCT od identičnog/podudarnog srodnog davaoca, što je značajno češće nego što je opisano u literaturi. Jedan od faktora rizika za nastanak reaktivacije je seronegativan status davaoca HSC.

12. Ispitivanje serološkog statusa infekcije *T. gondii* kod potencijalnih davalaca i primalaca HSC u pretransplantacionom periodu omogućilo je procenu rizika za reaktivaciju toksoplazmoze posle HSCT.

13. Ispitivanje dinamike specifičnih IgM, IgA i IgG antitela kod primalaca nakon transplantacije nije od značaja za dijagnozu reaktivacije toksoplazmoze.

14. Primena molekularne dijagnostike pokazala se superiornom u ranoj detekciji reaktivacije, čak i u prisustvu veoma malog broja parazita u krvi. Pokazana je i korelacija broja parazita u ispitivanom biološkom materijalu sa težinom kliničke slike reaktivacije.

15. Primena optimizovanog qPCR protokola omogućila je i praćenje terapijskog efekta. Povoljan efekat primećen je kod svih bolesnika sa reaktivacijom nekoliko dana po započinjanju antitoksoplazmatske terapije.

Na kraju, opšti zaključak ovog rada je da su rezultati ovog istraživanja omogućili unapređenje postojećeg algoritma dijagnostike toksoplazmoze u Srbiji, određivši mesto molekularnih u odnosu na konvencionalne (serološke i parazitološke metode) u dijagnostici KT kao i u dijagnostici posttransplantacione reaktivacije infekcije, čime ova teza predstavlja doprinos kako ostvarenju zdravog potomstva tako i transplantacionoj medicini u Srbiji.

# **LITERATURA**

- Ajzenberg D, Cogne N, Paris L, Bessieres MH, Thulliez P, Filisetti D, Pelloux H, Marty P, Darde ML (2002): Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis* 186, 5: 684-689.
- Alford CA Jr, Stagno S, Reynolds DW (1974): Congenital toxoplasmosis: clinical, laboratory and therapeutic considerations with special reference to subclinical disease. *Bull N Y Acad Med* 50, 2: 160-181.
- Aramini JJ, Stephen C, Dubey JP, Engelstoft C, Schwantje H, Ribble CS (1999): Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Epidemiol Infect* 122, 2: 305-315.
- Araujo FG, Barnett EV, Gentry LO, Remington JS (1971): False-positive anti-*Toxoplasma* fluorescent-antibody tests in patients with antinuclear antibodies. *Appl Microbiol* 22, 3: 270-275.
- Ardoin P, Couzineau P, Baufine-Ducrocq H (1967): Sur l'utilisation du sarcome T.G. 180 pour l'obtention d'une suspension riche en *Toxoplasma gondii* extracellulaires. *C R Soc Biol* 161: 117-119.
- Aspöck H, Pollak A (1992): Prevention of prenatal toxoplasmosis by serological screening of pregnant women in Austria. *Scand J Infect Dis* S84: 32-38.
- Balasundaram MB, Andavar R, Palaniswamy M, Venkatapathy N (2010): Outbreak of acquired ocular toxoplasmosis involving 248 patients. *Arch Ophthalmol* 128: 28-32.
- Bastien P, Jumas-Bilak E, Varlet-Marie E, Marty P (2007): Three years of multi-laboratory external quality control for the molecular detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid in France. *Clin Microbiol Infect* 13: 430-433.
- Bautista G, Ramos A, Foré R, Regidor C, Ruiz E, de Laiglesia A, Navarro B, Bravo J, Portero F, Sanjuan I, Fernandez MN, Cabrera R (2012): Toxoplasmosis in cord blood transplantation recipients. *Transpl Infect Dis* 0: 1-6.
- Berger F, Goulet V, Le Strat Y, Desenclos JC (2008): Toxoplasmosis chez les femmes enceintes en France: evolution de la seroprevalence et de l'incidence et facteurs associes, 1995-2003. *Bull Épidémiol Hebd* 14, 15: 117-121.
- Bessières MH, Roques C, Berrebi A, Barre V, Cazaux M, Seguela JP (1992): IgA antibody response during acquired and congenital toxoplasmosis. *J Clin Pathol* 45: 605-608.



- Bessières MH, Berrebi A, Rolland M, Bloom MC, Roques C, Cassaing S, Courjault C, Séguéla JP (2001): Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests. *Eur J Obstet Gyn R B* 94, 1: 37–45.
- Bessières MH, Berrebi A, Cassaing S, Fillaux J, Cambus JP, Berry A, Assouline C, Ayoubi JM, Magnaval JF (2009): Diagnosis of congenital toxoplasmosis: prenatal and neonatal evaluation of methods used in Toulouse University Hospital and incidence of congenital toxoplasmosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 2: 389–392.
- Black MW, Boothroyd JC (2000): Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 607–623.
- Bobić B, Šibalić D, Djurković-Djaković O (1991): High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary toxoplasma infection. Case report. *Gynecol Obstet Invest* 31: 182-184.
- Bobić B, Jevremović I, Marinković J, Šibalić D, Djurković-Djaković O (1998): Risk factors for *Toxoplasma* infection in a reproductive age female population in the area of Belgrade, Yugoslavia. *Eur J Epidemiol* 14, 6: 605-610.
- Bobić B, Nikolić A, Djurković-Djaković O (2003): [Identification of risk factors for infection with *Toxoplasma gondii* in Serbia as a basis of a program for prevention of congenital toxoplasmosis]. *Srp Arh Celok Lek* 131, 3-4: 162-167.
- Bobić B, Nikolić A, Klun I, Vujanić M, Djurković-Djaković O (2007): Undercooked meat consumption remains the major risk factor for *Toxoplasma* infection in Serbia. *Parassitologia* 49, 4: 227–230.
- Bobić B, Klun I, Vujanić M, Nikolić A, Ivović V, Živković T, Djurković-Djaković O (2009): Comparative evaluation of three commercial *Toxoplasma*-specific IgG antibody avidity tests and significance in different clinical settings. *J Med Microbiol* 58, 3: 358-364.
- Bobić B, Nikolić A, Klun I, Djurković-Djaković O (2011): Kinetics of *Toxoplasma* infection in the Balkans. *Wien Klin Wochenschr* 123, Suppl 1, 2-6.
- Boumahni B, Randrianivo H, Flodrops H, Kauffmann E, Sauve F, Chauvet O, Renouil M, Fourmaintraux A (2004): [Maternal toxoplasmosis before conception and chorioretinitis in twin sisters]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 33, 3: 248-250.
- Bretagne S, Costa J-M, Fleury-Feith J, Poron F, Dubreuil-Lemaire M-L, Vidaud D (1995): Quantitative competitive PCR with bronchoalveolar lavage fluid diagnosis of toxoplasmosis in AIDS patients. *J Clin Microbiol* 33: 1662-1664.

- Bretagne S, Costa JM, Foulet F, Jabot-Lestang L, Baud-Camus F, Cordonnier C (2000): Prospective study of toxoplasma reactivation by polymerase chain reaction in allogeneic stem-cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2, 3: 127-132.
- Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC (1989): Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27, 8: 1787-1792.
- Busemann C, Ribback S, Zimmermann K, Sailer V, Kiefer T, Schmidt CA, Schulz K, Steinmetz I, Dombrowski F, Dölken G, Krüger WH (2012): Toxoplasmosis after allogeneic stem cell transplantation - a single centre experience. *Ann Hematol* 91, 7: 1081-1089.
- Calderaro A, Piccolo G, Gorrini C, Peruzzi S, Zerbini L, Bommezzadri S, Dettori G, Chezzi C (2006): Comparison between two real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*. *Acta Biomed* 77, 2: 75-80.
- Cavattoni I, Ayuk F, Zander AR, Zabelina T, Bacher A, Cayroglu E, Knospe V, Illies T, Aepfelbacher M, Richard G, Kröger N, Bacher U (2010): Diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection after allogeneic stem cell transplant can be difficult and requires intensive scrutiny. *Leuk Lymphoma* 51, 8: 1530-1535.
- Chandrasekar PH, Momin F (1997): Disseminated toxoplasmosis in marrow recipients: a report of three cases and a review of the literature. Bone Marrow Transplant Team. *Bone Marrow Transplant* 19, 7: 685-689.
- Cleveland MG, Bakos MA, Pyron DL, Rajaraman S, Goldblum RM (1991): Characterization of secretory component in amniotic fluid. Identification of new forms of secretory IgA. *J Immunol* 147, 1: 181-188.
- Contini C, Seraceni S, Cultrera R, Incorvaia C, Sebastiani A, Picot S (2005): Evaluation of a Real-time PCR-based assay using the lightcycler system for detection of *Toxoplasma gondii* bradyzoite genes in blood specimens from patients with toxoplasmic retinochoroiditis. *Int J Parasitol* 35, 3: 275-283.
- Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, Foulon W, Semprini AE, Dunn DT (2000): Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ* 321, 7254 :142-147.
- Cortina-Borja M, Tan HK, Wallon M, Paul M, Prusa A, Buffolano W, Malm G, Salt A, Freeman K, Petersen E, Gilbert RE; European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis (EMSCOT) (2010): Prenatal treatment for serious neurological sequelae of congenital toxoplasmosis: an observational prospective cohort study. *PLoS Med* 7, 10: pii: e1000351.
- Costa JM, 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. *J Clin Microbiol* 38, 8: 2929-2932.
- Cotty F, Descamps P, Body G, Richard-Lenoble D (1995): Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: the role of *Toxoplasma* IgA antibodies in amniotic fluid. *J Infect Dis* 171, 5: 1384-1385.
- Couvreur J, Desmots G, Tournier G, Szusterkac M (1984): [A homogeneous series of 210 cases of congenital toxoplasmosis in 0 to 11-month-old infants detected prospectively]. *Ann Pediatr (Paris)* 31, 10: 815-819.
- D'Alton ME, DeCherney AH (1993): Prenatal diagnosis. *N Engl J Med* 328, 2: 114-120.
- Decoster A, Slizewicz B, Simon J, Bazin C, Darcy F, Vittu G, Boulanger C, Champeau Y, Demory JL, Duhamel M, Capron A (1991): Platelia-Toxo IgA, a new kit for early diagnosis of congenital toxoplasmosis by detection of anti-P30 immunoglobulin A antibodies. *J Clin Microbiol* 29, 10: 2291-2295.
- Delhaes L, Ajzenberg D, Sicot B, Bourgeot P, Dardé ML, Dei-Cas E, Houfflin-Debarge V (2010): Severe congenital toxoplasmosis due to a *Toxoplasma gondii* strain with an atypical genotype: case report and review. *Prenat Diagn* 30, 9: 902-905.
- Derouin F, Devergie A, Auber P, Gluckman E, Beauvais B, Garin YJ, Lariviere M (1992): Toxoplasmosis in bone marrow-transplant recipients: report of seven cases and review. *Clin Infect Dis* 15, 2: 267-270.
- Derouin F, Pelloux H; ESCMID study group on clinical parasitology (2008): Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. *Clin Microbiol Inf* 14, 12: 1089-1101.
- Desmots GD, Couvreur J (1974): Congenital toxoplasmosis: a prospective study of 378 pregnancies. *N Engl J Med* 290: 1110-1116.
- Desmots G, Couvreur J (1974): L'isolement du parasite dans la toxoplasmose congénitale: intérêt pratique et théorique. *Arch Fr Pédiatr* 31: 157-166.
- Desmots G, Naot Y, Remington JS (1981): Immunoglobulin M immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases. Diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. *J Clin Microbiol* 14: 544-549.
- Desmots G, Couvreur J (1984): Histoire naturelle de la toxoplasmose congénitale. *Ann Pediatr* 31: 799-802.
- Desmots G, Daffos F, Forestier F, Capella-Pavlovsky M, Thulliez P, Chartier M (1985): Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Lancet* 1, 8427: 500-504.
- De Medeiros BC, De Medeiros CR, Werner B, Loddo G, Pasquini R, Bleggi-Torres LF (2001): Disseminated toxoplasmosis after bone marrow transplantation: report of 9 cases. *Transpl Infect Dis* 3, 1: 24-28.

- De Moura L, Bahia-Oliveira LM, Wada MY, Jones JL, Tuboi SH, Carmo EH, Ramalho WM, Camargo NJ, Trevisan R, Graça RM, da Silva AJ, Moura I, Dubey JP, Garrett DO (2006): Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis* 12: 326–329.
- Derouin F, Devergie A, Auber P, Gluckman E, Beauvais B, Garin YJ, Lariviere M (1992): Toxoplasmosis in bone marrow-transplant recipients: report of seven cases and review. *Clin Infect Dis* 15, 2 :267-270.
- Desmonts G, Couvreur J (1974): Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. *Bull N Y Acad Med* 50, 2: 146-159.
- Desmonts G, Couvreur J (1974): [Isolation of the parasite in congenital toxoplasmosis: its practical and theoretical importance]. *Arch Fr Pediatr* 31, 2 :157-166.
- Desmonts G, Baufine-Ducrocq H, Couzineau P, Peloux Y (1974): Anticorps toxoplasmiques naturels. *Nouv Presse Med* 3: 1547-1549.
- Desmonts G, Remington JS (1980): Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol* 11, 6: 562-568.
- Desmonts G, Naot Y, Remington S (1981): An IgM immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute, congenital and acquired *Toxoplasma* infections. *J Clin Microbiol* 14: 486-491.
- Desmonts G (1982): Toxoplasmose acquise de la femme enceinte. Estimation du risque de transmission du parasite et de toxoplasmose congénitale. *Lyon Med* 248: 115-123.
- Desmonts G, Daffos F, Forestier F, Capella-Pavlovsky M, Thulliez P, Chartier M (1985): Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Lancet* 1, 8427: 500-504.
- Desmonts G, Couvreur J, Thulliez P (1990): Congenital toxoplasmosis. 5 cases of mother-to-child transmission of pre-pregnancy infection. *Presse Med* 19, 31: 1445-1449.
- Djurković-Djaković O (1995): *Toxoplasma* infection and pathological outcome of pregnancy. *Gynecol Obstet Invest* 40: 36-41.
- Djurković-Djaković O (1995): Parazitske infekcije, U: Djurković-Djaković O, Jovanović T, Jevtović Dj, (ured.) Perinatalne infekcije. Velarta, Beograd, 127-149.
- Djurković-Djaković O (1998): Toksoplazmoza i imunosupresija. *Srp Arh Celok Lek* 126, 5-6: 197-203.

- Djurković-Djaković O, Milenković V (2000): Effect of refrigeration and freezing on survival of *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *Acta Vet (Belgrade)* 50, 375-380.
- Djurković-Djaković O, Nikolić A, Bobić B, Klun I, Aleksić A (2005): Stage conversion of *Toxoplasma gondii* RH parasites in mice by treatment with atovaquone and pyrrolidine dithiocarbamate. *Microbes Infect* 7, 1: 49-54.
- Djurković-Djaković O, Djokić V, Vujanić M, Živković T, Bobić B, Nikolić A, Slavić K, Klun I, Ivović V (2012): Kinetics of parasite burdens in blood and tissues during murine toxoplasmosis. *Exp Parasitol* 131, 3: 372-376.
- Dubey JP, Frenkel JK (1972): Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool* 19, 1: 155-177.
- Dubey JP, Frenkel JK (1976): Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J Protozool* 23: 537-546.
- Dubey JP (1988): Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with T *gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *Am J Vet Res* 49: 910-913.
- Dubey JP, Kotula AW, Sharar A, Andrews CD, Lindsay DS (1990): Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *J Parasitol* 76: 201-204.
- Dubey JP (1996): Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *J Parasitol* 82: 957-960.
- Dubey JP (1998): Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 28: 1019-1024.
- Dubey JP (2010): *Toxoplasmosis of animals and humans*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Dumetre A, Darde ML (2003): How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? *FEMS Microbiol Rev* 27: 651-661.
- Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R (1999): Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet* 353, 9167: 1829-1833.
- Edvinsson B, Lappalainen M, Evengard B (2006): Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Clin Microbiol Infect* 12, 2: 131-136.
- Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé ML, Cohen R, Dumètre A, Yera H, Gondon E, Janaud JC, Thulliez P (2009): Congenital toxoplasmosis and reinfection

- during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *J Infect Dis* 199, 2: 280-5.
- Ferguson DJ (2004): Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *Int J Parasitol* 34: 347–360.
- Figueiró-Filho EA, Senefonte FR, Lopes AH, de Moraes OO, Souza Júnior VG, Maia TL, Duarte G (2007): Frequency of HIV-1, rubella, syphilis, toxoplasmosis, cytomegalovirus, simple herpes virus, hepatitis B, hepatitis C, Chagas disease and HTLV I/II infection in pregnant women of State of Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 40, 2: 181-187.
- Filice GA, Yeager AS, Remington JS (1980): Diagnostic significance of immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii* detected after separation of immunoglobulin M from immunoglobulin G antibodies. *J Clin Microbiol* 12, 3: 336-342.
- Foot AB, Garin YJ, Ribaud P, Devergie A, Derouin F, Gluckman E (1994): Prophylaxis of toxoplasmosis infection with pyrimethamine/sulfadoxine (Fansidar) in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 14, 2: 241-245.
- Fortier B, Aïssi E, Ajana F, Dieusart P, Denis P, Martin de Lassalle E, Lecomte-Houcke M, Vinatier D (1991): Spontaneous abortion and reinfection by *Toxoplasma gondii*. *Lancet* 338, 8764: 444.
- Foulon W, Pinon JM, Stray-Pedersen B, Pollak A, Lappalainen M, Decoster A, Villena I, Jennum PA, Hayde M, Naessens A (1999): Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: a multicenter evaluation of different diagnostic parameters. *Am J Obstet Gynecol* 181, 4: 843– 847.
- Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL (1970): *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 167, 3919: 893-896.
- Frenkel JK (1973): *Toxoplasma* in and around us. *BioScience* 23: 343–352.
- Fricker-Hidalgo H, Saddoux C, Suchel-Jambon AS, Romand S, Foussadier A, Pelloux H, Thulliez P (2006): New Vidas assay for *Toxoplasma*-specific IgG avidity: evaluation on 603 sera. *Diagn Microbiol Infect Dis* 56, 2: 167–172.
- Fricker-Hidalgo H, Bulabois CE, Brenier-Pinchart MP, Hamidfar R, Garban F, Brion JP, Timsit JF, Cahn JY, Pelloux H (2009): Diagnosis of toxoplasmosis after allogeneic stem cell transplantation: results of DNA detection and serological techniques. *Clin Infect Dis* 48, 2: e9-e15.
- Fricker-Hidalgo H, Cimon B, Chemla C, Darde ML, Delhaes L, L'ollivier C, Godineau N, Houze S, Paris L, Quinio D, Robert-Gangneux F, Villard O, Villena I, Candolfi E, Pelloux H (2013): *Toxoplasma* seroconversion with negative or

- transient immunoglobulin M in pregnant women: myth or reality? A French multicenter retrospective study. *J Clin Microbiol* 51, 7: 2103-2111.
- Fulton JD, Turk JL (1959): Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. *Lancet* ii: 1068-1069.
- Garabedian C, Le Goarant J, Delhaes L, Rouland V, Vaast P, Valat AS, Subtil D, Houfflin-Debauge V (2012): [Periconceptional toxoplasmic seroconversion: about 79 cases]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 41, 6: 546-552.
- Gavinet MF, Robert F, Firtion G, Delouvrier E, Hennequin C, Maurin JR, Tourte-Schaefer C, Dupouy-Camet J (1997): Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. *J Clin Microbiol* 35, 5: 1276-1277.
- Gay-Andrieu F, Marty P, Pialat J, Sournies G, Drier de Laforte T, Peyron F (2003): Fetal toxoplasmosis and negative amniocentesis: necessity of an ultrasound follow-up. *Prenat Diagn* 23, 7: 558-560.
- Ghidini A, Sepulveda W, Lockwood CJ, Romero R (1993): Complications of fetal blood sampling. *Am J Obstet Gynecol* 168, 5: 1339-1344.
- Gilbert RE, Thalib L, Tan HK, Paul M, Wallon M, Petersen E; European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis (2007): Screening for congenital toxoplasmosis: accuracy of immunoglobulin M and immunoglobulin A tests after birth. *J Med Screen* 14, 1: 8–13.
- Gorgievski-Hrisoho M, Germann D, Matter L (1996): Diagnostic implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 34, 6: 1506-1511.
- Goldman M, Carver RK, Sulzer AJ (1958): Reproduction of *Toxoplasma gondii* by internal budding. *J Parasitol* 44, 2: 161-171.
- Gras L, Gilbert RE, Wallon M, Peyron F, Cortina-Borja M (2004): Duration of the IgM response in women acquiring *Toxoplasma gondii* during pregnancy: implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies. *Epidemiol Infect* 132, 3: 541-548.
- Gras L, Wallon M, Pollak A, Cortina-Borja M, Evengard B, Hayde M, Petersen E, Gilbert R; European Multicenter Study on Congenital Toxoplasmosis (2005): Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: a cohort study in 13 European centres. *Acta Paediatr* 94: 1721–1731.
- Grover CM, Thulliez P, Remington JS, Boothroyd JC (1990): Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *J Clin Microbiol* 28, 10: 2297-2301.

- Guerina NG, Hsu HW, Meissner HC, Maguire JH, Lynfield R, Stechenberg B, Abrams I, Pasternack MS, Hoff R, Eaton RB, Grady GF; The New England Regional Toxoplasma Working Group (1994): Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. *N Engl J Med* 330: 1858–1863.
- Hall S, Ryan M, Buxton M (2001): The epidemiology of toxoplasma infection. In: Joynson, DHM, Wreghitt TG (Eds.), *Toxoplasmosis: a Comprehensive Clinical Guide*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 58–124.
- Hedman K, Lappalainen M, Seppä I, Makela O (1989): Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Infect Dis* 159, 4: 736–740.
- Hennequin C, Dureau P, N'Guyen L, Thulliez P, Gagelin B, Dufier JL (1997): Congenital toxoplasmosis acquired from an immune woman. *Pediatr Infect Dis J* 16, 1: 75–77.
- Hezard N, Marx-Chemla C, Foudrinier F, Villena I, Quereux C, Leroux B, Dupouy D, Talmud M, Pinon JM (1997): Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis in 261 pregnancies. *Prenat Diagn* 17, 11: 1047–1054.
- Hohlfeld P, Daffos F, Thulliez P, Aufrant C, Couvreur J, MacAleese J, Descombey D, Forestier F (1989): Fetal toxoplasmosis: outcome of pregnancy and infant follow-up after in utero treatment. *J Pediatr* 115: 765–769.
- Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M (1994): Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med* 331, 11: 695–699.
- Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, Verschueren H (2000): Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol* 30: 69–75.
- Hutchison WM, Dunachie JF, Siim JC, Work K (1970): Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. *Br Med J* 1, 5689: 142–144.
- Hyde B, Barnett EV, Remington JS (1975): Method for differentiation of nonspecific from specific toxoplasma IgM fluorescent antibodies in patients with rheumatoid factor. *Proc Soc Exp Biol Med* 148, 4: 1184–1188.
- Jacobs L, Lunde MN (1957): A hemagglutination test for toxoplasmosis. *J Parasitol* 43, 3: 308–314.
- Jacobs L, Remington JS, Melton ML (1960): The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 46, 11–21.



- Jenum PA, Stray-Pedersen B, Gundersen AG (1997): Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. *J Clin Microbiol* 35, 8: 1972-1977.
- Jones CD, Okhravi N, Adamson P, Tasker S, Lightman S (2000): Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 634-644.
- Jones JL, Kruszon-Moran D, Sanders-Lewis K, Wilson M (2007): *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999–2004, decline from the prior decade. *Am J Trop Med Hyg* 77: 405–410.
- Jones JL, Dargelas V, Roberts J, Press C, Remington JS, Montoya JG (2009): Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. *Clin Infect Dis* 49, 6: 878–884.
- Kapperud G, Jenum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK, Eskild A, Eng J (1996): Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Results of a prospective case-control study in Norway. *Am J Epidemiol* 144, 4: 405-412.
- Kellen A, Ayllon-Leindl L, Labzoffsky N (1962): Indirect fluorescent antibody method in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Can J Microbiol* 8, 545-554.
- Kimball AC, Kean BH, Fuchs F (1971): Congenital toxoplasmosis: a prospective study of 4,048 obstetric patients. *Am J Obstet Gynecol* 111: 211-218.
- Klun I, Djurković-Djaković O, Katić-Radivojević S, Nikolić A (2006): Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: Seroprevalence and risk factors. *Vet Parasitol* 135, 2: 121-131.
- Lachaud L, Calas O, Picot MC, Albaba S, Bourgeois N, Pratlong F (2009): Value of 2 IgG avidity commercial tests used alone or in association to date toxoplasmosis contamination. *Diagn Microbiol Infect Dis* 64, 3: 267–274.
- Landis JR, Koch GG (1977): The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33: 159-174.
- Lappalainen M, Koskela P, Koskiniemi M, Ammälä P, Hiilesmaa V, Teramo K, Raivio KO, Remington JS, Hedman K (1993): Toxoplasmosis acquired during pregnancy: improved serodiagnosis based on avidity of IgG. *J Infect Dis* 167, 3: 691-697.
- Ljungman P, Bregni M, Brune M, Cornelissen J, de Witte T, Dini G, Einsele H, Gaspar HB, Gratwohl A, Passweg J, Peters C, Rocha V, Saccardi R, Schouten H, Sureda A, Tichelli A, Velardi A, Niederwieser D; European Group for Blood and Marrow Transplantation (2010): Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone Marrow Transplant* 45:219-234.

- Liesenfeld O, Roth A, Weinke T, Foss HD, Hahn H (1994): A case of disseminated toxoplasmosis-value of PCR for the diagnosis. *J Infect* 29, 2: 133-138.
- Liesenfeld O, Montoya JG, Kinney S, Press C, Remington JS (2001): Effect of testing for IgG avidity in the diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women: experience in a US reference laboratory. *J Infect Dis* 183, 8: 1248-53.
- Lindsay DS, Dubey JP (2009): Long-term survival of *Toxoplasma gondii* sporulated oocysts in seawater. *J Parasitol* 95: 1019–1020.
- Lyons RE, McLeod R, Roberts CW (2002): *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol* 18, 5: 198-201.
- Martino R, Bretagne S, Rovira M, Ullmann AJ, Maertens J, Held T, Deconinck E, Cordonnier C (2000): Toxoplasmosis after hematopoietic stem transplantation. Report of a 5-year survey from the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 25, 10: 1111-1114.
- Martino R, Maertens J, Bretagne S, Rovira M, Deconinck E, Ullmann AJ, Held T, Cordonnier C; The European Group for Blood and Marrow Transplantation Infectious Diseases Working Party (2000): Toxoplasmosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 31, 5: 1188–1194.
- Martino R, Bretagne S, Einsele H, Maertens J, Ullmann AJ, Parody R, Schumacher U, Pautas C, Theunissen K, Schindel C, Muñoz C, Margall N, Cordonnier C; The Infectious Disease Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (2005): Early detection of *Toxoplasma* infection by molecular monitoring of *Toxoplasma gondii* in peripheral blood samples after allogeneic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 40, 1: 67–78.
- Marty P, Le Fichoux Y, Deville A, Forest H (1991): [Congenital toxoplasmosis and preconceptional maternal ganglionic toxoplasmosis]. *Presse Med* 20, 8: 387.
- McAuley J, Boyer KM, Patel D, Mets M, Swisher C, Roizen N, Wolters C, Stein L, Stein M, Schey W, Remington J, Meier P, Johnson D, Heydemann P, Holfels E, Withers S, Mack D, Brown C, Patton D, McLeod R (1994): Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital toxoplasmosis: the Chicago Collaborative Treatment Trial. *Clin Infect Dis* 18, 1: 38–72.
- McLeod R, Boyer K, Karrison T, Kasza K, Swisher C, Roizen N, Jalbrzikowski J, Remington J, Heydemann P, Noble AG, Mets M, Holfels E, Withers S, Latkany P, Meier P; Toxoplasmosis Study Group (2006): Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981-2004: the National Collaborative Chicago-Based, Congenital Toxoplasmosis Study. *Clin Infect Dis* 42, 10: 1383–1394.

- Mechain B, Garin YJ, Robert-Gangneux F, Dupouy-Camet J, Derouin F (2000): Lack of utility of specific immunoglobulin G antibody avidity for serodiagnosis of reactivated toxoplasmosis in immunocompromised patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 7, 4: 703-705.
- Meers S, Lagrou K, Theunissen K, Dierickx D, Delforge M, Devos T, Janssens A, Meersseman W, Verhoef G, Van Eldere J, Maertens J (2010): Myeloablative conditioning predisposes patients for *Toxoplasma gondii* reactivation after allogeneic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 50, 8: 1127-1134.
- Meroni V, Genco F, Tinelli C, Lanzarini P, Bollani L, Stronati M, Petersen E (2009): Spiramycin treatment of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women impairs the production and the avidity maturation of *T. gondii*-specific immunoglobulin G antibodies. *Clin Vaccine Immunol* 16, 10: 1517-1520.
- Miano M, Labopin M, Hartmann O, Angelucci E, Cornish J, Gluckman E, Locatelli F, Fischer A, Egeler RM, Or R, Peters C, Ortega J, Veys P, Bordigoni P, Iori AP, Niethammer D, Rocha V, Dini G; Paediatric Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (2007): Haematopoietic stem cell transplantation trends in children over the last three decades: a survey by the paediatric diseases working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 39:89-99.
- Montoya JG, Liesenfeld O (2004): Toxoplasmosis. *Lancet* 363: 1965–1976.
- Montoya JG, Huffman HB, Remington JS (2004): Evaluation of the immunoglobulin G avidity test for diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy. *J Clin Microbiol* 42, 10: 4627-4631.
- Mulanovich VE, Ahmed SI, Öztürk T, Khokhar FA, Kontoyiannis DP, de Lima M (2011): Toxoplasmosis in allo-SCT patients: risk factors and outcomes at a transplantation center with a low incidence. *Bone Marrow Transplant* 46: 273–277.
- Naot Y, Remington JS (1980): An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J Infect Dis* 142, 5: 757-766.
- Naot Y, Desmots G, Remington JS (1981): IgM enzyme-linked immunosorbent assay test for the diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection. *J Pediatr* 98, 1: 32-36.
- Naessens A, Jenum PA, Pollak A, Decoster A, Lappalainen M, Villena I, Lebech M, Stray-Pedersen B, Hayde M, Pinon JM, Petersen E, Foulon W (1999): Diagnosis of congenital toxoplasmosis in the neonatal period: a multicenter evaluation. *J Pediatr* 135, 6: 714–719.

- Nascimento FS, Suzuki LA, Rossi CL (2008): Assessment of the value of detecting specific IgA antibodies for the diagnosis of a recently acquired primary *Toxoplasma* infection. *Prenat Diagn* 28, 8: 749-752.
- Nicolle C, Manceaux L (1908): Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Acad Sci* 147, 736.
- Nishi M, Hu K, Murray JM, Roos DS (2008): Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 121, 9: 1559-1568.
- Patrat-Delon S, Gangneux JP, Lavoué S, Lelong B, Guiguen C, le Tulzo Y, Robert-Gangneux F (2010): Correlation of parasite load determined by quantitative PCR to clinical outcome in a heart transplant patient with disseminated toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 48, 7: 2541-2545.
- Pelloux H, Brun E, Vernet G, Marcillat S, Jolivet M, Guergour D, Fricker-Hidalgo H, Goullier-Fleuret A, Ambroise-Thomas P (1998): Determination of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin G avidity: adaptation to the Vidas system (bioMérieux). *Diagn Microbiol Infect Dis* 32, 2: 69-73.
- Pelloux H, Guy E, Angelici MC, Aspöck H, Bessières MH, Blatz R, Del Pezzo M, Girault V, Gratzl R, Holberg-Petersen M, Johnson J, Krüger D, Lappalainen M, Naessens A, Olsson M (1998): A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. *FEMS Microbiol Lett* 165, 2: 231-237.
- Pelloux Y, Couzineau P, Baufine-Ducrocq H, Tayot JL, Jacquot D (1973): La reaction d'agglutination directe des toxoplasmes. Role des immunoglobulines 19 S et 7 S. *Ann Biol Clin* 31: 185-192.
- Petersen E, Borobio MV, Guy E, Liesenfeld O, Meroni V, Naessens A, Spranzi E, Thulliez P (2005): European multicenter study of the LIAISON automated diagnostic system for determination of *Toxoplasma gondii* specific immunoglobulin G (IgG) and IgM and the IgG avidity index. *J Clin Microbiol* 43, 4: 1570-1574.
- Pinon JM, Gruson N (1982): [Interest of ELISA specific and compared immunological profiles in the early diagnosis of congenital toxoplasmosis]. *Lyon Med* 248: 27-30.
- Pinon JM, Thoannes H, Pouletty PH, Poirriez J, Damiens J, Pelletier P (1986): Detection of IgA specific for toxoplasmosis in serum and cerebrospinal fluid using a non-enzymatic IgA-capture assay. *Diagn Immunol* 4, 5: 223-227.
- Pinon JM, Toubas D, Marx C, Mougeot G, Bonnin A, Bonhomme A, Villaume M, Foudrinier F, Lèpan H (1990): Detection of specific immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 28, 8: 1739-1743.

- Pons JC, Sigrand C, Grangeot-Keros L, Frydman R, Thulliez P (1995): [Congenital toxoplasmosis: transmission to the fetus of a pre-pregnancy maternal infection]. *Presse Med* 24, 3: 179-182.
- Reischl U, Bretagne S, Kruger D, Ernault P, Costa JM (2003): Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect Dis* 3, 7.
- Remington JS, Miller MJ, Brownlee I (1968): IgM antibodies in acute toxoplasmosis. Diagnostic significance in congenital cases and a method for their rapid demonstration. *Pediatrics* 41, 6: 1082-1091.
- Remington JS, Araujo FG, Desmonts G (1985): Recognition of different *Toxoplasma* antigens by IgM and IgG antibodies in mothers and their congenitally infected newborns. *J Infect Dis* 152: 1020–1024.
- Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G (2001): Toxoplasmosis, p 205–346. In Remington JS, Klein J (ed), *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, 5th ed. WB Saunders, Philadelphia, PA.
- Remington J, Thulliez P, Montoya J (2004): Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 42, 3: 941–945.
- Robert-Gangneux F, Gavinet MF, Ancelle T, Raymond J, Tourte-Schaefer C, Dupouy-Camet J (1999): Value of prenatal diagnosis and early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: retrospective study of 110 cases. *J Clin Microbiol* 37, 9: 2893–2898.
- Robert-Gangneux F, Amrein C, Lavarde V, Botterel F, Dupouy-Camet J (2000): Neosynthesized IgG detected by Western blotting in *Toxoplasma*-seropositive heart or lung transplant recipients. *Transpl Int* 13, 6: 448-452.
- Robert-Gangneux F, Dupretz P, Yvenou C, Quinio D, Poulain P, Guiguen C, Gangneux JP (2010): Clinical relevance of placenta examination for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J* 29, 1: 33–38.
- Robert-Gangneux F, Dardé ML (2012): Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev* 25, 2: 264-296.
- 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. *Obstet Gynecol* 97, 2: 296–300.
- Romand S, Chosson M, Franck J, Wallon M, Kieffer F, Kaiser K, Dumon H, Peyron F, Thulliez P, Picot S (2004): Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*. *Am J Obstet Gynecol* 190, 3: 797– 802.

- Roos DS, Crawford MJ, Donald RG, Kissinger JC, Klimczak LJ, Striepen B. Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid. *Curr Opin Microbiol* 2, 4: 426–432.
- Roth A, Roth B, Hoffken G, Steuber S, Khalifa KI, Janitschke K (1992): Application of the polymerase chain reaction in the diagnosis of pulmonary toxoplasmosis in immunocompromised patients. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis* 9: 1177-1181.
- Ryu JS, Min DY, Ahn MH, Choi HG, Rho SC, Shin YJ, Choi B, Joo HD (1996): *Toxoplasma* antibody titers by ELISA and indirect latex agglutination test in pregnant women. *Korean J Parasitol* 34, 4: 233–238.
- Sabin AB, Olitsky PK (1937): *Toxoplasma* and Obligate Intracellular Parasitism. *Science* 85, 2205: 336-338.
- Sabin AB (1941): Toxoplasmic encephalitis in children. *JAMA* 116: 807-714.
- Sabin AB (1942): Toxoplasmosis. A recently recognized disease of human beings. *Adv Pediatr* 1: 1–53.
- Sabin AB, Feldman HA (1948): Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). *Science* 108, 2815: 660-663.
- Sacks JJ, Roberto RR, Brooks NF (1982): Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. *JAMA* 248, 14: 1728-1732.
- Shaw BE, Veys P, Pagliuca A, Addada A, Cook G, Craddock CF, Gennery AR, Goldman J, Mackinnon S, Madrigal JA, Marks DI, Navarrete C, Potter MN, Querol S, Regan F, Russell NH, Hough RE (2009): Recommendations for a standard UK approach to incorporating umbilical cord blood into clinical transplantation practice: conditioning protocols and donor selection algorithms. *Bone Marrow Transplant* 44:7–12.
- Sheffield HG, Melton ML (1968): The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 54, 2: 209-226.
- Sibley LD (2010): How apicomplexan parasites move in and out of cells. *Curr Opin Biotechnol* 21: 592–598.
- Siegel JP, Remington JS (1983): Comparison of methods for quantitating antigen-specific immunoglobulin M antibody with a reverse enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 18, 1: 63-70.
- Skinner LJ, Timperley AC, Wightman D, Chatterton JM, Ho-Yen DO (1990): Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goatowner's family. *Scand J Infect Dis* 22, 3: 359-361.

- Slavin MA, Meyers JD, Remington JS, Hackman RC (1994): *Toxoplasma gondii* infection in marrow transplant recipients: a 20 year experience. *Bone Marrow Transplant* 13, 5: 549-557.
- Splendore A (1908): Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pel. *Rev Soc Sci Sao Paulo* 3, 109-112.
- Stepick-Biek P, Thulliez P, Araujo FG, Remington JS (1990): IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. *J Infect Dis* 162, 1: 270-273.
- Sterkers Y, Varlet-Marie E, Cassaing S, Brenier-Pinchart MP, Brun S, Dalle F, Delhaes L, Filisetti D, Pelloux H, Yera H, Bastien P (2010): Multicentric comparative analytical performance study for molecular detection of low amounts of *Toxoplasma gondii* from simulated specimens. *J Clin Microbiol* 48, 9: 3216 – 3222.
- Sterkers Y, Ribot J, Albaba S, Issert E, Bastien P, Pralong F (2011): Diagnosis of congenital toxoplasmosis by polymerase chain reaction on neonatal peripheral blood. *Diagn Microbiol Infect Dis* 71, 2: 174-176.
- Swisher CN, Boyer K, McLeod R. Toxoplasmosis Study Group (1994): Congenital toxoplasmosis. *Semin Pediatr Neurol* 1, 1: 4-25.
- Štajner T, Vasiljević Z, Vujić D, Marković M, Ristić G, Mičić D, Pasić S, Ivočić V, Ajzenberg D, Djurković-Djaković O (2013): Atypical strain of *Toxoplasma gondii* causing fatal reactivation after haematopoietic stem cell transplantation in a patient with an underlying immunological deficiency. *J Clin Microbiol* 51, 8: 2686-2690.
- Thalhammer O (1955): [Discrepancy between the incidence of maternal toxoplasma infection and cases of congenital toxoplasmosis; statistics and case reports of oligosymptomatic congenital toxoplasmosis]. *Wien Klin Wochenschr* 67, 35: 697-700.
- Thalhammer O (1975): [Toxoplasmosis investigation of pregnant women and newborn infants (author's transl)]. *Wien Klin Wochenschr* 87, 20: 676-681.
- Thalib L, Gras L, Romand S, Prusa A, Bessieres MH, Petersen E, Gilbert RE (2005): Prediction of congenital toxoplasmosis by polymerase chain reaction analysis of amniotic fluid. *BJOG* 112, 5: 567–574.
- Tissot-Dupont D, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Bost-Bru C, Ambroise-Thomas P, Pelloux H (2003): Usefulness of Western blot in serological follow-up of newborns suspected of congenital toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22: 122–125.

- Villena I, Chemla C, Quereux C, Dupouy D, Leroux B, Foudrinier F, Pinon JM (1998): Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis transmitted by an immunocompetent woman infected before conception. Reims Toxoplasmosis Group. *Prenat Diagn* 18, 10: 1079-1081.
- Vogel N, Kirisits M, Michael E, Bach H, Hostetter M, Boyer K, Simpson R, Holfels E, Hopkins J, Mack D, Mets MB, Swisher CN, Patel D, Roizen N, Stein L, Stein M, Withers S, Mui E, Egwuagu C, Remington J, Dorfman R, McLeod R (1996): Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception. *Clin Infect Dis* 23, 5: 1055-1060.
- Voller A, Bidwell DE, Bartlett A, Fleck DG, Perkins M, Oladehin B (1976): A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody. *J Clin Pathol* 29, 2: 150-153.
- Vujanić M, Ivović V, Kataranovski M, Nikolić A, Bobić B, Klun I, Villena I, Kataranovski D, Djurković-Djaković O (2010): Toxoplasmosis in naturally infected rodents in Belgrade, Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11, 8: 1209-1211.
- Vujić D, Jevtić D, Zečević Z, Lazić E (2011): Indikacije za transplantaciju matičnih ćelija hematopoeze, izbor davaoca i priprema za transplantaciju, 31: 237-247. U: Zdravković D (urednik), Problemi u pedijatriji 2010, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
- Wallon M, Gaucherand P, Al Kurdi M, Peyron F (2002): [Toxoplasma infections in early pregnancy: consequences and management]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 31, 5: 478-484.
- Wallon M, Franck J, Thulliez P, Huissoud C, Peyron F, Garcia-Meric P, Kieffer F (2010): Accuracy of real-time polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. *Obstet Gynecol* 115, 4: 727-733.
- Walls KW, Bullock SL, English DK (1977): Use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its microadaptation for the serodiagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 5, 3: 273-277.
- Walton BC, Benchoff BM, Brooks WH (1966): Comparison of the indirect fluorescent antibody test and methylene blue dye test for detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Am J Trop Med Hyg* 15, 2: 149-152.
- Welch PC, Masur H, Jones TC, Remington JS (1980): Serologic diagnosis of acute lymphadenopathic toxoplasmosis. *J Infect Dis* 142, 2: 256-264.
- Wolf A, Cowen D, Paige B (1939): Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. *Science* 89, 2306: 226-227.



Živković T, Ivović V, Vujanić M, Klun I, Bobić B, Nikolić A, Djurković-Djaković O (2011): Adverse fetal outcome in the absence of timely prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Wien Klin Wochenschr* 123: 43-46.

**PRILOZI**

**Prilog 1.**

Nukleotidna sekvenca regiona 529bp *T. gondii* (prajmeri HO1 i HO2 za qPCR su podvučeni a proba HOFT označena je crvenom bojom):

```
>gi|5916167|gb|AF146527.1|AF146527 Toxoplasma gondii repeat region
CTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTGTTTTTATTTTTTTCTTTTGTCTGATTTTGTGTTTTTTGAC
TCGGGCCAGCTGCGTCTGTCGGGATGAGACCGCGGAGCCGAAGTGCCTTTCTTTTTTACTTTTTTT
GTTTTTTCACAGGCAAGCTCGCCTGTGCTTGGAGCCACAGAAGGGACAGAAGTCGAAGGGGACTACAGA
CGCGATGCCGCTCCTCCAGCCGTCTTGGAGGAGAGATATCAGGACTGTAGATGAAGGCGAGGGTGAGGA
TGAGGGGGTGGCGTGGTTGGGAAGCGACGAGAGTCGGAGAGGGAGAAGATGTTCCGGCTTGGCTGCT
TTTCTGGAGGGTGGAAAAAGAGACACCGAATGCGATCCAGACGAGACGACGCTTCTCGTGGTGAT
GGCGGAGAGAATTGAAGAGTGGAGAAGAGGGCGAGGGAGACAGAGTCGGAGGCTTGGACGAAGGGA
GGAGGAGGGGTAGGAGAGGAATCCAGATGCACTGTGTCTGCAG
```

## BIOGRAFIJA

Tijana Štajner rođena je 13.12.1980. godine u Beogradu gde je završila osnovnu školu i XIII beogradsku gimnaziju sa odličnim uspehom. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2006. godine sa prosečnom ocenom 9,60. Obavezni staž je obavila na Medicinskom fakultetu u Beogradu i položila stručni ispit za doktora medicine 2007. godine. U oktobru 2011. godine upisala je specijalizaciju iz Medicinske mikrobiologije na Medicinskom fakultetu u Beogradu.

Dr Tijana Štajner je od 01. jula 2008. godine zaposlena u grupi za mikrobiologiju i parazitologiju Instituta za medicinska istraživanja (IMI) Univerziteta u Beogradu, najpre kao istraživač pripravnik a od 17. septembra 2010. godine kao istraživač saradnik. Aktivno je uključena u rad Centra izuzetnih vrednosti za zoonoze prenošene hranom i vektorima IMI a posebno u rad Nacionalne referentne laboratorije za toksoplazmozu u okviru Centra. Od početka svog rada u Institutu učestvovala je kao saradnik u više istraživačkih projekata – tri projekta finansirana od strane Ministarstva nadležnog za nauku R. Srbije i četiri međunarodna projekta (FP6 program za istraživanja i tehnološki razvoj EU – SERBPARTOON FP6-2005-INCO-CT/043702, bilateralni programi sa Mađarskom i Francuskom kao i tekuća COST akcija FA 1408: *A European Network for Foodborne Parasites* (Euro-FBP) 2015-2019).

Dobitnik je stipendije Evropskog udruženja za kliničku mikrobiologiju i infektivne bolesti ESCMID za učešće na edukativnom kursu iz infektivnih bolesti trudnica, fetusa i novorođenčadi na Univerzitetu u Bolonji, Italija (2010. godine) i STSM stipendije u okviru FA0805 COST akcije za učešće na edukativnom parazitološkom kursu na INRA/ENVIT u Tuluzu, Francuska (2010. godine).

Do sada je u saradnji sa drugim autorima objavila 37 bibliografskih jedinica od kojih je 13 objavljeno *in extenso*. Od radova objavljenih *in extenso*, jedan rad je poglavlje u monografiji međunarodnog značaja dok je preostalih 12 radova objavljeno u međunarodnim časopisima (pet u vodećim, dva u istaknutim i pet u časopisima međunarodnog značaja). Prvi je autor tri rada od kojih su dva objavljena u vodećim časopisima a jedan u časopisu međunarodnog značaja. Od radova objavljenih u izvodu, svih 24 su saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova.

Dobitnik je grupne nagrade za najbolji naučni rad IMI "Dr Jovan Vučo" u 2010. godini.

## Izjava o autorstvu

Potpisana **Tijana Štajner**

broj upisa: 08-DS-MM-08

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom „**Klinički značaj molekularne dijagnostike toksoplazmoze kod visokorizičnih bolesnika**“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranta**

*Tijana Štajner*

U Beogradu, 15.04.2016. godine

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: **Tijana Štajner**

Broj upisa: 08-DS-MM-08

Studijski program: Molekularna medicina

Naslov rada: „Klinički značaj molekularne dijagnostike toksoplazmoze kod visokorizičnih bolesnika“

Mentor: Dr Olgica Đurković-Đaković, naučni savetnik

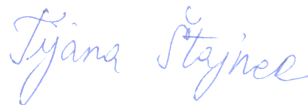
Potpisani: Tijana Štajner

izjavljujem da je štampana verzija mog dokorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranta**



U Beogradu, 15.04.2016. godine

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom «Klinički značaj molekularne dijagnostike toksoplazmoze kod visokorizičnih bolesnika», koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

**Potpis doktoranta**

*Tijana Stajner*

U Beogradu, 15.04.2016. godine

1. **Autorstvo** - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. **Autorstvo – nekomercijalno**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. **Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. **Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. **Autorstvo – bez prerade**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. **Autorstvo - deliti pod istim uslovima**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.