

44241

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKUT VE KRONİK TOXOPLASMOSİS' TE
AYIRICI TANI YÖNTEMLERİ

Parazitoloji Programı

DOKTORA TEZİ

Tıp Doktoru A. Yüksel GÜRÜZ

İZMİR - 1995

**T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AKUT VE KRONİK TOXOPLASMOSİS' TE
AYIRICI TANI YÖNTEMLERİ**

Parazitoloji Programı

DOKTORA TEZİ

Tıp Doktoru A. Yüksel GÜRÜZ

**Danışman Öğretim Üyesi:
Prof. Dr. H. Aydın KUMAN**

İZMİR - 1995

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM I

ÖNSÖZ	1
GİRİŞ VE AMAÇ	2
KAYNAK BİLGİLER	3
Morfoloji ve Evrim	3
Trofozoit	3
Kist	4
Ookist	5
Semptomatik Enfeksiyonlarda Klinik	13
Akut Enfeksiyon	13
Subakut Enfeksiyon	13
Kronik Enfeksiyon	13
Kongenital Toxoplasmosis	14
Toxoplasmosis Kliniği	16
1.) Edinsel Toxoplasmosis	16
1.1.) Ağır Tip	16
1.1.1.) Genel Enfeksiyon Tipi	16
1.1.2.) Meningoensefalitik Tip	16
1.2.) Sakin Tip	17
1.2.1.) Enfeksiyöz Mononükleoz Tip	17
1.2.2.) Ateşsiz Lenfadenopatik Tip	17
1.2.3.) Sessiz Form	17
1.2.4.) Edinsel Göz Toxoplasmosisi	17
2.) Kongenital Toxoplasmosis	18
2.1.) Septisemik Birinci Dönemde Doğan Çocuk	20
2.1.1.) Ağır Form	20
2.1.2.) Atenue Form	20

2.1.3.) Doğumda Ortaya Çıkan Form	20
2.2.) Antikor Oluştığı İkinci Dönemde Doğan Çocuk	20
2.3.) Üçüncü Dönemde Doğan Çocuk	21
2.3.1.) Ağır Form	21
2.3.2.) Tamamlanmamış Form	21
2.3.3.) Sessiz Form	21
Toxoplasmosis Tanısında Kullanılan Serolojik Testler	30
Sabin Feldman Dye Test	31
IHA	31
Presipitin Testi	32
CF	33
Fulton Agglütinasyon Testi	33
Konvansiyonel IFA	34
DA	35
ELISA	36
IgM ISAGA	38

BÖLÜM II

GEREÇ VE YÖNTEM	39
İnokülasyon	40
Araştırmalarda Kullanılan Testler	40
1.) DT	40
2.) Eiken Latex Agglütinasyon Testi	42
3.) DA	43
4.) DS-ELISA	44
5.) ISAGA IgM	47
6.) ISAGA IgA	48
7.) Avidite	50

8.) PCR	52
PCR'da Kullanılan Sarf Malzemeleri	54
BÖLÜM III	
BULGULAR	62
BÖLÜM IV	
TARTIŞMA	71
SONUÇ	86
ÖZET	87
SUMMARY	88
KAYNAK	89
ÖZGEÇMİŞ	100

ÖNSÖZ

Tezimi İngiltere’deki en önemli referans merkezlerinden biri olan Londra’daki St. George’s hastanesindeki Toxoplasma referans laboratuvarında hazırladım. Bu merkezde kullanılan teşhis yöntemlerini (Dye test, Latex agglütinasyon, Direk agglütinasyon, ELISA IgM ve IgG, ISAGA IgM ve IgA ile PCR) öğrenmeme, uygulamama yardım eden, serumları ve laboratuvardaki malzemeleri kullanmama izin veren başta laboratuvar sorumlusu Dr. R. E. Holliman olmak üzere tüm laboratuvar çalışanlarına, Ege Üniversitesi Parazitoloji Anabilim dalındaki eğitimim sırasında derin bilgi ve görüşlerinden yararlandığım Anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. M. Ali Özcel’ e, tez danışmanım Prof. Dr. Aydınten Kuman’ a, Anabilim dalımızdaki tüm Öğretim Üyelerine, mesai arkadaşlarıma ve her alanda desteğini hissettiğim eşime teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin dünya ile entegrasyonu sağlayacak ulusal standartımızın belirlenmesine katkısı olması en büyük dileğim olmuştur.

GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya da çok yaygın olan toxoplasmosis tanısında, suş ve birey immünitelerindeki farklılıktan dolayı, ortak birimlerle çalışılmamakta, bu amaçla ülkeler uluslararası standartlara bağlı kalarak, kendi ulusal standartlarını saptamaya çalışmaktadır. 20. yüzyıl sonunda hala ciddiyetini koruyan bu hastalığın bulaşında eğitim ve yaşamsal alışkanlıklar nedenli etkiliyse, tanısının zamanında ve doğru konulup, seyirinin kontrol altına alınması da o denli gereklidir.

Tanıda laboratuvar bakıları, histolojik araştırmalar ve serolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Toxoplasmosis tanısında hastaları immün sistemi sağlam olanlar (lenfadenopatisi olanlar, glandüler ateş benzeri hastalığı olanlar, oküler şikayetleri olanlar, hamile kalmayı düşünenler ve hamileler) ile immün sistemi baskılanmış olanlar (fötus, yenidoğan, organ nakli alıcıları ve HIV-pozitif şahıslar) diye iki grupta incelenmelidir. İmmün sistemi sağlam şahıslarda en sık bulgu olarak ortaya çıkan lenfadenopati (LAP) lenfomadan ayrımı yapılmalı, histopatolojik muayene bulgularının, doku kültürü veya hayvan inokülasyon çalışmalarının tanı koydurucu olmasına rağmen akut olguyu, kronik olgudan ayırtetmekte yetersiz kalması, serolojik tanıyı ön plana çıkartmıştır.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarında da Toxoplasma gondii sık rastlanan parazitozlardan olup, tanısında zorluklarla karşılaşılmaktadır. Çalışmalarımız sırasında, ülkemizdeki laboratuvarların toxoplasma seroloji sonuçları arasında yorum yapmayı güçleştiren uyumsuzluklar gözlemlenmiş, bunun nedeni olarak da serolojik işlemlerin çoğunlukla uzmanlarca yapılmayışı, ortak bir yöntem ve ortak bir birimin oluşturulmamış olması gerekçe olarak karşımıza çıkmıştır. Sonuçta da hastalar açısından çok kıymetli olabilecek zaman kayıpları, yanlış yorumlamalar nedeniyle de ekonomik ve sosyal zararlar oluşmuştur. Bu aksaklıkları önlemek için Toxoplasma gondii' nin serolojik tanısını derinlemesine irdelleyen bir çalışma yapmayı amaçladık. Çalışmanın gerçekleştirildiği St. George' s hastanesi Toxoplasma referans laboratuvarında kullanılan yöntemleri ileride Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim dalı laboratuvarlarında uygulamayı planladık.

KAYNAK BİLGİLER

Toxoplasma gondii ilk defa 1908 yılında Kuzey Afrika' da bir kemirgen olan *Ctenodactylus gundi*' den Nicolle ve Manceaux tarafından izole edilip, *Leishmania*' ya olan benzerliğinden dolayı *Leishmania gondi* adı verilmiş, bir yıl sonra organizmanın adı morfolojik kriterlerden dolayı Yunanca yay anlamına gelen "*TOXON*" ön takısıyla *Toxoplasma gondii* olarak değiştirilmiştir (79, 99).

MORFOLOJİ VE EVRİM

Toxoplasma gondii bir coccidian protozoon olup etobur, otobur, kuş gibi tüm sıcak kanlı canlıların kas dahil bir çok dokusunda hücre içinde, ağır akut enfeksiyonlarda ise kan ve peritoneal eksuda da serbest halde bulunabileceği bildirilmiştir (**ŞEKİL2**) (103,128).

Konak hücrenin nukleusunda bile yaşayabildiği bildirilen parazitin sitoplasmada yaşamayı tercih ettiği gösterilmiş, enteroepitelial ve ekstraintestinal diye ayrılan iki yaşam döngüsü gözlemlenmiştir. Kedideki enteroepitelial döngüde seksüel ve aseksüel (şizogonik ve sporogonik) evrim sonucu dışkı ile atılan dış ortama dayanıklı *OOKİST*, arakonaklardaki ekstraintestinal döngüde aseksüel çoğalma sonunda oluşan *TROFOZOİT* (hızlı çoğalan form = endozoit = takizoit = vegetatif form) ve *BRADİZOİT* (yavaş çoğalan form = Doku kisti içindeki form = kistizoit) formlarının oluştuğu bildirilmiştir (99, 103).

TROFOZOİT: Trofozoitler yarım ay şeklinde bir ucu sivri, diğer ucu yuvarlak, genişliği 2-4µm, boyu 4-8µm olan bir protozoondur (**ŞEKİL 1**). Nukleusunun merkezi yerleşimli olduğu, kamçısı, sili ve yalancı ayaklarının olmadığı, kayarak ve vücudunun fleksiyonu ile uzun ekseni etrafında rotasyon ve takla atarak hareket ettiği belgelenmiş, parazitin tipik bükülmelerine konoidin yapısındaki spiral dizilişli mikrotübüllerin üzerindeki polar cismin, konoidin hareketine bağlı olarak ilerlemesinin yol açtığı, hareket hızının hücre içi ve dışı pH, aktin, miyozin ve mikrotübüllere bağlı olarak değiştiği, çoğalıp, yaşaması için intraselüler yerleşmesinin gerekliliği vurgulanmıştır (31, 85, 86, 104, 105, 123).

Kuruluğa, donmaya, çözünmeye, insan mide sindirim sıvılarına duyarlı olduğu bildirilen trofozoitler, laboratuvar şartlarında fare peritonunda, memelilerin hücre kültürlerinde, embriyonlu tavuk yumurtasında üretilebilmiştir (99).

İnsanın nasal, vaginal, göz salgularından, süt, tükürük, idrar, seminal mayi ve dışkılarından trofozoitlerin izole edilebildiği, bulaşta insanın tüm bu çıkartılarının rol aldığı vurgulanmıştır (103). Trofozoitlerin tükürükte 5, sütte 6, göz yaşında 4, idrarda 7 gün canlılıklarını sürdürdükleri ve klasik verilerde 10 trofozoitin normal mukozadan girmesinin enfeksiyon gelişimi için yeterli olduğu bildirilmiştir (118).

Trofozoitlerin kendi RNA ve DNA' larını sentezleyebilmesine, mitokondrial enzimlerinin tam olmasına rağmen, neden zorunlu hücre içi paraziti olduğunu gösteren veri bulunamamıştır. Remington ve Desmont yayınlarında, Norby ve Lycke' nin trofozoitlerden memeli hücrelerinin duvarında değişiklik yaparak konak hücreye girmelerini sağlayan, enzim özelliği taşıyan Penetrasyonu Kolaylaştırıcı Faktör'ü (PEF) izole ettiklerini bildirmişler, trofozoitlerin ayrıca konak hücre tarafından fagosite edilerek de hücre içine girebildikleri gözlemlenmiştir (99).

Konak hücreye girişin temel yolu olarak konoidin spiral şeklindeki ilerleyici hareketi ve roptrilerden salgılanan faktörler gösterilmiştir (124). Konak hücreye girişin parazitin bilinmeyen reseptör ve ligandlara bağlanması ile başladığı, bu ligantlardan birinin parazitin temel yüzey proteinlerinden olan P30 olabileceği, buna karşı üretilmiş Monoklonal antikolar (McAb) ile insan fibroblastlarında ve fare enterositlerinde enfeksiyon gelişiminin engellenmesiyle gösterilmiş, parazitin doku içerisinde P43, P35, P30, P22 ve arka kutuptan salgılandığı düşünülen 28kD' luk bir proteinin ortaklaşa olarak fagazomun asidifikasyonunu bozarak uygun ortam oluşturduğu bildirilmiştir (108).

Parazitin optimal olarak 37-39°C üreyebildiği vurgulanmıştır (127). Doku içinde Endodiyogeni ile (bir ana hücre içinde iki kız hücrenin oluşup bu ana hücreyi parçalaması) ürediği, bu bölünmelerin her 4-6 saatte bir tekrarlandığı ve trofozoit sayısı 64-128 olduğunda konak hücreyi patlatarak sonlandığı gösterilmiştir (ŞEKİL 6, 7) (99).

KİST: Konak hücre vakuolünde meydana gelen doku kistleri birkaç organizmadan 3000 organizma içeren 200 µm' luk kistlere kadar değişik boyutlarda olabileceği, bu kistlerin hayvanlarda enfeksiyonun 8. günü gibi erken bir dönemde oluşabildiği ve büyük bir olasılıkla konağın ömrü boyunca canlı kaldığı, her organda yerleşebildikleri halde, genellikle beyin, iskelet ve kalp kasını tercih ettikleri bildirilmiştir (99). Önceleri pseudokist adı verilmiş olan bu yapılara, daha sonra doku kisti denilmesi terminalojik olarak daha uygun bulunmuştur (127, 9).

Kistlerin yayılma dönemi sırasında mikroglial nodüllerin histopatolojik kesitlerinde gösterilmesi, kistlerin özgün yerleşim yerinin glial nodüller olduğu hipotezini desteklemiş, bu evredeki parazitlerin enerji kaynağı olarak latent faz boyunca intrasitoplasmik karbonhidrad vakuollerini kullandığı bildirilmiştir (35).

Bu formun takizoitlerle ortak antijenleri olduğu gibi, kendi özgün antijenlerinin de bulunduğu vurgulanmış, immun sistemi baskılanan şahıslardaki alevlenmelerden de bu kistler sorumlu tutulmuştur (70, 103).

Beyindeki kistlerin yuvarlak, kalp ve iskelet kasındakilerin adale liflerinin şekillerine uygun gelişim gösterdikleri izlenmiş, kist duvarının bir kısmının nöronal sitoskeletondan yapıldığının gösterilmesi bu kistlerin konağın immünitesinden nasıl korunduğunu kısmen de olsa açıklamıştır (109).

Kist duvarı peptik ve triptik etki ile bütünlüğünü kaybettiğinde serbest kalan parazitlerin pepsin-HCl içinde 2 saat, tripsin içinde 6 saat canlı kalabildikleri, böylece normal sindirim periyodundan etkilenmedikleri, fakat kuruluğa, dondurup, çözmeye ve 66°C üzerindeki sıcaklığa duyarlı olduğu, 4°C' de 2 ay kadar canlılığını koruduğu, -20°C'da 18-24 saatte öldüğü bildirilmiş, kistlerin dış etkenlerle mi, yoksa konak hücreyi patlattıktan sonra farklılaşan trofozoitlerce mi oluşturulduğu kesinlik kazanmamıştır (99).

İmmünite gelişmesinin kist oluşumuna yol açan bir faktör olduğu bildirilmişse de 7-8 günlük bir yenidoğanın beyinde, kompleman ve antikordan yoksun doku kültür sisteminde oluşan kistinlerin, immün teorisinin kist oluşumunda rol oynayan tek faktör olamayacağı kanaatine varılmış, Remington ve Desmont, Shimada ve ark. yaptıkları bir çalışmadan yaptıkları alıntıda, doku kültür hücrelerinde, ortamda Toxoplasma antikoru ve kompleman varlığında kist oluşumunun hızlandığını bildirmişlerdir (99).

OOKİST: Ookistler iki sporokistli sporulasyondan önce yuvarlak, sporulasyonu takiben oval 11-14µm X 9-11µm' lik, her sporokistin (8,5µm X 6µm) içinde 4' er tane sporozoit (8µm X 2µm) bulunan T. gondii' nin dış ortama dayanıklı şeklidir. Sporulasyonun ortamın ısı ve oksijenine bağlı olarak değiştiği. 24°C' de 2-3 gün, 15°C' de 8 gün, 11°C' de 14-21 gün sürdüğü, 4°C' nin altında, 37°C' nin üstünde ise sporulasyon oluşmadığı gösterilmiştir (99).

Kedigillerde hem enteroepitelial, hem de ekstraintestinal döngüler görülürken, ara konaklarda sadece ekstraintestinal döngünün görüldüğü, yaklaşık olarak kedilerin % 1' nin dışkı ile ookist çıkardığı bildirilmiştir (99, 111).

Ekstraintestinal fazın en sık bradizoitlerin ağız yoluyla alınması ile başladığı, bazen ağızdan alınan takizoitler ve sporokistlerin de enfektan olabildiği, intrauterin transplental yolun da önemli bir bulaş yolu olduğu vurgulanmış, Toxoplasma ile çalışan labarotuar görevlilerinin enfeksiyonu iatrojenik olarak alabileceği, enfeksiyonun ayrıca tam kan veya lökosit tranfüzyonu, organ transplantasyonları ile de bulaşabileceği gösterilmiş, karasinekler ve hamamböceklerinin de kedi dışkılarındaki ookistleri gıdaların üzerine taşıyarak bulaşta rol oynayabilecekleri yayınlanmıştır (92, 99, 103).

İnsanlar tarafından gıda olarak tüketilen koyun etinin % 10' nunda, domuz etinin % 25' inden Toxoplasma kistleri izole edilmiş, sığır etinden de kistlerin izole edilmesine rağmen prevalans ile ilgili, sağlıklı veri bildirilmemiştir (92).

Sporokistlerden serbest kalan sporozoitlerin bir kısmı kedigillerde enteroepitelial döngüyü başlatmak üzere ince barsak epitel hücrelerine girerken geri kalanlar hem kedigillerde hemde aralarında insanın da bulunduğu tüm arakonaklarında mukozayı delip gelişmelerine başlayacakları lamina propria, mezenterik lenf düğümleri, uzak organlardaki hücreler ve lökositlere yerleştikleri gösterilmiştir (118).

Kedi harici konaklarda enteroepitelial gelişme görülmediği, sporozoitin konak hücreye girerek hemen endodyogeni ile çoğalmaya başladığı, trofozoit adını alan bu hücrelerin, konak hücre parazitofor vakuolünde 8-32 adet olacak şekilde çoğalıp toplanmasına *GRUPLANMA* adı verilmiş, bu konak hücre patlayınca serbestleşen trofozoitlerin, yeni hücreleri enfekte ederek döngüyü sürdürdükleri, mide asiditesine aşırı duyarlı olan bu formun enfeksiyon bulaşında diğer formlardan daha az önemli olduğu vurgulanmış (103).

Schmidt ve Roberts enfeksiyon kronikleştikçe beyin, kalp ve iskelet kasını tutmuş olan olan zoitlerin akut faza göre çoğalma hızlarının yavaşladığını, konak hücresi içinde daha çok sayılarda toplanmaya başladıkları yayınlanmış, etrafı sağlam bir duvarla çevrilen bu kistlere önceleri bu duvarın konak kaynaklı olduğu düşünüldüğünden dolayı **Yalancı Kist** denildiğini, fakat kistin nereden

kaynaklandığı tam olarak gösterilemediğinden **Doku Kisti** teriminin tercih edildiğini bildirmişler, kalıcı immünitinin gelişmesiyle bu kistlerin özellikle sinir sistemi dokularında yıllarca kalacak şekilde yerleştiğini, immünitinin azaldığı durumlarda, serbestleşen bradizoitler immüniteyi tekrar eski seviyesine getirebileceği, süperenfeksiyona karşı oluşan bu korumaya da **PREMUNİSYON** denildiğini vurgulamışlardır (103).

Toxoplasma' ya karşı oluşan immünitinin, hücresel tipi ön planda olan, fakat sıvısal immünitinin de rol oynadığı, miks tipte olduğu ortaya konulmuş, inflamatuvar bir reaksiyonun görülmemesinin hem kist duvarının, hemde bradizoitlerin hücre içinde gelişmesine, ayrıca ince fakat sağlam kist duvarının konak ile parazitleri çok etkin olarak ayırmasına bağlanmış, Pepsin ve Tripsin ile sindirilmeye direçli olan bradizoitlerin ağızdan alındıklarında enfeksiyonu bulaştırdıkları yayınlanmıştır (103).

Enteroepitelial fazın başlayabilmesi için, kedinin bradizoit içeren zoitokistleri, sporozoit içeren ookistleri ya da nadiren takizoitleri ağız yolu ile alınmasının, ya da ekstraintestinal zoitlerin intestinal mukozaya göç etmesinin gerektiği izlenmiş, ince veya kalın barsağın epiteline girdikten sonra takizoit şekline dönen parazitin büyümeye ve merogoniye hazırlandığı gözlenmiş, suş farklılıklarına bağlı olarak merogoni, endodiyogeni, endopoliyogeni sonucu, ortalama 2-40 merozoit oluşması ile aseksüel evrenin tamamladığı bildirilmiştir (103).

Merogoni döngüsünün sayısı değişken olmakla beraber kiste bağlı enfeksiyonlarda gametosit oluşumu 3-15 gün aldığı, gametositin ileum başta olmak üzere tüm ince barsaklarda gelişebildiği, % 2-4' ünün erkek özellikleri taşıdığı ve her birinden 12 adet mikrogamet oluştuğu gösterilmiştir (**ŞEKİL 3**) (99).

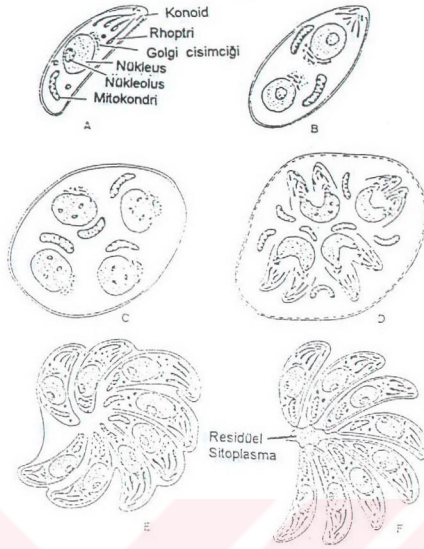
Kist ile olan enfeksiyonlarda ookist çıkana kadar geçen prepatent dönemin 3-5 gün aldığı, ookist atımının 5. ve 8. günler arasında tepe noktasına ulaştığı vurgulanmış, prepatent dönemin takizoitle olan enfeksiyonlarda 7-10 gün, ookistle olan enfeksiyonlarda 20-24 güne kadar uzayabildiği, ookist çıkartma süresinin 7-20 gün arası olduğu, bir günde atılan ookist sayısının 10 milyonu bulabileceği görülmüştür (99,103).

İlk insan olgusunu 1923'de Prag'lı bir göz hekimi tarafından yayınlandığı, daha sonraki çalışmalarda Toxoplasma' nın prenatal olarak da bulaşan bir insan

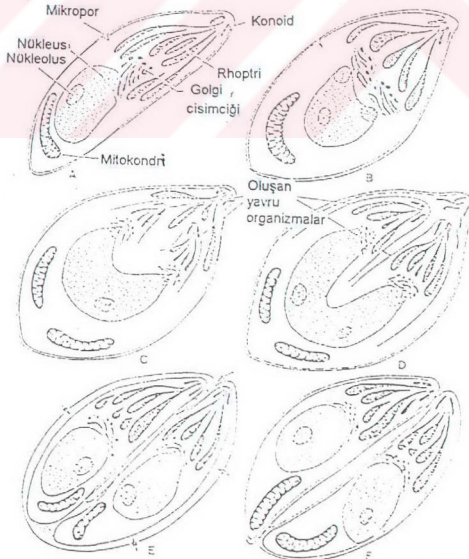
hastalığı olduğunu bildirmiş, ayrıca hastalığın edinsel formunun da olduğunu açıklamışlardır. Sabin ve Feldman'ın 1948 yılında serolojik tanı yöntemi olarak "*Dye test*" i geliştirmesiyle toxoplasmosis'in epidemiolojik ve klinik yönleri ile ilgili insanlar üzerindeki çalışmalar yayılmaya başlanmıştır (99).

Yapılan çalışmalarda kedigillerin kesin konak, etoburların, böcek yiyenlerin, kemirgenlerin, otoburların, primatların, domuzların, diğer memelilerin ve kuşların bile ara konak olduğu bildirilmiştir (103).





ŞEKİL 6: A, B, C, kedi ileumundaki barsak hücrelerinde trofozoitin geçirdiği endopoligeniyi gösteriyor. D, Nükleer ve mitokondrial bölünme. E-F Ana parazite içinde merozoitlerin şişmiş membranları, Ana hücrenin dış membranı invagine edilmiş, her bir merozoitin dış membranını oluşturuyor.



ŞEKİL 7: Trofozoitin endodiyogeni evresi. A. Tipik trofozoit, B. endodiyogeninin ilk tipik bulgusu olan Golgi cisimciğinin bölünmesi, C. Nükleus ayrılması ve etrafında membran oluşumu, D. Yavru hücre membranları öne doğru ilerleyip ana hücre sitoplasmasını çevirir, E. Nükleus bölünür, F. Endodiyogeni tamamlanır, yavru hücreler bir süre daha arka uçlarından yapışık kalır. (99)

Klinik toxoplasmosis çok nadir görülmesine rağmen Toxoplasma antikorlarının tüm dünyada çok yüksek prevalans gösterdiği, enfeksiyonun çoğunlukla (% 90) asemptomatik veya orta şiddette olduğu gösterilmiş, ABD' de kronik, asemptomatik toxoplasmosis' in yaşa bağlı prevalans gösterdiği, her bir yaşla beraber prevalansında % 0,5 ile % 1 arasında arttığı bildirilmiştir (103).

ABD'deki bir veriye göre de 10-19 yaş arası nüfusta enfeksiyonun serolojik bulgusu % 5-30 arasında, 50 yaş üzerindeki nüfusta da % 10-67 bulunmuştur. Bu duruma yol açan faktörler de aşağıdaki gibi sıralanmıştır:

- 1-Toxoplasma suşunun virulansı,
- 2-Konağın duyarlılığı ve türü,
- 3-Konağın yaşı,
- 4-Konağın edinsel immünesinin derecesi (92).

Enfeksiyona karşı doğal direncin veya duyarlılığın nedeni ile ilgili kesin veriler bildirilmemiş, tüm dünya nüfusunun % 13' ün enfekte olduğu, 1976 yılı itibariyle dünyadaki toxoplasmosis prevalansının 500 milyon üzerinde olduğu, dünya erişkin nüfusundaki insidansın da % 40 olduğu varsayılmıştır (118).

Smith toxoplasmosis prevalansının yaşam tarzına, alışkanlık ve geleneklere bağlı olarak ülkeler arasında çok çeşitlilik gösterdiğini, örneğin Paris'teki enfeksiyon oranı çiğ et yeme alışkanlığına bağlı olarak % 50' lere çıkarken, Washington' da % 19 civarında olduğunu, yaş artıkça oranın % 32' ye kadar çıktığını bildirmiş, yayınında çeşitli araştırmacıların aşağıdaki sonuçlarına yer vermiştir (111);

Amerika' da bir araştırmada hamilelerde prevalans % 8,1 olarak bildirilmiş ve her 1000 kadından 5' nin gebelik esnasında Toxoplasma' dan etkilendiği ilave edilmiş, bir başka çalışmada ABD'de her 3 gebeden birinin seropozitif olduğu, Alaska' da prevalans % 28 iken, Oslo'daki bir çalışmada % 56,6 olduğu görülmüş, Panama' daki bir çalışmada toxoplasmosisin kırsal kesimde % 57,5 kentli nüfusta ise % 58,6 olduğu, Japonya'da 20-29 yaş arası % 2,9 olan seropozitivitenin 70-90 yaşları arası % 40' a çıktığını gösterilmiş, Marshall adasında % 93,8 olduğu. Hollanda'da 10-14 yaşları arası kızlarda % 30, 20-29 yaş grubu kızlarda % 50-60 olarak izlendiği, Kenya' da 1-3 yaş arası % 40 olan seropozitivitenin 10 yaşına gelindiğinde % 60' lara çıktığı, Çin' de oranın % 0,7 gibi az bulunmasının sebebi Çin geleneğinde yemeklerin daima iyi pişmiş yenmesine ve kedi sayısının azlığına bağlandığı bildirilmiş, tüm bu çalışmalardaki farklı verilere rağmen tek ortak bulgu

olarak hastalığın her iki cinsiyeti de eşit olarak etkilediği ve populasyonun yaşı artıkça seropozitivitenin de arttığı bildirilmiştir (111).

Ülkemizde prevalans ile ilgili sağlıklı çalışma yapılmadığı için Türkiye ile ilgili veriler bildirilememiştir.

Bir çok dokuda çoğalabilen takizoitlerin konak hücrenin doğal ömrünü kısalttığı, esas tahribatın retina ve beyinde olduğu, yaşın rezistansta rol oynayan önemli bir faktör olmasının erişkin ve genç erişkinlerdeki enfeksiyonun, istisnai durumlar hariç, asemptomatik seyretmesine yol açtığı bildirilmiştir (103).

Asemptomatik enfeksiyonların gebelik, yaş (**çok genç-çok yaşlı**), konjenital immün defektler (**agamma-globulinemi**), kronik enfeksiyonlar (**HIV, sıtma, kızamık**), malnütrisyon, neoplaziler, özgün tedaviler (**tümör tedavisi, transplantasyon cerrahisi**), Kollagen-vasküler hastalıklar (**Sistemik Lupus eritematosus**), ameliyat (**splenektomi**) gibi nedenlerle immün sistemin baskılanması sonucu fulminan hale geçtiği gösterilmiştir (111).

Semptomatik enfeksiyonlarda klinik

AKUT ENFEKSİYON: İnsan dahil diğer arakonaklarda ilk tutulan bölge mezenterik lenf bezleri ile karaciğer parankimi olup, bu organların çok hızla rejenera olabilmeleri parazitin yayılımı için güzel bir engel oluşturmaktadır. Akut toxoplasmosisin en sık rastlanan bulgusu servikal, supraklavikuler ve inguinal lenf bezlerindeki ağrılı, şişlik (LAP) olduğu gösterilmiştir (99).

Aseptomatik lenfadenopatinin lenfomayı taklit ettiği, pectoral lenf bezi tutuluşunun meme kanseri bulgusu verdiği, mezenterik ve retroperitoneal lenf bezi tutuluşlarında karın ağrısı ve 40°C'a yükselen ateşin olabileceği bildirilmiş, ayrıca ateş, boğaz ağrısı, ürtiker, baş, eklem ve adale ağrıları, konfüzyon, anemi, bazende pnomoni gibi akciğer şikayetlerinin eşlik ettiği izlenmiştir (92, 103).

Titreme, trombositopeni, makülopapüler deri döküntüsü (el ayakları ve ayak tabanları hariç), myokardit, hepatit ve ensefalit gibi bulgulara da rastlanıldığı, bulguların kolaylıkla gribal bir enfeksiyonla karışabileceği, akut enfeksiyonların nadiren de olsa ölümle sonlanabileceği, immünitenin yavaş geliştiği olgularda subakut klinik izleneceği, nefrit ve nefrotik sendromun hem akkiz, hem de konjenital toxoplasmosisin bir komplikasyonu olarak ortaya çıkabileceği, glomerülofritin IgM, fibrinojen ve Toxoplasma antijen/antikör çokmesine bağlı olduğu, pankreas tutuluşunun immün sistemi baskılanmış hastalara özgün olduğu, iskelet kası tutuluşlarında parazitlerle istila edilmiş patolojik değişiklik gözlemlenmeyen liflerden, fokal infiltrasyon alanlarına, nekrozla seyreden yaygın miyozite kadar değişken bulguların görülebileceği bildirilmiştir (72, 92, 111, 118).

SUBAKUT ENFEKSİYON: Takizoitlerin hücrelere zarar vermeye devam ettiği, akciğer, karaciğer, kalp, beyin ve göz gibi organlarda yoğun lezyonlara neden olduğu, santral sinir sisteminin, bu sistemdeki düşük immün direnç nedeniyle en fazla hasara uğradığı bildirilmiştir (103).

KRONİK ENFEKSİYON: Schmidt ve Roberts' a göre immünitenin takizoit proliferasyonunu baskılayabilecek düzeye erişmesi ile kronik enfeksiyon evresinin başladığı, bu dönemde kist oluşumunun da izlendiği bildirilmiş, kistlerin yıllarca hiç bir klinik şikayet oluşturmadan sessiz kalabildikleri, kist duvarı yırtılacak olursa serbestleşen bradizoitlerin çoğunun öldürülmesine rağmen, bir kısmının yeni kistler oluşturabildiği, bradizoitlerin ölümüyle buldukları bölgede yoğun aşırı

duyarlılığa bağlı inflamasyon geliştiği, beyinde, bu bölgelerin yerini göreceli olarak glial hücre nodüllerinin aldığı vurgulanmış, nodüllerin çoğaldığı durumlarda bazen spastik paralizinin de eşlik ettiği kronik ensefalopati tablosunun geliştiği gösterilmiştir (103).

Takizoitlerin neden olduğu retina hücrelerindeki tekrarlayan, kronik aktif enfeksiyonların makulada kör lekelere, makuladaki kistlerinin, bu kistlerin yırtılmasının ve yoğun enfeksiyonların kişilerde körlüğe neden olabileceği görülmüştür (103).

Kronik toxoplasmosiste kalıcı hasarlı myokardit ve pnomoni de olası patolojiler olarak gösterilmiştir (78, 103).

Toxoplasmosis' te hem hücreyel hem de sıvısal immünite önemli olmasına rağmen, immün sistemi sağlam kişilerde toxoplasmosis'in genellikle hücreyel immünite ile kontrol altında tutulduğu, enfekte şahsın immünitesi herhangi bir nedenle baskılandığında parazitin hızla yayılıp oküler toxoplasmosis' e veya ölümcül santral sinir sistemi lezyonlarına neden olabileceği bildirilmiştir (92, 103).

Akut santral sinir sistemi tutuluşlarında ve mikroglyal nodüllerle seyreden fokal veya diffüz meningoensefalit tablosu tanımlanmış, nekroz alanlarının sınırlarında monosit, lenfosit, plazma hücresi infiltrasyonu olabileceği, komşu perivasküler bölgelerde mononükleer hücre infiltrasyonunun görülebileceği, ayrıca damar duvarlarında da nekrozların izlenebileceği, nekroz alanlarının kitle görünümünü verebileceği, periferinde trofozoitlerin bulunabileceği vurgulanmış, fakat kistlerin ancak birinci haftadan sonra oluşabileceği bildirilmiştir (92, 103).

Toxoplasmosis' in *AIDS*' te de görülebilen fırsatçı parazitozlardan olduğu, genellikle takizoitlerin devamlı olarak çoğalmasına bağlı görülen kist yırtılmalarının en önemli ölüm nedeni olduğu yayınlanmıştır (78, 103).

KONJENİTAL TOXOPLASMOSİS hastalığın en ciddi formu olarak kabul edilmekte, hamilelik sırasında veya hamilelikten az bir zaman önce akut, çoğunlukla asemptomatik, toxoplasmosis geçirilmesinin spontan düşüklere, ölü veya prematür doğumlara, ya da zamanında doğan enfekte bebeklere neden olabileceği fakat, hamilelikte geçirilen her enfeksiyonun da mutlaka fetusu etkilemesinin beklenmediği bildirilmiştir (9, 103).

Eğer enfeksiyon hamilelikten 6 ay önce geçirmişse, bebeğin enfekte olmasının söz konusu olamayacağı, 6 aydan daha yakın bir zamanda geçirilmişse bebeğin enfekte olma olasılığının düşük olduğu, yenidoğan enfeksiyonlarının çoğunlukla asemptomatik olmasına rağmen, önemli sayıda yeni doğan ölümlünden, özürü yenidoğan oluşumundan T. gondii' nin sorumlu olduğu tespit edilmiş, parazitin plasenta engelinin anne kanı yolu ile aştığı fakat farelerde yoğun enfekte uterustan direkt bulaş olasılığı da gözlemlenmiştir (92, 103).

Maternal enfeksiyonun fetusa geçme riskinin % 45 olduğu, hastalığın enfekte bebeklerin % 60' ında subklinik seyrettiği, % 30' unda hidrosefali, intracerebral kalsifikasyon, sarılık, korioretinit, hepatosplenomegali, rahim içi gelişme geriliği, konvülsyon, mikrosefali ve zeka geriliği gibi ağır anomalilere neden olduğu, % 9' da da ölümlerle sonlandığı görülmüştür (7, 9, 111).

Toxoplasmosis' in hem insanlarda hem de hayvanlarda ölü doğumlardan veya düşüklerden sorumlu olabileceği, özellikle koyunlarda epidemiler ile seyreden düşüklere neden olabileceği yayımlanmıştır (99).

Smith, Swatzberg ve Remington' dan yaptığı alıntıda, hamilelikteki akut enfeksiyonun fütusa geçme olasılığını 1. trimestr için % 17, 2. trimestr için % 24, 3. trimestr için ise % 62 bildirmiş, subklinik olgularda da hayatın ileri dönemlerinde oküler toxoplasmosis gelişebileceğini ilave etmiştir (103).

Fransa'da 25000 hamile incelendiğinde, gebelik öncesi enfekte olan annelerin çocuklarının hiç birinde konjenital toxoplasmosis görülmemiş, gebelik esnasında veya gebeliğe çok yakın maternal toxoplasmosis saptanan 118 olgudan 9' unda düşük veya yenidoğan ölümü (fetal toxoplasmosis teşhis edilmiş) görülürken, 2' si ölümlerle sonuçlanan 39 akut konjenital, 28 subklinik toxoplasmosis olgusu teşhis edilmiş, diğer fetuslarda enfeksiyon izine rastlanılamamıştır (103).

Gebeliğin ilk üç ayındaki maternal enfeksiyonun fetusta ağır hasarlara yol açtığı, fakat son üç ayında bulaşma riskinin en yüksek olduğu, ikiz bebeklerden birinin ağır enfekte, diğerinin ise tamamen sağlıklı doğabileceği, enfekte çocukların beyninde sıklıkla konjenital bir hasar oluştuğu, buna bağlı olarak zeka geriliği, korioretinit gelişebileceği bildirilmiş, toxoplasmosis' in ABD' de kızamık, herpes, sifiliz enfeksiyonlarının toplamından daha fazla konjenital anomalieye yol açtığı savunulmuştur (99,103).

Toxoplasmosis kliniği

1.) EDİNSEL TOXOPLASMOSİS: Doğum sonrası oluşan bulaşları içeren gruptur. İlk defa 1941 yılında Sabin iki ensefalomyelitli çocuğa toxoplasmosis tanısı koymuştur. Genellikle selim seyirli olduğu için gözden kaçtığı, bazen diğer enfeksiyon belirtilerini taklit ederek örneğin akciğer toxoplasmosis'inin Tüberkülozu taklit etmesi, Toxoplasma hepatiti, Toxoplasma'nın mide ve barsaklarda yaygın lezyonlar yaparak ülserler ile karışması gibi, yanıtıcı teşhislere neden olabileceği bildirilmiştir (118).

1.1.) AğIR TİP;

1.1.1.) Genel enfeksiyon tipi: Golvan kitabında nadir olan bu klinik seyrini ilk defa Pinkerton ve Henderson tarafından 1941 yılında tanımlandığını, çoğunlukla kan hastalıkları, siroz, viral ve bakteriel enfeksiyonlara bağlı zayıf düşmüş çocuklarda ortaya çıktığını bildirmiş, hastalarda genel durumun bozuk, ateşin 40°C civarında olduğunu, yaygın kemik, eklem ve kas ağrıları ile şuur bulanıklığı, bitkinlik gibi semptomların yanısıra avuç içi ve ayak tabanlarında Rickettsiyozu anımsatan maküler veya makülopapüler döküntüler görülebileceğini yayınlamıştır. Bazende akciğer, karaciğer veya kardiovasküler tutuluşların gelişebileceğini, hastalığın seyri esnasında bu tablolardan herhangi birinin ön plana çıktığında, etiyolojik tanı konulamazsa prognozun kötü olabileceğini bildirmiştir (39).

1.1.2.) Meningoensefalit tip: Çoğunlukla çocuklarda görüldüğu, başlangıcının enfeksiyöz belirtilerle aynı zamanda veya genel belirtilerin sonlarına doğru olabileceği, ateş, sürekli yaygın ağrılar, yüzeysel ve çoğunlukla occipital bölgede gruplar halinde veya tek tek ele gelir nitelikte lenfadenopatilerin hemen her zaman görülebileceği, hemorajik eksudalı interstisyel pnömoni ve myokard tutuluşlarında da EKG bozukluklarına rastlanabileceği bildirilmiştir (39).

Golvan olgular kronikleştikçe ateşin 37.5- 38°C civarına düştüğu, uyku halinin ön plana çıkıp genel veya Jacksonian tip epilepsi krizlerinin geliştiğini, BOS' ta basıncın, albümin içeriğinin lenfosit ve hücre sayısının arttığını Toxoplasma trofozoitlerine nadiren rastlabileceğini, BOS' un ksantokromik bir görünüm aldığını, EEG' de belirgin bozuklukların izlenebileceğini bildirmiş, olguların ölümlerle sonlanabileceği gibi bazen hiç sekel bırakmadan, bazende epilepsi gibi bir sekelle sonlanabileceğini vurgulamıştır (39).

1.2) SELİM TİPİ;

1.2.1.) Enfeksiyöz Mononükleöz (EMN) tipi: Hafif bir ateş ile başlayan ağız, farenks belirtileri, sedimentasyon yüksekliği olmayan gribal bir enfeksiyonu taklit ettiği, anjinin nadiren fakat bakteriyel ajanlarla beraber görüleceği, splenomegali ve lenfadenopatinin eşzamanlı olabileceği bildirilmiştir (39).

Histopatolojik olarak lenfadenitte reaktif foliküler hiperplaziye eşlik eden veziküler nükleuslu epitelioid histiosit kümeleri ile germinal merkeze kadar uzanıp sınırlarının belirginliğini bozan eosinofilik sitoplasma, germinal merkezde bol mitoz, bol nekrotik hücreler, subkapsüller ve trabeküler sinüslerin monositoid hücrelere bağlı şişkinliğin gözlendiği, trofozoit ve kistlerin kesitlerde çok nadiren görülebildiği vurgulanmış, hemogramda monositoz ve lökopenin belirgin, Paul-Bunnell testinin negatif olduğu bildirilmiş, Heterofil antikorları bulunmayan EMN' lu hastaların % 15' inde edinsel toxoplasmosis olduğu yayınlanmıştır (92).

1.2.2.) Ateşsiz Lenfadenopatili tip: Lenf bezlerinin gruplar halinde tutulduğu, en sık occipital, jugulo-carotidien, trapezius altı ve subclavikuler lenf bezlerinin badem veya kiraz büyüklüğünde ağrısız, elastik kıvamda ve hareketli olarak ele geldiği, derin lenfadenopatilerin çok nadiren gelişeceği vurgulanmış, lenf bezlerinin yavaşça küçülerek aylarca palpe edilebileceği, eosinofili ve nötroopeninin sıklıkla tabloya eşlik ettiği, patolojik muayenede histomonositer proliferasyon görüldüğü, tanının serolojik olarak konulabileceği vurgulanmıştır (39).

1.2.3.) Sessiz form: Kesin olmamakla beraber olguların % 90' nın asemptomatik seyrettiği, daha önceden olumsuz olduğu bilinen serolojik testlerin pozitif olması ile gösterilmiş, laboratuvar enfeksiyonlarında hiç bir bulgu görülmediği, hamileliği esnasında hiç bir enfeksiyon tanımlamayan annelerin konjenital toxoplasmosis'li çocuklar dünyaya getirebildiği yayınlanmıştır (39).

1.2.4.) Edinsel Göz toxoplasmosis' i: Toxoplasmosis tüm korioretinitlerin % 35' inden sorumlu tutulmuş, posterior üveitlerde bu oranın daha da yükseleceği, akkiz toxoplasmosis'te üveit görülme sıklığı % 1 civarındayken, konjenital olgularda % 80' lere çıktığı, göz tutuluşlarının genellikle benign formların bir komplikasyonu olduğu, ateşli lenfadenopatili toxoplasmosis sırasında korioretinite rastlanabileceği, göz tutuluşlarının ilerleyici ve alevlenmelere meyilli oluşları nedeniyle çok önemli olduğu vurgulanmıştır (92, 118).

Göz tutuluşlarında tek veya multiple fokal nekrozların ilk bulgu olabileceği, infiltrasyona lenfositlerin, plasma hücrelerinin ve mononükleer fagositik hücrelerin yol açacağı, retinal lezyonlarda hücre içi-dışı trofozoit ve kistlerin görülebileceği, koroidte görülen granümatöz infiltrasyonun nekrotizan retinite bağlı sekonder geliştiği bildirilmiştir (92).

Göz ortamı az antikor içerdiğinden kistleşmenin oldukça selektif görüldüğü, retinadaki kistlerin çeperleri bozuluncaya kadar yıllarca bulgu vermeden kalabileceği, çeper yırtıldığında serbestleşen paraziter antijenlerin allerjik bir reaksiyonla lokal ödem ve nekroza sebep olabileceği bildirilmiş, önceleri çok küçük olan hasarın, olayların tekrarlanması ile geri dönüşümü olmayan ağır hasarlara dönüşebileceği izlenmiştir (39).

Hasar genellikle makula veya makula çevresinde olup, göz dibi bakısında retinada patognomik bir bulguya rastlanılmayacağı bildirilmiş, başlangıçta etrafi konjestif bir halka ile çevrili lokal bir ödem görülebileceği, sonra merkezde gri renkli bir nekrozun gelişip, sürekli lokalize seyreden konjoktif proliferasyon ile gelişen atrofik sikatrizasyon ile sonlanacağı yayınlanmıştır. Bu dönemde merkezde pseudotümöral bir kitle ve sedefi beyazlıkta bir odak görülebileceği, olayların ilerlemesi ile gözün diğer tabakalarının hatta üveanın tutulup, posterior üveit ve panüveitlerin bile gelişebileceği bildirilmiştir (92).

Aktif korioretinite bağlı olarak görme bulanıklığı, skotomlar, ağrı, fotofobi, ve epifora olabileceği, makula tutuluşlarında santral görmenin bozulacağı ve kaybolacağı izlenmiş, çocuklardaki şaşılığın korioretinitin erken bir bulgusu olabileceği vurgulanmıştır (92).

Sistemik enfeksiyon bulgularının nadiren eşlik edebileceği, görme keskinliğinin inflamasyonun gerilemesi ile biraz düzelebileceği, episodik alevlenmelerin retina tabakasında geri dönüşü olmayan hasarlara, glokom ve körlüğe, sonunda da enokülasyona neden olabileceği bildirilmiş, akut olaylarda lezyonların sarı-beyaz pamuk atığı gibi kabarık, sınırları düzensiz çevresi hiperemik alanla çevrili olarak görüleceği, vitreustaki inflamatuvar eksudanın fundusun görülmesini zorlaştırabileceği, eski lezyonların ise atrofik, gri-beyaz renkli, belirgin sınırları olan koroidal pigmente siyah noktalar içerdiği gözlemlenmiş, Toxoplasma' ya bağlı izole anterior üveit olguları gösterilememiştir (92).

2) KONJENİTAL TOXOPLASMOSİS:

Hamilelikte geçirilen akut toxoplasmosis esnasında Toxoplasma' ların plasentayı geçip fetusu etkilemesi ile oluştuğu gösterilmiştir (ŞEKİL 4) (99).

Hamilelik sırasında maternal enfeksiyon insidansının Amerika'da % 0,02, Avrupa'da ise % 2-8 olduğu, insan organizmasının kronik toxoplasmosis'i fetusa geçiremediği ve gebelik öncesi immünolojik reaksiyonları pozitif olan kadınların sağlıklı çocuklar doğuracağı, bağışık yanıtı sağlam kronik toxoplasmosis' li kadınlarda, Toxoplasma kisti yırtılsa bile immün sistemin baskısıyla fetusun etkilemesinin önleneceği kanaatine varılmıştır (73, 118).

Hamilelikte geçirilen her akut toxoplasmosis'in fetusu çoğunlukla etkilemeyeceği, immün olmayan hamilelerin, enfekte olduğunda fetusun enfekte olma şansının % 20-40 arasında olduğu yayınlanmıştır (111),

Toxoplasmosis'in anne ve çocukta Sitomegalik inklüzyon hastalığını taklit ettiği, Unat' a göre konjenital toxoplasmosis' teki dört ana bulgu olan Korioretinit, serebral kalsifikasyon, hidrosefali ve psikomotor bozukluklardan en güvenilirinin, korioretinit olduğu vurgulanmıştır (7, 118).

A.B.D.' de konjenital toxoplasmosis 10^4 canlı doğumda 10-40 arasında olduğu, bunun yaklaşık yılda 3000 bin enfekte çocuk anlamına geldiği, bunların 1/3' nün doğumda belirti verdiği veya öldüğü, geri kalanların asemptomatik doğduğu, ancak ileri yaşlarda bulgu verdiği gözlemlenmiştir (111).

Konjenital toxoplasmosis' li bebeklerin ileri yaşlarda çok ciddi sağlık problemleri ile karşılaştıklarının gösterilmiş olması, seronegatif kadınların bile hamileliklerinde serolojik takibini zorunlu kıldığı, A.B.D.' de çocuk sahibi olabilecek yaştaki kadınların % 30' unun seropozitif olduğu vurgulanmıştır (111).

Enfeksiyonun fetusa plasentadaki odaklardan bulaştığı, parazitin anne dolaşımından fetal dolaşıma direkt olarak geçemediği, invazyon döneminin çok kısa olmasının anne tarafından kısa sürede koruyucu antikor geliştirilmesine ve bunları fetusa geçirmesine bağlı olduğu, parazit fetusun sinir dokusunda ve retinasında canlı kalabildiği halde diğer dokulardan kısa sürede kaybolduğu gözlenmiştir (99).

Transplasental bulaşın hamileliğin 1. veya 2. trimestrinde olduğu durumlarda fetusun, ölü veya hidrosefali, intraserebral kalsifikasyon, psikomotor bozukluklar ve korioretinit gibi ciddi patolojik bozukluklar ile doğacağı, transplasental geçişin 3. trimesterde olduğu durumlarda ise çocuğun normal görünümde olacağı, fakat doğumdan sonraki günler, haftalar, aylar hatta yıllarda semptomların gelişeceği, bulaş tarihine bağlı olarak aşağıdaki tablolar görülebileceği belirtilmiştir (39).

2.1.) SEPTİSEMİK BİRİNCİ DÖNEMDE DOĞAN ÇOCUKLAR:

2.1.1.) **Ağır form:** Hepatosplenomegali ve ikter ile başlayıp, önceleri makülopapüler olan döküntülerin kısa zaman sonra purpurik görünüm alarak tabloyu hemorajik sendroma dönüştürdüğü, hemogramda trombositopeni ve eritroblastoza bağlı anemi görüldüğü, toxoplasmosis' e özgün serolojik testlerin yapılmadığı olguların multiparlarda anne-fetus uyumsuzluğu, primiparlarda ise viral veya bakteriyel bir enfeksiyonla karıştırılabileceği vurgulanmıştır (39).

2.1.2.) **Atenu form:** Seyrek görüldüğü, hepatit ve ikterin ön planda olup, bir kaç hafta veya ay sürebileceği, genellikle sekel bırakmadan iyileştiği, nadiren de olsa siroza gidiş veya latent döneme kadar ensefalopati gelişebileceği vurgulanmıştır (39).

2.1.3.) **Doğumda ortaya çıkmayan form:** Oldukça sık olduğu, parazitozun bir yıl veya daha fazla latent kaldığı, bu dönemi takiben sadece göz bulguları ile ortaya çıktığı gözlenmiştir (39).

2.2.) ANTİKORLARIN OLUŞTUĞU İKİNCİ DÖNEMDE DOĞAN ÇOCUKLAR:

Uyku hali, hipotoni, kasılmalar hatta epilepsi krizleri ile karakterize ensefalopati tablosunda BOS ksantokromik, albuminden zengin olarak tanımlanmış, göz dibi bakısı ve kraniografi gerekli olduğu vurgulanmıştır (39).

2.3.) ÜÇÜNCÜ DÖNEMDE DOĞAN ÇOCUKLAR:

Bu dönemde trofozoitlerin görülmediği, yalnızca kistlerin varlığı ve yüksek antikör düzeyinin tipik olduğu bildirilmiş, önceki iki dönemde de olan uterus içi olayların bu dönemde de devam ettiği görülmüştür (39).

2.3.1.) Ağır form: Santral sinir sistemi (SSS) ve göz tutuluşunun ön planda olduğu, SSS tutuluşlarında yaşamın ilk günlerinde, ya da 3. aydan 10. aya kadar olan süre içerisinde hidrosefalinin tabloya hakim olacağı, ileri dönemde tetani ve geç psikomotor bozuklukların, kraniografide gri cevherde kalsifikasyonların izlenebileceği, ventrikulografide dilatasyon görülebileceği, lomber ponksiyon ile alınan sıvının temiz, ventrikül ponksiyonu ile alınan sıvının patolojik olmasının Silvius tıkanıklığına bağlı oluşabileceği bildirilmiş, göz tutuluşu görülen olguların sık olduğu, korioretinitin tek veya çift taraflı olabileceği, diğer göz bulgularına ilave olarak lens opasitesi ve iritis gelişebileceği yayınlanmıştır (39).

2.3.2.) Tamamlanmamış form: Sık görüldüğü, tek semptomlu olabileceği, okul çağı çocuklarında isole bir korioretinitle kendini gösterebileceği, sessiz olarak ilerleyen olguların % 33' ünde körlük gelişebileceği, hidrosefali, mikrooftalmi, mikrosefali, ensefalopati, oligifreni, genel veya Jacksonian tip epilepsi görülebileceği, fakat retina tutuluş ve serebral kalsifikasyon tabloya eşlik etmediği için toxoplasmosis teşhisinin konmasının zor olduğu vurgulanmıştır (39).

2.3.3.) Sessiz form: Konjenital toxoplasmosis' in en sık görülen formu olduğu tahmin edilen bu tablodaki hastaların her zaman semptom verebileceği hatırlatılmıştır (39).

Remington ve Desmont, Callahan ve ark. çalışmasından yaptıkları alıntıda, yenidoğan toxoplasmosis' inde en kesin tanı yönteminin Beyin-Omurilik sıvısı (BOS) bakışı olduğunu, BOS' taki ksantokromi ve mononükleer pleositosisin bir çok yenidoğan enfeksiyonunda görülebileceğini, fakat ventriküler sıvıdaki çok yüksek protein konsantrasyonunun oldukça özgün olduğunu, periferik kanda lökositöz veya lökopeni, erken evrede lenfositoz veya monositoz olabileceğini, polimorf nüveli lökositöz varlığının bakteriyel süperenfeksiyon lehine olduğunu, trombositopeninin bebeklerdeki klinik veya subklinik toxoplasmosis' te sık görülen peteşi ve ekimozlardan sorumlu olduğunu, yenidoğan enfeksiyonlarında % 30 sıklıkla eosinofili görüldüğünü bildirilmişlerdir (99).

Histolojik tanıda dokularda (beyin biopsisi, kemik iliği aspirasyonu gibi) veya vücut sıvılarında (ventrikül sıvısı, BOS, humor aköz, balgam gibi) trofozoitlerin gösterilmesi akut toxoplasmosis tanısında en kıymetli bulgu olarak kabul edilmiş, kistlerin varlığının, enfeksiyonun erken dönemlerinde de kistleşme bildirildiğinden, olgunun kronik ya da akut olarak değerlendirilmesine yardımcı olamayacağı, akut akkiz toxoplasmosis' te görülen lenfadenopati' den parazitin izolasyonunun her zaman mümkün olmadığı, fakat konağın reaktif cevabının öntaniya yardımcı olabilecek nitelikte olduğu vurgulanmış, özgün IgG titresinde anlamlı artışların nadiren saptanması, özgün IgG titresinin uzun süreli varlığı, bireylerin enfeksiyona verdikleri immün cevaplardaki belirgin farklılıklar tanıda IgG' yi tek kriter olarak kullanmanın yeterince güvenilir olamayacağı kanaatini uyandırmış, fakat özgün IgG saptanamamasının toxoplasmosis tanısını tamamen ortadan kaldıracığı bildirilmiş, akut enfeksiyon şüphesi olan durumlarda membran antijenlerine yönelik bir testin (DT gibi) gerçekleştirilmesi, yeni enfeksiyonlarda da özgün IgM aranması tavsiye edilmiştir (65, 94)

Hamilelik öncesi taramada akut toxoplasmosis tanısı almış kadınların konjenital enfeksiyon riski taşımadan ne zaman hamile kalabileceklerini yetkili bir klinisyene danışması tavsiye edilmiş, danışılan otörün riski, maternal parazitemi ve buna bağlı plasentitis belirlendikten sonra saptaması önerilmiş, parazitemi süresi süşun virulansı ve bireyin immün cevabına bağlı olduğu için uzmanlar özgün Toxoplasma antikörleri tespit edilemiyene kadar hamileliğe izin verilmemesini önermişler, özellikle ISAGA gibi yöntemlerin yaklaşık 1 yıl süre ile IgM tespit edebilmesi bu uyarının çok destek almasına yol açmış, bazen sosyal ve obstetrik faktörler nedeniyle akut toxoplasmosis tanısı almış kadınların IgM düzeyinin düşmesini bekleyememesi söz konusu olduğunda, hamile kalmak için 6 ile 12 ay arasında beklemenin ve kısa süreli bir tedavinin desteği ile bu sürenin 6 ay civarında bir zamana indirgemenin mümkün olacağı kanaatine varılmıştır (50).

Antenatal taramanın Fransa, Avusturya gibi ülkelerde uygulandığı, A.B.D. ve İngiltere'de de uygulanmasının planlandığı, fakat böyle masraflı bir yöntemin uygulanması için yeterince yüksek insidans ve ciddi koruyucu önlemlerin alınmış olması gerekliliği, kullanılacak testlerin belirlendikten sonra, duyarlılık, özgünlük, kolay gerçekleştirilebilmesinin hep programın lehine olması gerekliliği vurgulanmış, antenatal tarama programlarında optimum şartlar belirlenmemiş olması ortak programların yapılamamasının nedeni olarak gösterilmiş, Fransa'da önce IgG aranması, bunu IgM aranmasının izlemesi önerilmiştir (16, 50).

Bu yöntemler ile negatif bulunan şahısların eğitimi planlanması, gebeliğin ilerleyen dönemlerinde insidansı azaltacak programların uygulanması önerilmiş, pozitif bulunan olgularda gebeliği sonlandırma, profilaktik spiramisin tedavisi, fetal kan örneği incelenmesi ve “ *in utero* ” tedavi önerilmiş, IgG’ nin önce taranıp bunu IgM araştırmasının izlenmesi, şüpheli olgularda IgM araştırmasının tekrarlanmasının ekonomik avantajlar sağlayacağı varsayılmış, çoğu ülkede konjenital toxoplasmosis oranının düşük olduğu bildirilmiş, bunun için yalnızca pozitif reaksiyonları elimine edebilmek için yüksek özgünlükte tarama testlerinin kullanılma zorunluluğu vurgulanmış, laboratuvarlarda öncelikle LAT ile IgG aramayı, reaktif örneklerde de IgM araştırılması dahil ileri tetkiklerin gerçekleştirilmesi gerekliliği bildirilmiştir (16, 50).

Akut maternal toxoplasmosis olgularında fetal örneklerle yapılan “in utero” çalışmalar teröpatik abortusun çağre olmasını engellemeye yönelik olarak planlanmış, kordosentez ile fetal kan örneği alımı önerilmiş, ultrasonografi, fetal hematoloji, karaciğer fonksiyon testleri, parazit izolasyonu, özgün ve özgün olmayan IgM araştırması ile 42 olgunun 39’ unda Konjenital toxoplasmosis tanısının konulduğu bildirilmiştir (50).

İn utero olarak enfekte fetusların ancak % 21’inde özgün IgM tespit edilebildiği, amnion sıvısı ve fetal kan örneklerinin fare periton inokulasyonunun duyarlı ama çok süre alan (ortalama 45 gün) bir yöntem olduğu, fetal kan örneği alınmasının hamileliğin 20. haftasının en uygun olduğu, bu dönemden sonra ise gebeliğin töröpatik olarak sonlandırma şansı kalmadığı, hücre serilerine ekimin daha hızlı sonuç vermesifakat duyarlılığının az olması nedeniyle her zaman tercih edilmediği, son zamanlarda Toxoplasma DNA’sının hızlı bir şekilde işaretli problemler ve PCR ile gösterilmesinin tercih edilen bir yöntem olduğu bildirilmiştir (16, 50).

Kordosentez ile fetal kan örneği alımı sırasında fetal kayıpların % 2’ ye ulaşabildiği, prematür doğumlar, uzamış kordon kanamaları, rahim içi gelişme geriliği gibi komplikasyonlar bildirilmiş, bundan dolayı hastalığın geçmişi ile ilgili antenal taramada bulguları yoksa bu komplikasyonların göz önünde bulundurularak klinisyenin yönlendirilmesi önerilmiş, maternal dolaşımdaki IgM miktarı düşük düzeylerdeyse konjenital enfeksiyon riskinin düşük olabileceği vurgulanmış, fetal kan örneği alınması yerine anneye profilaktik Spiramycin uygulanmasının doğru olacağı kanaatine varılmıştır (16, 50).

Konjenital enfeksiyonun post-natal tanısında çoğu enfeksiyonun asemptomatik seyretmesi nedeniyle ya perinatal tarama sonuçlarından ya da oküler hastalığın görülmesinden yaralanıldığı, ağır olgularda hidrosefali, serebral kalsifikasyon ve korioretinit ile ön tanıya gidilebileceği, parazitin yenidoğan kanından veya plasentadan izole edilmesinin tanı açısından çok kıymetli olduğu, fakat her olguda, özellikle profilaktik spiramycin verilmiş annelerin çocuklarında mümkün olmadığı, IgG titreleri ile değerlendirme yapmak durumunda kalındığında, IgG'nin yarı ömrünün 30 gün olduğu göz önünde bulundurularak, pasif olarak plasentadan geçen IgG'nin dolaşımdan giderek çekileceği, 10 aydan sonra tespit edilen IgG'nin konjenital toxoplasmosis belirtisi olarak değerlendirilmesi önerilmiş, tanı konulduktan sonra 1 yaşına kadar özgün tedavi uygulanmasının doku harabiyetini azaltacağı vurgulanmıştır (22, 50, 55).

IgG titresinin takibinin tedaviyi geciktireceği, anneden belli bir miktar kan plasenta hasarı nedeniyle bebeğe geçmemişse bebekte özgün IgM varlığının tespiti enfeksiyonun "*in utero*" olarak bulaştığının göstergesi olarak kabul edilebileceği, yarı ömrü 5 gün olan IgM'in, DS-ELISA ve IFA testine göre daha duyarlı olduğu bildirilen ISAGA yöntemi ile araştırılmasının en doğru yol olacağı kanaatine varılmış, postnatal dönemde enfekte bebeklerin % 30' unda özgün IgM varlığının gösterilemediğinin unutulmaması önerilmiş, IgA araştırılmasının konjenital toxoplasmosis tanısında DS-ELISA ile IgM araştırılmasından daha duyarlı olduğu vurgulanmıştır (17, 24, 50, 55).

Oküler toxoplasmosis olgularının çoğunlukla konjenital olgulara ait olduğu, parazitlerin "*in utero*" dönemde retinaya ulaştıkları ve değişik sürelerde enkiste oldukları, akut enflamatuar ataklardan sonra gelişen enkistasyonların retinada ilerleyici hasarlara yol açtığı, oküler toxoplasmosis' te kesin tanının oldukça zor olduğu, etkilenmiş gözden alınacak dokulardan parazit izolasyonunun ise kesin tanıda en etkin yol olarak bildirilmiştir (20, 30).

Tanıda serolojinin çok sınırlı katkısı olduğu, ama duyarlı testlerle (DT gibi) sulandırılmadan direkt incelenen örneklerde IgG'nin tespit edilememesi negatif tanı yönünden anlamlı olarak yorumlanmış, duyarlılığı az olan testlerin histolojik olarak tanı konmuş olgularda yetersiz kaldığı gösterilmiş, pozitif IgG sonuçlarının şüphelenmek için yeterli olduğu fakat kesin ölçü olarak olmayacağı, lokal antikor sentezinin ölçümünün, humör aköz örneklemesinin her zaman mümkün olamaması nedeniyle, kıymetli olmasına rağmen rutin olarak uygulanamaması humör aközde

ve BOS yüksek antikor titresinin saptanması lokal antikor yapımının bir göstergesi olup aktif enfeksiyonun tanısında kıymetli olduğu kabul edilmiş, aşağıdaki formül ile bu titrelerin anlamlılığı DT sonuçlarının 1/ 1000 titrasyona eşit veya daha düşük olduğu olgularda desteklenmiş, $C \geq 8$ olduğu durumlarda lokal Ab üretiminin söz konusu olabileceği, bunda aktif enfeksiyonu destekleyen bir bulgu olduğu otörlerce kabul edilmiştir (20, 30, 78, 100).

$$C = \frac{\text{Sıvıdaki Ab titresini} \times \text{serumdaki } \gamma\text{-globulin konsantrasyonu}}{\text{Serumdaki Ab titresini} \times \text{vücut sıvısındaki } \gamma\text{-globulin konsantrasyonu}}$$

Retinal toxoplasmosis alevlenmelerinde ne IgM, ne de IgG titresinde artış tespit edilemediği, tanının göz hekiminin bulguları ve serolojik olarak özgün IgG tespit ile konulması önerilmiş, tedaviye alınacak cevabın tanıyı destekler nitelikte olsa da, inflamasyonu engellemek amacıyla sık steroid kullanımının tedaviyle elde edilecek iyileşmeyi zorlaştırabileceği, ELISA IgA bakmanın korioretinitli hastalarda IgM aranmasından daha duyarlı bir yöntem olduğu vurgulanmıştır (78).

AIDS'lilerdeki fokal beyin lezyonlarının en sık kronik, latent toxoplasmosis'in alevlenmesi sonucu geliştiği, dilue edilmemiş serum örnekleri kullanılarak DT ile duyarlı, LAT ile diğer hasta gruplarından farklı olmayan yalancı pozitif veya negatif sonuçların alınabildiği, serebral enfeksiyon dışında göze batan özgün Ab artışı izlenmediği, sadece bazı olgularda Ig titrelerinde fark edilebilen artışlar gözlemlendiği, primer akut toxoplasmosis geçiren AIDS hastalarında yükselen IgG titrelerinin yanı sıra özgün IgM titrelerinin de tespit edilebileceği, serebral hastalıkta genellikle IgM tespit edilememesinin, olguların alevlenmeye bağlı gelişmesi ile açıklanmıştır (74, 75, 125).

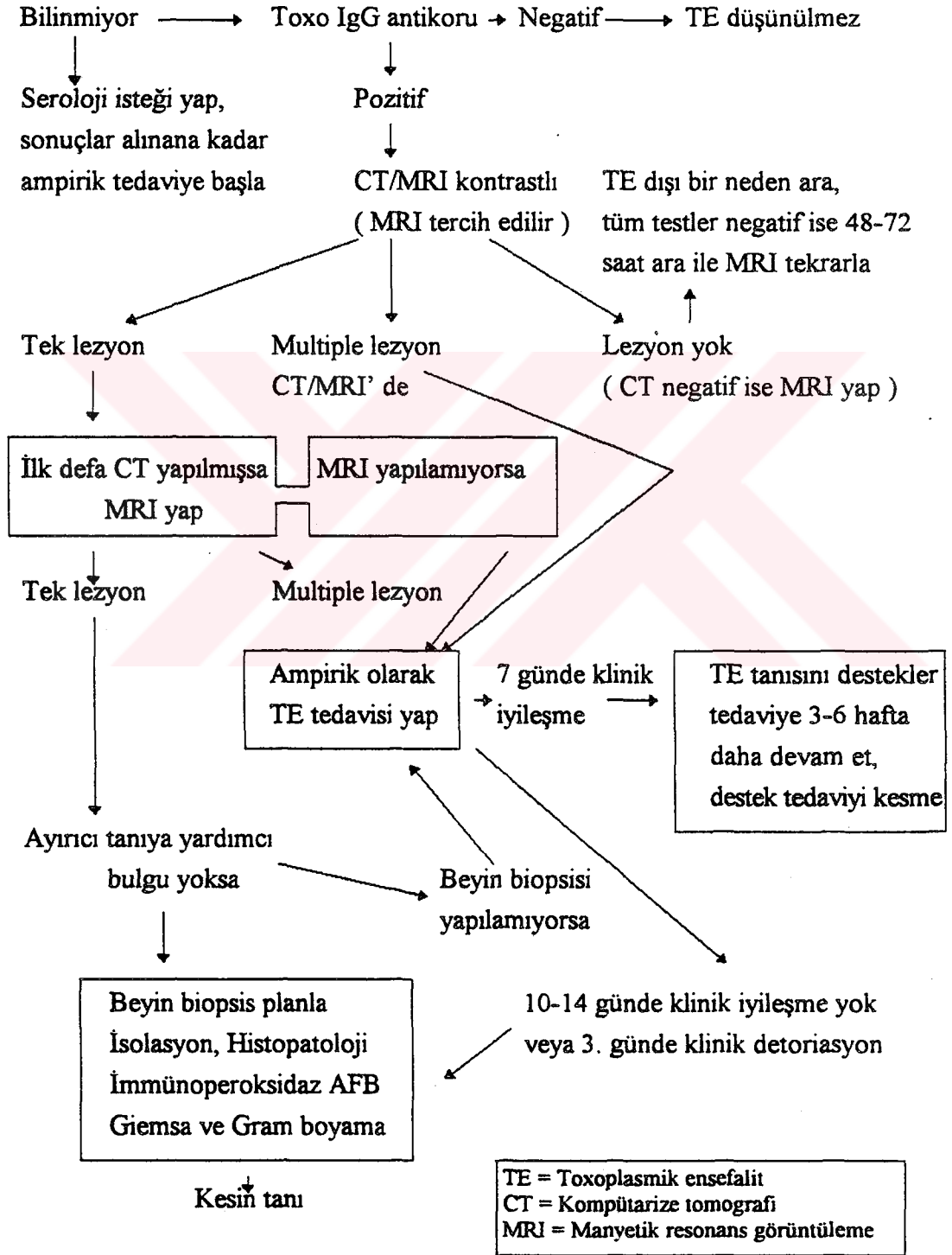
DA testi sonucunun DT sonucuna oranının 5' ten büyük olmasının reaktifte olmuş serebral toxoplasmosis' in bir göstergesi olarak kabul edilebileceği vurgulanmış, BOS incelemesinde protein seviyesinde artış, lezyonların ventriküler sisteme yakın olduğu durumlarda ise lokal özgün IgG artışı anlamlı kabul edilmiş, BOS örneğinde Toxoplasma trofozoitlerinin görülmesinin mümkün olacağı, fakat lezyonun radyolojik olarak yer kaplayan oluşum görüntüsü vereceğinden lomber ponksiyon yapılmasının sakıncalı olabileceği, serebral toxoplasmosis'in tanısında bilgisayarlı tomografi (CT) ve kliniğin tanıya yardımcı olduğu, klinik, seroloji ve CT sonuçlarının atipik veya özgün tedaviye beklenen cevabın alınmadığı durumlarda beyin biopsisi tavsiye edilmiştir (50, 81, 95).

İsraelski ve Remington intratekal özgün-Toxoplama antikorunu üretiminin TE açısından önemli bir bulgu olduğunu,

*BOS DT titresini / total BOS IgG X total serum IgG / serum DT titresini > 1 olmasının, aktif santral sinir sistemi toxoplazmozis' i lehine olduğunu vurgulamışlardır (63).

Mandell kitabında, Wong ve Remington' dan yaptığı alıntıda, HIV-pozitif hastalarda aşağıdaki şemaya uygun yaklaşım önermiştir (78).

HIV-pozitif hastalarda SSS semptomları



İnokülasyonda üreme olması, akut enfeksiyonu göstermekle beraber aktif enfeksiyonu, sessiz kistten ayıramadığı, benzer zorlukların DNA problemleri ve PCR için de geçerli olduğu, bunun ancak trofozoit ile bradizoiti ayıran özgün bir yöntemin geliştirilmesi veya sonuçların birimlendirilmesi ile başarılabileceği, AIDS olgularında çoğunlukla serebral toxoplasmosis görülmesine rağmen, diğer organların izole veya tüm vücudun yaygın olarak tutulduğu tiplere de rastlanabileceği, pulmoner toxoplasmosis tanısında bronkoalveoler lavaj (BAL) materyalinin mikroskopik bakımdan, akciğer biopsisi örneklerinin indirekt immünfloresan, eosin-metilen mavisi hızlı boyama yöntemleri ile incelenmesinden veya hücre serilerine inokülasyondan yararlanılabileceği bildirilmiştir (18, 50).

Toxoplasmosis' in seronegatif organ nakli alıcılarında ölümcül olabileceği, immün sistemi baskılanmış organ alıcılarının bilinen yollardan veya donör organdan kaynaklanacak primer toxoplasmosis'i kontrol altına alamadıkları, seronegatif alıcının seropozitif verici organından toxoplasmosis'e yakalanma insidansının kalp ve karaciğer nakilleri için sırası ile % 57, % 20 olduğu, böbrek ve kemik iliği transplantasyonlarında primer enfeksiyonun bu dokulardaki düşük kist oluşumundan dolayı nadir görüldüğü, bu alıcıların primer enfeksiyonunun donörün o sırada akut primer enfeksiyon geçirmesine veya alıcının enfekte gıda, toprak, kedi dışkı ile teması sonucu olabileceği vurgulanmıştır (13, 112).

Alıcı-verici yaşlarının da toxoplasmosis riski üzerinde etkisi olduğu, çünkü şahsın yaşı ne kadar ileri ise Toxoplasma ile karşılaşmış olma olasılığının o derece yüksek olacağı, sonuç olarak alıcı yaşı ne kadar genç, verici yaşı ne kadar ileri ise transplantasyona bağlı toxoplasmosis riskinin o denli yüksek olacağı kanaatine varılmıştır (50).

Kalp, kalp-akciğer ve karaciğer transplantasyon operasyonları öncesinde hem alıcının hem de vericinin durumlarının serolojik olarak IgG araştırılması ile belirlenmesi, seronegatif alıcı-seropozitif verici olduğu durumlarda alıcıya profilaktik özgün tedavi verilmesi önerilmiş, alıcı ve vericinin her ikisinde negatif ise alıcının toxoplasmosis'e yakalanma insidansının sağlam popülasyondan farklı olmayacağı, ama yine de post-op dönemde serolojik takibinin olumlu bir yaklaşım olduğu, seropozitif alıcıların yaşamı tehdit edebilecek bir enfeksiyon riski taşımadıkları, sadece hafif bir sekonder reaktivasyonun görülebileceği, bunların ileri serolojik araştırmalarının gereksiz olacağı vurgulanmıştır (50).

Böbrek veya kemik iliği transplantasyonu olacak hastaların rutin serolojik tetkiki önerilmemiş, yalnızca klinik bulgu veren bireylerin araştırılmasının uygun olacağı, kalp, karaciğer, böbrek transplantasyonu geçirdikten sonra toxoplasmosis şikayetleri olan olgularda konvansiyonel yöntemlerle özgün IgG ve IgM varlığı saptanabilirken, kemik iliği nakli yapılan olgular yüksek oranda immün sistemleri baskılanmış olduğundan Toxoplasma enfeksiyonuna karşı serolojik cevaplarının da kaybolmuş olabileceği, bunun için antijen aranması veya özgün nükleik asitlerin araştırılmasının daha güvenilir bir yöntem olacağı vurgulanmış, inokülasyon denemelerinde hayvan modellerinin çok zaman alacağı için hücre serilerinden yararlanılması tavsiye edilmiştir (13, 32, 50, 112).

Parazit izolasyonunun şüpheye yol açmayan bir tanı yöntemi olmasına rağmen, çok zaman alması (4-6 hafta kadar), konjenital olarak enfekte bebeklerden alınan materyellerdeki suşların farelerde, istisnalar hariç, avirulan olduğunun gösterilmesi bu işlemin acil tanılardaki kullanılabilirliğini azalttığı, parazitlerin fareler için virulan olduğu durumlarda ise 5-10 gün içinde fare periton sıvısından parazit izole edilebileceği, ventrikül sıvısı, BOS, subretinal sıvı, humör aköz, amnion sıvısı gibi diğer vücut sıvılarından da parazit izolasyonunun da akut evreyi göstereceği bildirilmiştir (99).

Biopsi ve otopsi sırasında alınan doku örneklerinden (iskelet kası, akciğer, beyin, göz gibi) izole edilen doku kistlerinin akut evrenin kesin tanısına yardımcı olamayacağı, nadiren erişkin ve büyük çocuklardan da alınan lenf düğümlerinden trofozoit izolasyonunun başarlabilabileceği, izolasyon için fare inokülasyonundan daha az duyarlı olduğu ileri sürülen doku kültürlerinden de faydalanılabileceği, fakat her ikisinin eş zamanlı uygulamasının daha doğru olacağı önerilmiştir (99),

İnokülasyonun en kısa sürede yapılması, eğer örnek hemen inoküle edilemeyecekse, +4°C' de nemli ortamda saklanması önerilmiş, bu şartlarda doku kistlerinin 2 ay, trofozoitlerin bir kaç gün, kandaki parazitlerin ise 1 hafta kadar canlı korunabileceği bildirilmiştir (99).

Konjenital toxoplasmosis şüpheli olgularda plasentanın fiksatif konmadan +4°C' de saklanıp, tripsin ile sindirilmesi durumunda % 25 pozitif sonuç elde edileceği, kordon veya periferik kandan parazit izolasyonunun özellikle yaşamın ilk haftaları ve ayında, serolojik testlerin çok güvenilir olmadığı durumlarda, % 30 dolayında başarılı olabileceği bildirilmiştir (99).

Lenfadenopatik formda, tükürükten parazit izolasyonunun % 60 pozitif sonuç vermesine rağmen, izolasyondaki zorluklar, enfeksiyon riski, zaman alıcı olması, çoğu laboratuvarın hayvan besleyebilecek kapasitede olmaması Toxoplasmosis' in tanısında serolojik yöntemlerin gelişimine yol açmıştır (99)

TOXOPLASMOSİS TANISINDA KULLANILAN SEROLOJİK TESTLER

Tüm rutin in vitro tanı yöntemlerinde T.gondii' ye karşı oluşmuş özgün humoral immünitenin araştırılması hedeflenmiş, bu amaçla pozitif serumdaki özgün antikorların Toxoplasma antijeni ile reaksiyonu araştırılmış, Toxoplasma serolojisinin anlaşılabilmesi için immünolojik cevabın 3 önemli aşamasının bilinmesi gerekliliği vurgulanmıştır (99).

1- Enfekte konağın ilk immün cevabı öncelikle parazit membran antigenlerine, daha sonra da sitoplasma antijenlerine karşı özgün antikor oluşturduğu,

2- İlk özgün antikor IgM tipi olup, bunu ömürboyu kanda kalacak olan IgG oluşumunun izlediği,

3- T. gondii'nin kompleks antijenik yapısındaki bazı antijenlerin, çok sıradan olması nedeniyle, özgün olmayan (doğal) antikorlarca tanındığı gösterilmiş, Monoklonal antikor (*McAb*) çalışmaları ile şimdilik T. gondii' ye ait 20 tip membran antijeni, 6 tip sitoplasma antijeni, 4 tip miks antijen (hem membran, hem de sitoplasma), 2 tipte ekzo-antijen bulunmuştur (ŞEMA 5) (118)

Bireylerin, özgün antijene yönelik antikor cevabı miktarında ve tanınan epitop sayısında belirgin farklılıkların olduğu, sınırlı antijen profiline yönelik testlerin bu nedenle daha az değerli olacağı, rutin testler ile özgün IgA, IgG ve IgM antikorları aranırken, DT ile komplemanı bağlayan IgG ve IgM antikorlarının saptanabileceği gösterilmiştir (50, 94).

Serokonversiyon izleminde seri örneklerin teminindeki zorluklar, akut toxoplasmosis'teki özgün olmayan klinik ve bulguların varlığı, hastalığın erken dönemlerine ait western blot verilerinin yetersizliği, parazitin kültüvasyonu ile akut-kronik formların ayrılabilmesi, IgM sonuçlarının kıyaslanabileceği referans bir testin gerçekleştirilememiş olması toxoplasmosis serolojisindeki temel sorunlar

olarak gösterilmiş, akut enfeksiyon sırasındaki dolaşan antijenleri tespit etmeye yönelik geliştirilmiş bir grup testin özellikle immün sistemin bozuk şahıslarda daha kullanışlı olacağı bildirilmiştir (50).

SABİN-FELDMAN DYE TEST (DT)

1948 yılında geliştirilmiş olan bu test en özgün ve duyarlı kabul edildiğinden klasik referans testi olarak önerilmiş, Dünya sağlık teşkilatı (*WHO*) da bu testi IgG referans serumlarını IU/ml olarak titre etmekte kullanmaya başlamıştır (99).

Fare periton sıvısından elde edilen canlı toxoplasma trofozoitleri hasta serumu ile 1 saat 37°C' da tutulduktan sonra şişmesi, ortama alkali metilen mavisi eklenmesi ile boyanmaları, antikor içeren serumla karşılatıklarında antikor-kompleman lizisine bağlı olarak boyanamayıp, inceliyor, şekillerinin bozulması esasına dayanan bu testin, sadece komplemanlı sistemde (*Aktivatör faktör= AF*) oluşması, AF olarak insan serumu veya plasması kullanılmasına rağmen kobay serumunun da kullanılabilmesi, bildirilmesi gerekli serum titrasyonunun ortamdaki Toxoplasma'ların yarısının ölmediği (boyandığı), yarısının öldüğü (boyanmadığı) titrasyon olduğu, Dye test sonuçlarının internasyonel standart referans serumu ile kıyaslanabilecek şekilde mililitrede İnternasyonel ünite cinsinden verilmesi, **DYE TEST**' in düşük titrelerdeki yalancı pozitifliğin *Hammondia hammondii* enfeksiyonları veya kan transfüzyonlarından sonra, yalancı negatifliklerin ise sığır örneklerinde görülebileceği bildirilmiştir (50, 99, 101).

Kullanılan Ag'nin türü: Bütün, virulan Toxoplasma trofozoitleri

Tetkik edilen Ab türü: Trofozoitlerin proliferasyon fazında oluşan IgG' leri arar ve parazitin membran Ag' i ile reaksiyona girdiği,

Antikor kinetiği : Hastalığı takiben 8-20. günlerde yükselen Ab titresini saptayabildiği, 1-2 ay içinde tepe noktasına ulaştıktan sonra azalmaya başladığı fakat ömürboyu sürdüğü,

Özgünlük : 2-5 IU/ml olduğu bildirilmiştir (**ŞEKİL 8**) (101).

İNDİREKT HEMAGGLÜTİNASYON TESTİ (İHA)

Hemagglütinasyon ve latex agglütinasyon testlerinin öncelikle sitoplasmik antijenlere yönelik olduğu, akut enfeksiyonların başlangıcında ilk birkaç hafta antikor tespit edemeyeceği, her iki yönteminde DT'in yüksek titrelerde reaksiyon tespit ettiği konjenital enfeksiyonlarda negatif sonuçlar verdiği, Latex testinin

IFA'daki polar boyanmaya bağlı görülen yalancı pozitifliği önleyebileceği, fakat DT ile karşılaştırıldığında %1-2 dolayında (zgn olmayan IgM' e bağlı) yalancı pozitivite gösterebileceği, DT referans alınarak sonuçlar kıyaslandığında LATEX'in duyarlılığının % 99, özgünlüğünün % 81 olduğu hesaplanmıştır (50, 67, 99).

IHA testi Toxoplasma antijeni ile duyarlılaştırılmış Tannik asitli hayvan eritrositlerinin, özgün antikörler içeren serumla karşılaştığında agglütine olması prensibine dayandığı, Dye test' in saptadığı antikrlardan birkaç gün sonra yükselen antikrları Dye test titrelerinde veya daha yüksek değerlerde, Dye test' e göre daha uzun süreli yüksek olarak saptadığı, konjenital toxoplasmosis olgularında Dye test' te çok yüksek titreler tespit edilmesine rağmen, IHA ile negatif sonuçların alınabileceği, bundan dolayı tavsiye edilmediği, bu çelişkinin nedeni olarak da iki testin farklı antikrları tetkik etmesi gösterilmiş, akut akkiz toxoplasmosisin tanısındaki değeri tespit edilememiş, değişik laboratuvarların farklı sonuçlar vermesi nedeniyle bu testin tek başına kullanılmadığı bildirilmiştir (50, 99).

Kullanılan Ag'nin türü : T.gondii trofozoitlerinin fiziko-kimyasal muamelesi sonucu ortaya çıkan sitoplasmik Ag' leri taradığı, bazı yöntemlerin membran Ag' leri de içerebildiği,

Tetkik edilen Ab türü : IHA IgG' ye karşı duyarlı olduğu, fakat örnek serumun, IgM' i tahrip eden 2-mercaptoetanol ile muamele edilmesinden sonra dolaylı olarak IgM' leri de göstermek mümkün olacağı,

Antikr kinetiği : Kullanılan Antijenin tipine bağlı olduğu, sitoplasmik Ag' lerin enfeksiyonun hemen sonrasında oluşan Ab'ları tanıdıkları için geçmişteki hastalıkları araştırmakta duyarlı olduğu, Membran Ag' lerinin erkentanıda etkin olmasına rağmen özgün olmayan doğal Ab' lara da duyarlı olduğu,

zgnlk: 1/ 40 ve üzeri dilusyonun anlamlı kabul edildiği bildirilmiştir (ŞEKİL 9) (64,106,115).

PRESİPİTİN TESTİ

Agar jelde serum veya humor aköz rneklerinin Ouchterlony ift difüzyon tekniği ile uygulandığında oküler toxoplasmosis ve immun sistemi baskılanmış kişilerdeki aktif toxoplasmosis tanısında değerli olduğu gösterilmiştir (99).

KOMPLEMAN FİKSASYON TESTİ (CF)

CF hem membran hem de sitoplazmik antijenlere yönelik olduğu için DT' e göre titreleri daha geç yükselen antikorları tespit ettiği için Dye test ve IFA da saptanan antikorlar yüksek ve stabil iken CF ile yükselen titrelerin gösterilebileceği, dolayısıyla akkiz toxoplasmosis' in tanısında kullanılabileceği, negatif CF testinin pozitive dönmesinin veya yükselmesinin, stabil bir DT ile beraber ise akut enfeksiyonu göstereceği, CF testinin bir kaç yıl bazen 10 yıl içinde negatife dönebileceği, pozitif CF titresi devamlılığının enfeksiyonun yeni veya aktif olduğunu düşündürmesi vurgulanmıştır (122).

Prensip: Kompleman fiksasyon testi koyun eritrositleri ile anti-koyun hemolizinin rol aldığı hemolitik sistemin içinde gelişen konvensiyonel antijen/antikor reaksiyonu olduğu,

- Hemoliz görülmediğinde Antijen/antikor kompleksinin komplemanı bağlayıp hemolitik sistemin kullanacağı kompleman bırakmadığı için pozitif olarak değerlendirilmesi,

- Hemoliz görüldüğünde Antijen/antikor reaksiyonunun gerçekleşmemesi nedeniyle komplemanın bağlanamadığı ve hemolitik sistem tarafından kullanıldığı için sonucun negatif olarak yorumlanması,

Kullanılan Ag'nin türü : Toxoplasma trofozoitlerinin fiziko-kimyasal muamelesi sonucunda elde edilen Ag'nin çoğunlukla sitoplazmik tipte olduğu Antijenik bileşimin sabit olmamasının test tekralandığında uyumsuz sonuçlara neden olduğu,

Tetkik edilen Ab türü : IgG (IgG₄ alt sınıfı hariç) ve IgM Ab' lar olduğu

Antikor kinetiği : Komplemanı bağlayan antikorlar DT ile tespit edilen antikorlardan daha sonra belirdiğinden serokonversiyon çalışmalarında kullanılabileceği,

Özgünlük: Kullanılan Ag' nin tipine bağlı olarak 1/8-32 dilusyon olacağı bildirilmiştir (ŞEKİL 10) (87).

FULTON AGGLÜTİNASYON TESTİ

Formalin içinde saklanan tüm parazit kullanıldığı bu testin IgM antikorları için oldukça duyarlı olduğu, " Doğal " oluşan Toxoplasma IgM agglütinini nedeniyle özgün olmayan agglütinasyonlar görülebileceği bildirilmiştir (99).

KONVENSİYONEL İNDİREKT FLORESAN ANTİKOR TESTİ (IFA)

Bu test toxoplasmosis tanısında ilk defa 1963 yılında kullanıldığı, canlı parazit ve aksesuar faktör kullanımını gerektirmediği için her laboratuvarında uygulanabileceği, fakat IFA' nın değerlendirmesinin subjektif olması, doğal oluşan IgM antikorları ve Antinükleer antikorların varlığında trofozoit kutpunun boyanıp yalancı pozitifliğe neden olmasının eleştirildiği, bu amaçla değerlendiriciye bağlı farklılıkları ortadan kaldırmak üzere kalibre edilmiş fotometrik sistem geliştirildiği, bazı yalancı pozitif olgularda Toxoplasma'nın Fc reseptörüne olan ilgisi sorumlu tutulduğundan, özgün olmayan bağlanmaları önlemek için kutup ucunda toplanma eğilimindeki Fc reseptörlerinin etkisini trofozoitlerin daha önceden Fc ile muamele edilerek ortadan kaldırılması önerilmiştir (3, 10, 69).

Prensip : Antijen olarak üzerindeki çukurlara ölü T. gondii trofozoitlerinin damlatılması ile hazırlanmış lamalar, şüpheli serumların seri dilusyonları ile inkübe edildiğinde özgün antikorların parazite bağlanıp, bu kompleks üzerine eklenen Fluorescein isothiosyanate (FITC) ile işaretlenmiş anti-insan globulinlerle görünür hale getirilmesi, sonuçların floresan mikroskopu altında değerlendirilmesi esasına dayalı testin, yorumlamasını kolaylaştırmak için Evans mavisi ile ters boyama yapılması, standardizasyon için de Fluoskop denilen cihazdan yararlanılması önerilmiş, IFA testinin sonuçlarının DT ile özgünlük açısından eşdeğer olduğu, fakat antinükleer antikor içeren bazı serumlarda yalancı pozitif reaksiyonların görülebileceği, bundan dolayı sistemik lupus eritematosüz gibi bağ dokusu rahatsızlıkları olanlarda IFA test sonuçlarının DT veya IHA ile beraber değerlendirilmesinin doğru olacağı vurgulanmıştır (99).

Kullanılan Ag'nin türü : Bütün Toxoplasma trofozoitleri, fakat çoğunlukla membran antijenlerinin kullanıldığı, bazı fiksasyon teknikleri ile hücre membranı içindeki antijenlerin de gösterilebileceği,

Tetkik edilen Ab türü : Kullanılan anti-insan globuline bağlı olarak IgG veya IgM sınıfindan olacağı,

Antikor kinetiği : IgG sonuçlarının DT ile büyük bir uyum gösterdiği, her iki teknikle de membran antikorlarının erken saptanabileceği, sonuçların DT' de olduğu gibi IU/ml cinsinden bildirilmesinin uygun olacağı,

IgG : 10 IU/ml üzerindeki değerlerin anlamlı olduğu, özgün IgM saptanmasının akut enfeksiyonu gösterdiği, fakat düşük düzeylerde 3 ayın üzerinde devamlılık gösterebileceği,

IgM özgünlüğü : Erişkinlerde 1/40-50 dilusyonun üzerindeki sonuçların anlamlı olduğu bildirilmiştir (ŞEKİL 11) (37, 38, 71,98).

Yeni doğanda *IFA* testi ile IgM antikorlarının varlığının saptandığında, konjenital toxoplasmosis tanısı konulmadan aşağıdaki iki konunun gözden geçirilmesi önerilmiştir;

1- Test edilen örnek kordon kanı veya serum ise, doğum sırasında plasentadan maternal bir karışıma, erken yenidoğan döneminde alınan örneklerde anne kanı karışımına bağlı yalancı pozitif sonuçların oluşabileceği, ayırıcı tanıda anne kanı paralel çalışıldığında anne kanı negatif, bebek kanı pozitif bulunacak olursa bebeğin konjenital toxoplasmosis' li olduğuna, her ikisinde pozitif olması durumunda bebekten bir hafta sonra yeni bir örnek alınıp incelendiğinde, yarı ömrü yaklaşık 5 gün olan IgM düzeyinin, kazanılmış antikor olması durumunda belirgin olarak azalacağı,

2- Serumdaki romatoid faktör varlığında, parazit antigeni hastanın IgG toxoplasma antikoruna ile birleşip, hastanın romatoid faktörü ile de reaksiyona girmesine ve IgM antikorunun, hastanın IgG antikoruna yönlenmesine, ortama florescein ile işaretli anti-IgM konulduğunda da, organizmaya bağlanmış bulunan Romatoid faktörün IgM' ine bağlanıp yalancı pozitif sonuçlara neden olduğu, romatoid faktör içeren serumun, ısı ile aggrage edilmiş IgG ile muamele edilmesi ile yalancı-pozitif IgM-IFA dilusyonunun negatif olacağı yayınlanmıştır (99).

DİREKT AGGLÜTİNASYON TESTİ (DA)

Prensip : Formalin ile muamele edilmiş sağlam Toxoplasma trofozoitleri seri serum dilusyonları ile karşılaştığında T.gondii' ye karşı antikorlar uniform bir tabaka oluşturacak şekilde Toxoplasma antijenlerini agglütine ettiği,

Kullanılan Ag'nin türü : Sağlam trofozoitlerin membran antijenleri,

Tetkik edilen Ag türü : Membran antijenleri ile reaksiyona giren agglütine edici IgG ve IgM antikorlarının araştırıldığı,

Antikor kinetiği : IgM' e karşı aşırı duyarlı olduğu için konjenital ve akut akkiz toxoplasmosis tanısında oldukça kullanışlı olduğu, serum örneğinin 2-mercaptoethanol ile muamele edilmesi durumunda IgG saptanmasında da kullanılabilirliği,

IgG özgünlüğü : 1/8 ve üzeri dilusyonların anlamlı olduğu (36, 91),

(Duyarlılaştırılmış antijen)

Tarama amacı ile yeni geliştirildiği, prensibinin formalinle duyarlılaştırılmış Ag kullanan yöntemle aynı olduğu ve tüm örneklerin 2-mercaptoethanol ile muamele edildiği bildirilmiş,

Kullanılan Ag'nin türü : Enzimatik muameleden geçirilmiş, bütün, ölü Toxoplasma trofozoitleri olduğu,

Tetkik edilen Ab türü : Membran antijenlerine karşı oluşmuş özđün IgG antikorlarına yönelik olduğu, IgM antikorlarının, ister doğal (özđün olmayan) isterse özđün olsun reaksiyona karışmadığı,

Antikor kinetiği : Titrelerin DT ile uyumlu olduğu, uygulaması çok kolay olduğu için tüm laboratuvarlarda güvenle kullanılabileceği,

Özđünlük : 4 IU/ml üzerindeki değerlerin anlamlı olduğu bildirilmiştir (25) (ŞEKİL 12).

ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

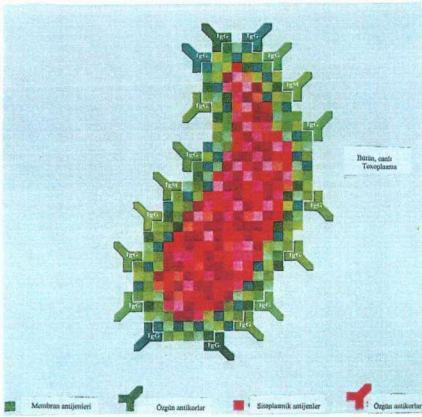
Prensip: Katı ortama bağlanmış Toxoplasma antijenlerinin, serum örneği ile inkübe edildiğinde örnekteki özđün antikorun antijene bağlanması, bu kompleksin ortama konulmuş insan IgG ve IgM' ine yönelik enzimle işaretlenmiş antikorlarca tanınıp, ortama ilave edilen uygun substratın hidrolizi sonucu renk değişikliği oluşturarak bu kompleksi görünlür hale getirmesi esasına dayandığı,

Kullanılan Ag'nin türü : İmmunoenzimatik testlerde hemagglütinasyondakine benzer eriğik antijenlerin kullanıldığı, bileşiminde sitoplazmik antijenlerin çoğunlukta olmasına rağmen değişik oranlarda membran antijenlerinin de bulunacağı bildirilmiş,

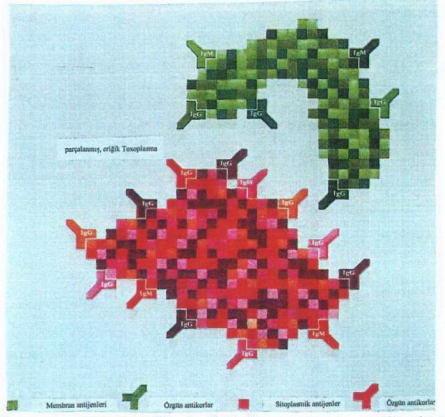
Tetkik edilen Ab türü : Kullanılan enzim kojugeye bağlı olarak IgG veya IgM sınıfı antikorları arayabileceği,

Antikor kinetiği : Bu yöntemle saptanan IgG' lerin DT ile saptananlardan daha geç oluştuğu, testin duyarlılığı IgM' in erken tespitini olanaklı kıldığı, saf membran antijenlerinin kullanılması ile IgG' nin de erken tanısının mümkün olabileceği vurgulanmıştır (ŞEKİL 13) (107, 121).

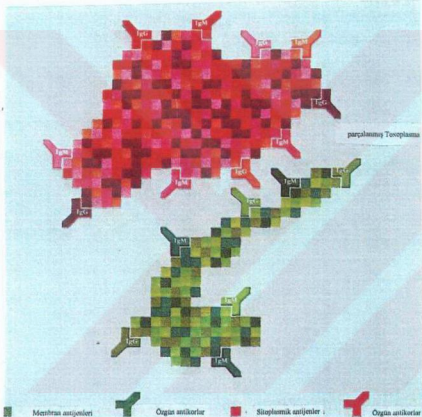
*Şekil 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13 bioMerieux tanıtım broşüründen alınmıştır.



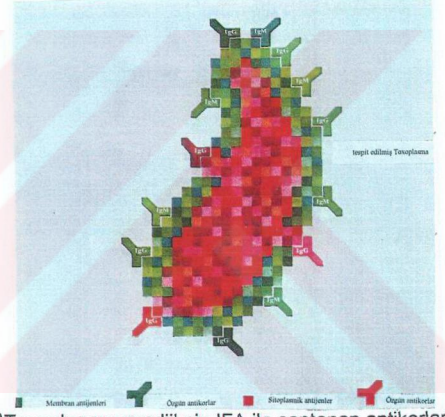
Toxoplasma gondii' nin DT ile saptanan antikorları



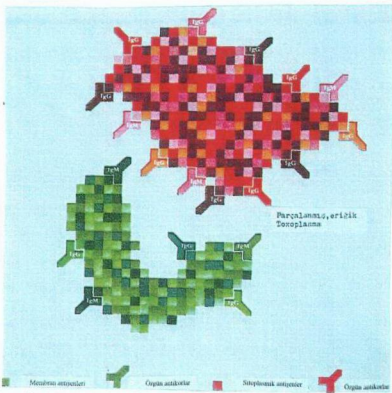
(9) Toxoplasma gondii' nin IHA ile saptanan antikorları



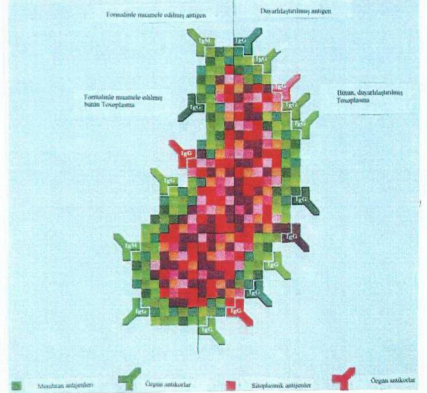
Toxoplasma gondii' nin CF ile saptanan antikorları



(11) Toxoplasma gondii' nin IFA ile saptanan antikorları



Toxoplasma gondii' nin ELISA ile saptanan antikorları



(13) Toxoplasma gondii' nin DA ile saptanan antikorları

IgM IMMUNOSORBENT AGGLUTINATION ASSAY (IgM-ISAGA)

Prensip : Katı faza kaplanmış anti-insan IgM monoklonal antikorlarının serumdaki insan IgM antikorları immünolojik olarak yakalaması sonrasında, toxoplasma trofozoitlerinin ortama ilavesi ile özgün toxoplasma IgM' lerinin agglütinasyonu esasına dayandığı, her serum örneğinin artan konsantrasyonlardaki antigen ile test edilip, negatif sonuçlarda toxoplasmaların presipite olduğu, sonuç pozitif sonuçlarda ise toxoplasmaların bulut şeklinde agglütine olduğu, özgün IgM dışında bağlanmayan fazla antijenin eşit miktarda çöktüğü, immün yakalama teknikleri ile olası Romatoid Faktöre, antinükleer antikorlara ve IgM bakılırken görülen IgG/ IgM arası yarışmaya bağlı karışıklıklara fırsat verilmemiş olacağı, .

Değerlendirme: Hasta örneğinin bulunduğu çukurlardaki oluşan düğme şeklindeki sedimentasyonun büyüklüğüne göre her çukur için 0-4 arası bir puanlama sonrası, üç çukurun toplamının değerlendirilip; 0-5 arası değerlerin negatif, 6-8 arası değerlerin sınır, 9-12 arası değerlerin pozitif kabul edilmesi önerilmiş, ISAGA ile tespit edilen IgM düzeyinin ya rezidüel veya yeni enfeksiyona bağlı olduğu, aktif enfeksiyonun desteklenmesi için 3 hafta ara ile alınmış serum örneklerinde de özgün IgG düzeylerinde anlamlı artış gözlemlenmesinin gerekli olduğu vurgulanmıştır (24,28,47,50,96,110).

Bu serolojik testlerin yanı sıra ELIFA(*enzyme-linked immunofiltration assay*= enzimle işaretlenmiş immünfiltrasyon yöntemi) yardımı ile maternal ve neonatal antikorların ayrımının yapılabildiği bildirilmekte, sadece parazitemik fazda var olduğu bilinen Dolaşan Antikorların (*ekzo-antigenler* ve *PEF* {Penetrasyon kolaylaştırıcı faktör}) tespitinin de yönlendirici olduğu kabul edilmiş, PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ise son yıllarda toxoplasmosis tanısında önemli bir yerinin olduğu bildirilmiştir (11,13,50, 99).

Toxoplasmosis tanısında hücrel immüniteye yönelik *Toxoplasmin deri testi* toxoplasmosis'e karşı oluşan geçikmiş aşırı duyarlılık reaksiyonunu gösterdiği, ön kol iç yüzüne 0,1 ml toxoplasmin intradermal olarak verildikten 48-72 saat sonra 5 mm' den büyük endurasyon oluşmasının pozitif kabul edildiği, Toxoplasmosis' e bağlı geçikmiş aşırı duyarlılığın, akkiz enfeksiyonlarda ilk enfeksiyonu takiben aylar hatta yıllar sonra gelişebildiği için sadece kronik latent toxoplasmosis tanısında kullanılabileceği, fakat konjenital enfeksiyon tanısında yerinin olmadığı işaret edilmiştir (99).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda İngiltere' deki 3 Toxoplasma referans merkezinden biri olan St.George' s Hastanesi bünyesindeki laboratuvara 17 Kasım 1993 - 14 Şubat 1994 tarihleri arasında gelen 254' ü erkek, 342' si ise kadın toplam 596 hasta örneğinde seroloji ve PCR çalışmaları yapılmıştır. 68 hasta 0-20 yaş, 413 hasta 21-40 yaş, 115 hasta ise 40 yaş üzeri gruptaydı.

Tüm hasta örnekleri 5 yıl -70°C' de saklandığından hastaların varsa bir önceki serumları paralel olarak çalışılmış, tüm örnekler geldiği gün laboratuvar kayıt sırasına göre numaralandırılmış, üveit veya korioretinitli hastalara, AIDS' lilere, anne/ bebek çiftlerine ait örnekler, fetal kan, BOS, amnion mayii örnekleri çalışılacak ilk dilusyonlarının 1/1 olacağını göstermek amacıyla kırmızı ile diğer örnekler ise çalışılacak ilk dilusyonlarının 1/2 sulandırmadan başlayacağını göstermek için siyah ile numaralandırılmıştır. İnokülasyon için gelen örnekler inaktive edilmemiş, HIV-pozitif olgulara ait örneklere inokülasyon uygulanmamış, diğer örnekler en kısa zamanda inoküle edilmiş ve bir kısmı daha sonradan Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (PCR) kullanmak için -70°C' de saklanmıştır.

Gelen her hasta örneği ile önce Dye test (DT) ve Latex (LAT) çalışılmış, iki test arası uyumsuzluklarda, DT < 16, LAT > 64 bulunduğu (risk gruplarında DT < 4, LAT > 16) Direkt Agglütinasyon (DA) testi doğrulama amacıyla kullanılmış, DT > 31 İÜ örneklere, şüpheli kliniği ve DT ≥ 31 İÜ olan örneklere, DT > 31 İÜ olan HIV-pozitif hasta örneklerinde ve her hangi bir DT değeri saptanmış transplantasyon alıcılarının örneklerinde tek çukur Immunosorbent Agglutination Assay (ISAGA) ile IgM, her hangi bir DT değeri saptanmış tüm korioretinitli hastaların, konjenital enfeksiyon riski olan Anne/bebek çiftlerinin, her hangi bir IgG değeri tespit edilmiş hamilelerin, DT ≥ 1000 İÜ tüm örneklerin, gebelik öncesi tarama örneklerinin hepsinde 3 çukur ISAGA ve Enzyme Linked Immunoassay (ELISA) ile IgM araştırması gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca DT pozitif olan 1 yaş ve altındaki tüm bebeklerde ISAGA ile IgM ve IgA araştırılmış, ISAGA ve ELISA yöntemleri ile IgM pozitif bulunan olgularla, konjenital enfeksiyon düşünülen bebek örneklerine, reaktivasyon riski taşıyan transplantasyon ve AIDS'li hastaların örneklerine, hastalığın başlangıç tarihi ile ilgili değerlendirme yapmakta yardımcı olan ELISA IgG yöntemi ile AVIDİTE bakılmıştır.

İNOKULASYON

İnokulasyon amacıyla gönderilen doku parçaları kendi hacmine eşit miktarda antibiotikli serum fizyolojik içinde steril Griffit tübüne konulup öğütüldükten sonra, BOS örnekleri ise en kısa zamanda direkt olarak inoküle edilmişler, HIV+ hasta örnekleri ise inoküle edilmemiştir. Her bir örnek 4 adet MF1 cinsi beyaz fareye intraperitoneal olarak verilmiştir. 21 gün sonra 2 fare servikal dislokasyon veya yoğun CO₂ gazı ile öldürülüp kalp kanı ve beyinleri çıkarılmış, kan örneklerinde DT çalışılmıştır sonuç negatif olduğu taktirde kayıtlara işlenip 42. günde diğer iki fare de usulüne uygun olarak öldürülüp aynı işlemler uygulanmış, DT yine negatif sonuçlandığında olgu negatif kabul edilmiştir. Ters durumlarında yani gerek 21. gerekse de 42. günlerde yapılan işlemler sonucunda DT pozitivite göstermişse, beyinler emülsifiye edilip kist açısından incelenmiş, kistler sayılıp süşun devamı için 10-20 kist/ml olacak şekilde sulandırılıp karışımdan fare başına 0,5ml intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir.

ARAŞTIRMALARIMIZDA KULLANILAN TESTLER

1) SABIN-FELDMAN DYE TEST

Çalışılacak örnekler kırmızı ve siyah numaralandırıldıktan 56°C' da yarım saat süre ile inaktive edilmiş, hastaların varsa bir önceki serum örneği paralel çalışma amacıyla sıraya konulmuş, -70°C saklanan 8 farklı kişiye ait **AKSESUAR FAKTÖR (AF)**, oda sıcaklığında erimeye bırakılmıştır. AF olarak plasma yerine insan serumu kullanıldığında her 25ml için 1,5ml disodyum sitrat ilave edilerek doğal oluşan anti-toxoplasma IgM antikorlarının nötralizasyonu sağlanmıştır.

3 gün önceden MF1 cinsi farelere inoküle edilmiş olan RH süşuna ait Toxoplasma trofozoitleri 10-20ml antibiotikli serum fizyolojik ile fare peritonları yıkanmak suretiyle toplanmış, Thoma lamının her bir küçük karesinde 90-100 trofozoit olacak şekilde steril serum fizyolojik ile sulandırılıp (1ml. suspansiyonda $7,2 \times 10^6$ Toxoplasma trofozoiti olacak şekilde)antijen suspansiyonu hazırlanmış, kullanılabilir olan AF' leri belirlemek amacıyla bir P plağı hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak 1/128 - 1/512 dilusyon arasında olduğu bilinen serum karışımının negatif serumlarla dilue edilmesi sonucu 1/256 (125 IU) olarak ayarlanmış **DAHİLİ** kontrol kullanılmıştır.

Falcon düz tabanlı mikrotitrasyon plaklağının 1. kolonundaki tüm 8 çukura da 25µl Serum fizyolojik (SF) konduktan sonra üzerlerine 25µl Dahili pozitif kontrol ilave edilmiş ve HAMILTON sulandırma cihazı ile tüm sıralar 10. kolona kadar (10. kolon dahil) her çukurda 1/2 oranında sulandırılmıştır. 11. kolonun çukurlarına sadece 75µl SF konularak antijen (Ag) kontrolu olarak kullanılmıştır. 12. kolona o sıraya ait AF' den 50µl ve 25µl Ag suspansiyonu konularak AF' lerin antikor (Ab) içerip içermedikleri kontrol edilmiştir. Bu işlemi takiben 10. kolona kadar (10. kolon dahil) her çukura ait sıranın AF' den 50µl ve 25µl Ag suspansiyonu konulmuştur.

P plağının üzeri sefeon bant ile kaplandıktan sonra otomatik karıştırıcıda karıştırılmış ve 37°C 1 saat inkübe edilmiştir. DT' de kullanılacak olan boya solusyonu her çukura 30µl olacak şekilde hesaplandıktan sonra 1 biriminde 9,7ml. Sodyum karbonat, 0,3ml. sodyum tetraborat ve 0,15ml. metilen mavisi olacak şekilde yeterli birimde boya solusyonu hazırlanmıştır.

Birinci saatin sonunda inkübatörden çıkarılan P plağının her çukuruna 30µl boya solusyonu pipetlenip tekrar karıştırılmış ve 37°C 5 dakika inkübe edildikten sonra P plağı oda sıcaklığında 10 dakika bırakılarak trofozoitlerin plağın tabanına bir yüzey oluşturacak şekilde çökmesi beklenmiştir.

P plağının değerlendirilmesine inverted mikroskop ile 12. kolondan başlanılmış, eğer boyanmış toxoplasma trofozoitinin görülmemişse o sıradaki AF' nin anti-toxoplasma antikorunu içerdiğine karar verilmiş ve o AF değerlendirme dışı bırakılmış, Toxoplasma trofozoitlerinden %50 veya daha azının boyanmış olduğu ilk çukurdaki dilüsyon pozitif, eğer boyanan Toxoplasma trofozoitleri %50'den fazla ise sonuç negatif olarak kabul edilmiştir.

Sonuçlar incelenip her çukura 50µl AF gereksinimi göz önünde bulundurularak hasta ihtiyacı kadar 1/128-1/256 dilüsyonlarda pozitivite göstermiş AF' lerden bir karışım hazırlanmış, her plak için 7,2ml olacak şekilde her iki birim AF için 1 birim Ag solusyonu ilavesi ile her bir hasta çukuruna 75µl konulacak olan AF/ Ag karışımı hazırlanmıştır.

Çalışma plaklarından 1. plağın 1. sırasında ulusal pozitif kontrol (akut Toxoplasmik Lenfadenopatiili hasta serumlarının karışımının liyofilizasyonu ile hazırlanmıştır.), 2. sırasında da negatif kontrol çalışıldıktan sonra listeye göre serum

dilasyonları 12. kolon dahil olmak üzere yapılmış, her çukurda 1/2 oranında yapılan sulandırmalar sonunda kırmızı örneklerde 12. kolonun çukurlarında 1/2048, siyah örneklerde de 1/4096 dilusyona ulaşılmıştır.

Her çukura 75µl AF/ Ag karışımı pipetlenmesiyle çukurlar 4 kat daha dilüe edilmiş, böylece kırmızı numunelerin 12. kolondaki çukurları 1/8000, siyah numaralı örneklerde de 1/16000 dilusyon elde edilmiştir. P plağı için yapılan işlemlerin hepsi çalışma plakları içinde tekrarlandıktan sonra hastalar değerlendirilmiş ve kullanılan ulusal standartın bilinen İÜ' sine göre dilusyon değerleri İÜ olarak kalibre edilmiştir. Kullanılan Ulusal Pozitif kontrol 1/ 2000 ünite olduğu durumlarda DT sonuçları aşağıdaki gibi kalibre edilmiştir.

1/16000	dilusyon	= 8000 ünite	1/ 128	dilusyon	= 62 ünite
1/ 8000	"	= 4000 ünite	1/ 64	"	= 31 ünite
1/ 4000	"	= 2000 ünite	1/ 32	"	= 16 ünite
1/ 2000	"	= 1000 ünite	1/ 16	"	= 7 ünite
1/ 1000	"	= 500 ünite	1/ 8	"	= 4 ünite
1/ 512	"	= 250 ünite	1/ 4	"	= 2 ünite
1/ 256	"	= 125 ünite	<1/ 4	"	= 0 ünite

Ulusal standartın 1/4000 ünite olduğu durumlarda ünite değerleri 1/2 oranında azaltılarak kalibre edilmiştir.

2) EIKEN LATEX AGGLİTÜNASYON TESTİ

Siyah örnekler için, dibi U şeklinde olan Falcon mikrotitrasyon plaklarının ilk sırasındaki çukurlarına 25µl Eiken tampon solusyonu konulmuştur. 1. plağın 1. sırasında ilk çukura 25µl ulusal pozitif kontrol, 2. sırasının ilk çukurunu da 25µl negatif kontrol konulduktan sonra sırasıyla plakların 1.kolonundaki ilk çukurlarına 25µl hasta örnekleri pipetlenmiş ve Hamilton sulandırma cihazı kullanılarak hasta örnekleri ait oldukları yatay sıra boyunca iki kat dilüe edilerek son (12.) çukurda siyah örnekler için 1/4000, kırmızı örnekler için 1/2000 sulandırmalara ulaşılmıştır.

DT ile negatif olarak değerlendirilen serumların Latex plaklarında sıralarının 1/16 ve 1/64 dilusyonlara denk gelen 4. ve 6. çukurlarına, DT' de pozitif olan siyah numaralanmış hasta örneklerinin 1/16 dilusyonundan (4.çukurdan) itibaren 1/4000 dilusyonuna ait 12. çukurlarına kadar tüm çukurlarına, DT' de pozitif olan kırmızı numaralı hasta örneklerinin 1/1 dilusyonundan (1.çukurdan) itibaren 1/2000 dilusyonuna ait 12.çukurlarına kadar tüm çukurlarına, DT' de negatif olan

kırmızı numaralı hasta örneklerinin 1/1 dilasyonundan (1.çukurdan) itibaren 1/ 32 dilusyonuna ait 6.çukurlarına kadar tüm çukurlarına, 25µl Latex süspansiyonu eklenmiş, böylece lüzumsuz Latex süspansiyonu sarfi engellenmiştir. Plaklar telefon bant ile kaplanıp iyice karıştırılmış ve sarsıntısız bir yüzeyde, oda sıcaklığında bir gece okunana kadar bırakılmıştır.

Siyah hasta örneklerinde dilusyon aşağıdaki tablodaki gibi düzenlenmiştir.

Çukur No:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dilasyon	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1000	2000	4000

Kırmızı hasta örnekleri için her çukurdaki dilusyonun yarısı geçerlidir.

3) DİREKT AGGLÜTİNASYON TESTİ (DA)

Sulandırılmış serum örneklerinde Toxoplasma' ya özgün IgG antikorları varlığında formalin ile muamele edilmiş Toxoplasma' ların agglütinasyonu prensibine dayanan testte özgün olmayan agglütinasyonu engellemek için dilusyon solusyonu içine 2-Mercaptoetanol ilave edilmiştir. DT ile LAT arasında uyumsuzluklarda ve DT < 16, LAT > 64 olduğu zamanlarda (risk gruplarında DT < 4, LAT > 16) konjenital enfeksiyon riski bulunan anne/bebek çiftlerine ait örneklerde Direkt Agglütinasyon (DA) testi doğrulama testi olarak kullanılmıştır. DA akut toxoplasmosis' te DT' ten daha düşük titrelerde pozitivite verdiği için duyarlılığının daha az olduğu, bu testteki yalancı pozitif reaksiyonların özgün olmayan IgM bağlanmasından kaynaklandığı, test gerçekleştirilmeden önce IgM' lerin serumdan uzaklaştırılması ve trofozoitlerin önceden Tripsin ile muamele edilerek sitoplasmik antijenlerinin de ortaya çıkarılmasının testin duyarlılığını arttırdığı, DT referans alınarak sonuçlar kıyaslandığında DA'un duyarlılığı % 96, özgünlüğü % 98 olarak hesaplanmış, Remington ve Desmont DA sonuçlarının tam olarak DT ile uyum içinde olduğu bildirilmiştir (21, 26, 67)

Pozitif kontrol olarak dahili ve ulusal standart serumlar, negatif kontrol olarak 25µl PBS kullanılmıştır. Kontroller ve hasta örnekleri önce tüpte 1/20 olacak şekilde sulandırılmış, sonrada U tabanlı mikrotitrasyon plağının 1. kolonunun çukurlarına sırasıyla 50µl 1/20 sulandırımından konulmuş, Hamilton dilusyon cihazı ile çift kat dilusyonlar yapılarak her hasta için 1/81920 sulandırımına ulaşılmıştır. Kitin Ag' i iyice karıştırıldıktan sonra, hasta sayısına yetecek miktarda 1/5 oranında BABS tampon solusyonu ile sulandırılmıştır.

BABS RENK TAMPON SOLUSYONU

SODYUM KLORÜR	7,012 gr.	SODYUM AZİD	1gr.
BORİK ASİT	3,092 gr.	BOYA	50mg.
NORMAL NaOH	24 ml.	DİSTİLE SU	1000ml.
SIĞIR ALBUMİNİ	4gr.	pH	8.95

Hazırlanan Ag sulandırımı 2-8°C' da saklandığı takdirde 3-4 hafta stabilitesini korumaktadır. Her çukura 50µl Ag özel kabinde litrede 0,2 mol olacak { 0,35ml. 2-ME + 25ml. PBS (koyu renkli şişede +4°C' da 4 hafta stabilitesini korumaktadır) } şekilde sulandırılmış olan 2-ME her çukura 25µl. konulmuş, böylece çukurlardaki dilusyonlar da iki kat artırılmıştır. Plak kabinde çıkarılmadan önce üzeri sefyon bant ile tamamen kaplandıktan sonra karıştırılmış, sarsıntısız bir yüzeyde, oda sıcaklığında reaksiyonun tamamlanması için bir gece bırakılmıştır. Ertesi sabah sonuçlar aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilmiştir.

Antijen kontrol :Toxoplasma düğme veya halka şeklinde sediment oluşturmuştur

Pozitif reaksiyon :Toxoplasma çukurun yarısını kaplayan bulut şeklinde bir agglütinasyon göstermiş, bulutsu yapı kenarlardan çekildiği için düzensiz bir halka görünümü oluşturmuştur.

Negatif reaksiyon :Toxoplasma düğme veya halka şeklinde sediment oluşturmuştur

Şüpheli reaksiyon:Toxoplasma çukurun yarısından azını kaplayan bulut şeklinde bir agglütinasyon göstermiştir

Serumdaki Ab titresini pozitif reaksiyon görülen en yüksek çukura denk gelmektedir. Eğer sonuçlar İÜ cinsinden verilmek istenirse dilusyonu gösteren payın 1/10' u olarak bildirilmiştir. (Örnek; 1/ 640 dilusyon = 64İÜ)

4) ENZYME LINKED IMMUN ASSAY (ELISA IgM)

ELISA testinde gözlemlenen Antinükleerantikör (ANA), Romatoid faktör (RF) varlığında yalancı pozitif IgM sonuçları Double-Sandwich ELISA yöntemi uygulanarak azaltılmıştır (84).

Toxoplasma'ya karşı oluşmuş özgün IgM antikörlerinin aranması esasına dayanan yöntemde düz dipli Falcon mikrotitrasyon plağının her çukurununa 12ml.

kaplama tamponu içine 12µl Dako toxoplasma anti-µ zinciri monoklonal antikoru konularak hazırlanmış solusyondan, 100µl konularak solid faz hazırlanmıştır.

Kaplama tampon solusyonu için ;

Na₂CO₃ 1.56gr.

NaHCO₃ 2.92gr.

H₂O 1000ml. karıştırılmıştır, solusyon pH' ı 9,6 olacak şekilde ayarlanmış ve +4°C'da 2 hafta kullanılabilir şekilde saklanmıştır. Ab kaplanmış plak üzeri kapatılarak 37°C' da nemli ortamda 1 gece inkübe edilmiş, ertesi gün 10 kez konsantre PBS'den 1000ml. PBS hazırlanmıştır, bunun için

10X PBS:	NaCl	80gr.
	KH ₂ PO ₄	2gr.
	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	29gr.
	KCl	2gr.
	H ₂ O(taze bidistile)	1 Litre

100ml. 10X PBS + 900ml. taze bidistile su karıştırılmıştır. Bu tamponun içine % 0,05 v/v Tween 20 ilave edilerek PBST elde edilmiştir. Bunun ile bir gece önceden hazırlanmış plak 4 kez 5'er dakika yıkanmış, kurumaması için üzeri kapalı olarak nemli ortamda tutulmuştur.

Yıkama sırasında dolaptan çıkarılan sığır serum albumini (BSA) ve kontrol serumları oda sıcaklığına getirilmek üzere bekletilmişlerdir. Bu sırada serum dilasyonlarında kullanılmak üzere % 1' lik (w/v) PBST içinde BSA ilave edilerek pH' ı 7,4 olan sulandırma solusyonu hazırlanmıştır. Her bir plak için gerekli olan sulandırma solusyonu 38ml. PBST içine 2ml. % 20' lik (w/v) BSA konularak hazırlanmıştır. Nemli ortamda saklanan plağın çukurlarındaki yıkama solusyonunun fazlası plak ters çevrilerek kağıt havlu üzerine hafifçe vurularak uzaklaştırılmıştır.

Kontroller ve hasta örnekleri 1/100 dilusyonda hazırlandıktan sonra 1. kolonun 1. ve 2. çukurları ile 12. kolonun 3. ve 4. çukurlarına daha önceden 100 EIU olduğu bilinen pozitif kontrol, 1.kolonun 3. ve 4. çukurları ile 12. kolonun 7. ve 8. çukurlarına daha önceden 25-30 EIU arasında olduğu bilinen zayıf pozitif kontrol serumu ve 1. kolonun 7. ve 8. çukurları ile 12. kolonun 5. ve 6. çukurlarına daha önceden 25 EIU' nun altında olduğu bilinen negatif kontrol serumu 100µl olarak konulduktan sonra hasta örnekleri de 1 hasta 2. kolonun 1. ve 2., 2. hasta 2. kolonun 3. ve 4. çukurlarında olacak şekilde konulmuş, Ulusal standart serum 41.

örnek olarak 100 EIU olacak şekilde her plakta kullanılmıştır. Üzeri kapatılan plak nemli ortamda 2 saat süreyle 37°C'da inkübe edilirken önerilen oranlarda PBST/BSA solusyonu ile antijen/konjuge reaktifinin dilusyonu yapılmıştır.

Her plak için 12ml. Antijen/ konjuge reaktifi (önerilen oran 1/30 ise) 11.6ml PBST/ BSA ile 0.4ml. antijen/konjuge reaktifi sulandırılarak hazırlanmıştır.

İnkübasyondan sonra plak 4 kez 5' er dakika PBST ile yıkanmış, ve plağın her çukuruna 100µl sulandırılmış antijen/konjuge reaktifi konulmuş, plak nemli ortamda 1 saat daha 37°C' da inkübe edilirken, oda sıcaklığında, koyu cam şişede saklanan Tetrametilbenzidin (*TMB*) soluyonundan; (100mg. TMB 10ml. Dimetilsulfoksit içinde çözündürülmüştür.) her bir plak için 15ml asetat tampon solusyonu içine 150µl TMB konularak substrat hazırlanmıştır. Kullanılmadan hemen önce 15µl % 6' lık v/v H₂O₂ ilave edilmiştir.

Asetat tampon solusyonu, (0.1M Sodyum asetat anhidroz (CH₃COO Na) 16.4gr./ 2000ml., 0.1M Sitrik asit { C (OH) (COOH) (CH₂COOH)₂ } H₂O 2.1gr./ 100ml)Sodyumasetat solusyonuna Sitrik asit ilave edilerek tamponun pH' ı 6 olacak şekilde 100ml hazırlanmıştır.

İnkübasyon periyodunun sonunda plak yeniden 4 kez 5' er dakika PBST ile yıkanmış, plağın her çukuruna 100µl TMB solusyonu konulmuştur. Substratın plağın her yerine yayılabilmesi için plak iki yanından tutulup hafifçe masa üzerin vurulmuş, karanlık ortamda, oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika içinde renk reaksiyonu oluştuktan sonra her çukura 25µl 2M H₂SO₄ (89ml. distile su + 11ml. konsantre H₂SO₄)konularak reaksiyonun ilerlememesi durdurulmuştur.

Plak TITERTEK Multiscan ile" İkili Dalgaboyu" kullanılarak değerlendirilmiştir. İkinci filtre plak üzerinde oluşmuş olabilecek parmakizi ve diğer izlerin yanıltıcı sonuçlarını ortadan kaldırmak için kullanılmıştır. Absorbansları ELİSA İntertisyel Ünite cinsine çevirmek için aşağıdaki formülü kullanılmış,

$$EIU = \frac{\text{Örneğin test absorbansı} - \text{Negatif Kontrolün test absorbansı}}{100 \text{ EIU kontrolün absorbansı} - \text{Negatif kontrolün test absorbansı}}$$

X 100

25 EIU altındaki örnekler negatif,

26-34 EIU arasındaki örnekler şüpheli,

35-100 EIU arasındaki örnekler pozitif kabul edilmiştir.

5) IMMUNOSORBENT AGGLUTINATION ASSAY (ISAGA IgM)

ISAGA başlangıç aşamasında insan μ zincirinin CH_2 ucuna özgün monoklonal antikorların kullanıldığı IgM yakalamaya yönelik bir testtir. Özgün IgM ISAGA ile DS-ELISA, konvensiyonel ELISA, IFA testlerinden daha yüksek bir duyarlılıkla tespit edildiği, yalancı pozitif reaksiyonlara rastlanmadığı bildirilmiştir. ISAGA ile % 80 hastada pozitif reaksiyonun enfeksiyonun başlangıcından itibaren 1 yıl kadar korunduğu gösterilmiştir (24, 28, 47, 96, 117).

Serumdaki insan IgM antikorlarının solid bir faza kaplanmış anti-insan IgM McAb' ları tarafından immünolojik olarak yakalanması esasına dayanan ISAGA testinde, serumlar artan konsantrasyonlarda antijen ile test edilmiş, negatif reaksiyonlarda Toxoplasma' lar çökerken, pozitif olgularda Toxoplasma' lar bulut şeklinde çukurun kenarlarına yapışık bir agglütinasyon göstermiştir. Reaksiyon dışı kalan Toxoplasma' lar çukurun dibine çökmüş, çalışmada Referans numarası 75 361 olan bioMérieux kiti kullanılmıştır. Tüm serumlar kullanılmadan önce $56^{\circ}C$ ' da 30 dakika inaktive edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. Kontrol olarak kit pozitif kontrolü, bilinen pozitif kontrol, negatif kontrol olarak da PBS kullanılmıştır. Serum dilasyonları PBS ile aşağıdaki gibi yapılmıştır;

Kit Pozitif Kontrol 1/10 olacak şekilde (30 μ l kontrol + 300 μ l PBS)

Serum Örnekleri 1/100 olacak şekilde (10 μ l serum + 1000 μ l PBS)

Neonatal örnekler, BOS, Amnion mayii, ve 1 yaşın altındaki bebek örnekleri 1/20 olacak şekilde (20 μ l örnek + 400 μ l PBS) hazırlanmıştır.

Bilinen pozitif kontrol de şüpheli serum örnekleri gibi hazırlanmış, örneklerden kaç tanesine üç çukur, kaç tanesine tarama için tek çukur ISAGA uyulanacaksa yeterli sayıda anti-insan IgM McAb ile kaplanmış (fareden elde edilmiş anti- μ zincir) alimünyum folyo içinde 1 ay süre ile $2-8^{\circ}C$ ' de saklanabilen striplerden (8 çukuru bulunan plak dilimi) çıkarılıp, önce 3 çukur, sonra tek çukur tarama yapılacak örnekler sıraya dizilmiş, sulandırılmış şüpheli serumlar ait oldukları sıranın yan yana 3 çukurunada 100 μ l olarak konulmuş, striplerden oluşmuş plağın üzeri kapatıldıktan sonra nemli ortamda $37^{\circ}C$ ' da 2 saat inkübe edilirken taze PBST hazırlanmıştır.

İnkübasyondan çıkarılan plağın çukurlarındaki fazla serum örnekleri plak ters çevrilmek suretiyle dökülmüş ve plak emici kağıt üzerine hafifçe vurularak tüm fazla sıvı uzaklaştırılmıştır. Çukurlar birbirine taşma olmadan 2 kez 5' er dakika PBST ile, 2 kez 5' er dakika da düz PBS ile yıkanmış, fazla sıvı plağın emici kağıt üzerine hafifçe vurulması ile uzaklaştırılmıştır.

Kit içindeki fare periton sıvısından elde edilen toxoplazmaların formalin ile muamele edilmesi ile milimetre kübünde 250.000 toxoplasma olacak şekilde hazırlanmış antijen suspansiyonu, kitteki pH'ı 8.95 olan BABS renkli tamponu (sodyum azide 1gr/l) ile 1/20 oranında, gerekli miktar kadar sulandırılmıştır. Antijen karışımı 3 çukur ISAGA yapılan örneklerde 1. çukura 100µl, 2. çukura 150 µl, 3. Çukura 200µl, tek çukur tarama yapılan örneklere de 100µl olmak üzere pipetlenmiştir. Plağın üzeri kapatıldıktan sonra nemli ortamda 37°C' da bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Plak büyüteçli ayna sisteminden yararlanılarak direkt göz bakısı ile değerlendirilmiştir.

Ag kontrolü olarak kullanılmış olan PBS bulunan çukurlarda toxoplasma' lar düğme şeklinde çökerken, pozitif örneklerde toxoplasma' lar çukurların tabanını bulut gibi kaplıyan agglütinasyonlar oluşturmuşlar, çukurdaki sedimentasyonun büyüklüğüne göre en büyük sedimentasyona 0, sedimentasyon ufaldıkça 1, 2, 3 ve hiç sedimentasyon olmayan çukurda 4 puan verilerek, her örneğin puanı toplanmış ve (Kit pozitif ve bilinen pozitif kontrolün sonuçları 12 olacaktır) o örneğin ISAGA indeksi 0-5= Negatif reaksiyon, 6-8= Şüpheli reaksiyon, 9-12= Pozitif reaksiyon sınırları içinde değerlendirilmiş, ELISA ve ISAGA IgM test sonuçları karşılaştırıldığında; (+ = Pozitif; - = Negatif; +/- = Şüpheli)

ELISA + , ISAGA + = IgM Pozitif

ELISA - , ISAGA + = IgM düşük Pozitif (DT' te belirgin bir artış varsa)

ELISA + veya +/- , ISAGA - = Özgünlük hakkında şüphe varsa tekrar

ELISA - , ISAGA +/- = Şüpheli

ELISA +/- , ISAGA +/- = Şüpheli olarak yorumlanmıştır.

6) IMMUNOSORBENT AGGLUTINATION ASSAY (ISAGA IgA)

U-çukurlu polistiren plaklara kaplanan anti-insan IgA monoklonal antikoları (McAb) tarafından insan IgA antikolarının immünolojik olarak tutulması esasına dayanan testte Toxoplasma' ya özgün IgA varlığı, ortama Toxoplasma organizmalarının katılması ile test edilmiştir. Her örnek belli bir

konsantrasyondaki Ag ile test edilmiş, negatif örneklerde çukurların dibinde sedimentasyon, pozitif örneklerde çukurun kenarlarına yapışık bulut şeklinde agglütinasyon gözlemlenmiştir.

Kullanılan anti-insan IgA McAb' ları Danimarka' daki DAKOPATTS firmasından temin edilmiştir. Her plak için gerekli anti-insan IgA McAb' ları 12 ml. karbonat/ bikarbonat tamponu içine 12µl anti-insan IgA McAb konularak hazırlanmış ve bu suspansiyondan her çukura 100µl konulmuş ve plak selefona bant ile kapatılıp +4°C' da 24 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun sonunda plak 3 kez 5' er dakika PBS ile yıkanıp, % 1 BSA ve % 0,1 sodyum azide içeren PBS ile ikinci kez kaplanmış, üzeri selefona bant ile tekrar kapatılıp +4°C' da 24 saat daha inkübe edilen plak 3 kez 5' er dakika PBS ile yeniden yıkandıktan sonra hemen kullanılmıştır.

Pozitif kontrol olarak ulusal standart, negatif kontrol olarak bilinen negatif serum örneği, Ag kontrolü için PBS kullanılmıştır. Tüm kontrol ve şüpheli serumlar 1/20 oranında (5µl örnek + 95µl PBS olacak şekilde) sulandırılıp, örnekler çalışma planında belirlenmiş çukura 100µl olacak şekilde pipetlenmiş, plağın üzeri selefona bant ile kapatıldıktan sonra nemli ortamda 37°C' da 3 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrası plağın içeriği plak tes çevrilmek suretiyle boşaltılmış, fazla sıvı emici kağıt üzerine plağın hafifçe vurulması ile uzaklaştırılmıştır. Plak önce iki kez 5' er dakika PBST ile daha sonra da yine 2 kez 5' er dakika PBS ile yıkanmış, fazla sıvı emici kağıt üzerine plağın hafifçe vurulması ile en aza indirgenmiştir. ISAGA IgM kiti içindeki Toxoplasma Ag'i, yine kitteki BABS solusyonu ile 1/20 oranında sulandırıldıktan sonra her çukura 100µl konulmuş, üzeri selefona bant ile kapatılan plak nemli ortamda 37°C' da bir gece inkübe edilmiştir.

Sonuçlar PBS bulunan Ag kontrol çukurunda oluşmuş sedimentasyonun büyüklüğü kriter olarak alınarak buna eşdeğer sedimentasyonlara 0 puan, sedimentasyon ufaldıkça 1, 2, 3 ve pozitif kontroldakine eş şekilde çukurun içini dolduran bulut şeklindeki agglütinasyonlara da 4 puan olacak şekilde değerlendirilmiştir. 0, 1, 2 gibi okumalarda sonuç IgA açısından negatif kabul edilirken, 3 ve 4 puan alan örnekler ise pozitif olarak değerlendirilmiştir.

7) ENZYGNOST TOXOPLASMOSIS/ IgG KİTİ İLE AVIDİTE İNDEKSİ HESAPLANMASI

Antijen bağlayan avidite testleri *T. gondii*' ye bağlanan antikorun aviditesinden yola çıkılarak enfeksiyonun süresini saptamakta kullanılan yöntemlerdir. Enfeksiyonun erken dönemlerinde düşük aviditeli antikorlar saptanırken, enfeksiyon ilerledikçe yerlerini yüksek aviditeli antikorlara bıraktıkları bildirilmiş, bu amaçla antijenin bağlanma gücü ELISA avidite testleri ile hesaplanmış, konvensiyonel ELISA değişen konsantrasyonlarda ÜRE ile muammele edildiğinde antijene bağlanan özgün *Toxoplasma* antikorlarını tespit ettiği, hidrojen bağlarını bozarak sabit antijenden, bağlanmış olan antikoru gittikçe artan miktarlarda uzaklaştıran ajanın, yüksek aviditeli antikorlarda en fazla dirençle karşılaştıkları bildirilmiştir (45, 50).

Hamilelerde, Yenidoğanlarda, HIV-pozitif olgularda *toxoplasmosis*' in başlangıç tarihinin bilinmesi, hem hastalara yaklaşım hem de hastalığın prognozu açısından çok önemli bir faktördür. Bu amaçla DT ile kıyaslandığında duyarlılığı % 100, özgünlüğü % 75 olan Behring firmasının ELISA IgG kiti, yıkama aşamasına 6M ÜRE gibi düşük ve yüksek antikort aviditeleri arasındaki farkı en optimal düzeyde ayırd edebilen, tutulmayan bir ajanın eklenmesi ile kullanılmıştır. *Toxoplasmosis*' e bağlı lenfadenopati hastalarda 3 aydan daha yeni olan olgularda Avidite düşük, daha uzun süreden beri devam eden olgularda ise Avidite yüksek olarak bulunmuştur (olgular arasında bu genellemeye uymayan vak'aların olduğu gözlemlenmiştir). Hastalığın başlangıcı ile karar vermede test sonuçlarının yanı sıra klinik veriler de göz önünde bulundurulmuştur. Bu test ELISA ve ISAGA IgM testleri pozitif olan, ayrıca konjenital olarak enfekte bebekler, reaktivasyon geçiren AIDS'li ve transplantasyonlu hasta örnekleri incelenmiştir.

Kit içinde 8'er çukurlu, düz tabanlı, fare peritonundan elde edilmiş inaktif *Toxoplasma Ag*'i ile kaplanmış 12 adet strip, *Toxoplasma gondii*' ye özgün IgG antikorları içeren liyofilize insan serumu (pozitif kontrol olarak 1/ 231 sulandırımında $A \geq 0.5$ olan), *Toxoplasma gondii*' ye özgün antikor içermeyen liyofilize insan serumu (negatif kontrol olarak 1/231 sulandırımında $A \leq 0.1$ olan), Sample Buffer POD (peroksidaz için tris ile tamponlanmış pH' ı 8,1 olan örnek sulandırma solusyonu), Enzygnost mavi boya solusyonu, Gamma zincirine özgün tavşan antikorunun Fab parçasına POD bağlanarak elde edilmiş olan Anti-insan IgG/POD konjuge, konjuge tamponu microbiol (pH' ı 7,2 olan fosfatla tamponlanmış

konjuge sulandırıcı solusyon), konsantre yıkama solusyonu POD, Tampon/substrat TMB, Chromogen TMB, durdurma solusyonu POD (0,5N Sülfirik asit)

Örnekler, kite ait kontrol ve serumlar oda sıcaklığına getirildikten sonra 20ml. Sample Buffer POD içine 1ml. mavi renkli boya solusyonu konularak 100 örnek için " Blue- Sample Buffer POD " hazırlanmıştır (miktar çalışılacak serum sayısına göre ayarlanmalıdır). Kite ait pozitif ve negatif kontrol serumları 0.5ml steril distile su ile karıştırıldıktan sonra kullanıma hazır hale getirilmiştir (-20°C' da 1 ay saklanabilir). Düz tabanlı bir mikrotitrasyon plağında kontroller ve örnekler ön-sulandırmaya tabii tutulmuşlar, bu amaçla her örnek ve kontrol serumuna ait çukura önce 200µl. Blue- Sample Buffer POD, üzerine de 10µl. örnek ilave edilerek 1/21'lik dilusyonlar hazırlanmıştır. Plağın üzeri iyice kapatıldıktan sonra karıştırıcıda sulandırmaların homojenizasyonu sağlanmıştır.

Kitteki Ag kaplı striplerden her kontrol ve örnek için 2 çukur hesaplanarak birbirinin aynı 2 plak oluşturulmuş, plakların birini üzerine ÜRE' li yıkamayı gösteren UREA diğzerinin üzerine de ÜRE'siz yıkamayı gösteren NON-UREA yazılıp, her çukura 200µl. Blue- Sample Buffer POD konulmuştur. Her iki plağında A1-B1 çukurlarına 1/21 oranında sulandırılmış negatif kontrolden 20µl., C1-D1 çukurlarına 1/21 oranında sulandırılmış pozitif kontrolden 20µl., sonrada 1/21 oranında sulandırılmış hasta örnekleri sırasıyla E1-F1, G1-H1, A2-B2 şeklinde her çukura 20µl. konulduktan ve her çukurda 1/231 sulandırım elde edilmiştir. Plak iki yanından tutulup hafifce zemine vurularak serum ile tampon solusyonun karışması sağlandıktan sonra aliminyum folyo ile üzeri kapatılan plak nemli ortamda 37°C'da 1 saat inkübe edilirken, yıkama solusyonu, her plak için 200ml. (190ml. distile su + 10ml. konsantre Yıkama Solusyonu POD), hazırlanmıştır.

6M ÜRE solusyonu taze olarak her tam Plak için 30ml. (30ml.dilue edilmiş Yıkama Solusyonu + 10.8gr. ÜRE) hazırlanmıştır.

Etüvden çıkarılan plakların içerikleri lavaboya dökülmüş, plak hafifçe emici kağıt üzerine vurularak fazla sıvı uzaklaştırılmıştır. NON-UREA yazılı plağın her çukuru 200µl. yıkama solusyonu, UREA yazılı plağın her çukuruda 300µl. 6M Üre solusyonu ile yıkanıp oda sıcaklığında 5 dakika bekledikten sonra, plak içerikleri boşaltılmış, bu kez her iki plağın çukurlarında 2 kez 5' er dakika 300µl yıkama solusyonu ile yıkanmış, her iki strip için 2,5ml. Konjuge tamponuna 0,05ml. konjuge konularak Anti-insan IgG/POD konjuge hazırlanmıştır.

Çukurlardaki yıkama solusyonu boşaltılıp, emici kağıt üzerinde hafifçe vurularak uzaklaştırıldıktan sonra, çukurlara sulandırılmış anti-insan IgG/POD konjuge solusyonu konulup, yeni alüminyum folyo ile kaplanarak nemli ortamda 37°C' da 1 saat inkübe edilen plaklar ve inkübasyon süresinin sonunda 3 kez 5' er dakika 300µl/çukur olacak şekilde yıkama solusyonu ile yıkanmıştır.

Chromogen solusyonu her plak için, 1ml. Chromogen TMB ile 10ml Tampon/substrat TMB karıştırılarak hazırlanmıştır.

Çukurlardaki yıkama solusyonu boşaltılıp, emici kağıt üzerine hafifçe vurularak uzaklaştırılmış, her çukura 100µl Chromogen solusyonu konulup, plak yeni bir folyo ile kaplanmış, banko üzerinde ışıktan uzak bir şekilde oda sıcaklığında yarım saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresinin sonunda reaksiyon, her çukura 100µl. durdurma solusyonu konularak durdurulmuş, plaklar yavaş olarak karıştırılmıştır. Sonuçlar Titertek Multiscan spektrofotometrede 450nm dalga boyunda negatif kontrolün her iki plakta da 0,100A değerinin üzerinde olmamasına, pozitif kontrolün da en az 0,500A absorbans değerinde olmasına dikkat edilerek değerlendirilmiş, aksi durumlarda, test tekrarlanmıştır. Avidite bakılan serumlar kesin sero-pozitif oldukları için kantitatif değerlendirmeye ihtiyaç duyulmamıştır. Avidite İndeksi aşağıdaki formüle uygun olarak hesaplanmış;

$$* AI = \frac{\text{ÜRE İLE YIKAMA SONRASI ABSORBANS}}{\text{ÜRESİZ YIKAMA SONRASI ABSORBANS}} \times \%100$$

Avidite İndeksi < %45 * 3 aydan daha az geçmişi olan akut enfeksiyon,
 Avidite İndeksi > %50 * 3 aydan daha uzun geçmişi olan kronik enfeksiyon,
 %45 ≤ Avidite İndeksi ≤ %50 * Şüpheli olarak değerlendirilmiştir.

8) POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) hızlı gelişimi sonucu moleküler biyolojik tekniklerin içinde hızlı olması, birim maliyeti yüksek olmaması, yetersiz materyellerdeki mikrogram ile ifade edilen DNA miktarlarını saptayabilmesi nedeniyle en yaygın olarak kullanılan methodlardan biri olmuştur (82).

PCR tekniği istenen DNA dizininin (dizinde kırıklık olmamalı ve PCR için inhibitör olan deterjan, EDTA, fenol artıkları da içermemelidir.) tamamlayıcı DNA sarmalı olarak, simultane Primer (18-30 bazlık dizinler) uzatmaları ile *in vitro* olarak çoğaltılması diye tanımlanmıştır (82).

Isıya dayanıklı DNA-Polimerazın(en sık *Thermus aquaticus*' tan elde edildiği için Taq polimeraz diye anılan, çift sarmallı bir bölgeden başlayıp, tamamlayıcı DNA sarmalını 5' den 3' ne tek sarmallı dizin şeklinde sentezleyen) bulunması PCR uygulamasını çok kolaylaştırmıştır (82).

PCR aynı taban üzerinde ısı denatürasyonununa uğratılmış DNA bölgesi sarmallarının, zıt kutuplarına uygun tamamlayıcı iki Primerin kullanılması esasına dayanan bir yöntem olup, Primerlerin, her primer uzatma reaksiyonunu DNA sentezleyecek şekilde ayarladığı, böylece o DNA bölgesinin *de novo* sentezi gerçekleştiği, reaksiyon için enerji ve nükleosid kaynağı olarak Deoxynucleotid, DNA-Polimeraz, Primerler, özgün DNA dizini ve Magnezyum içeren tampon solusyonu gerektiği bildirilmiş, ısıtıldığında denatüre olup, sarmalları ayrılan DNA soğumaya bırakıldığında uygun primerin tamamlayıcı dizinine bağlanıp yeni DNA dizinleri sentezleyebilmesi Deoxynucleotid ve Primerlerin ortama bol konulması önerilmiştir (82).

Isıtma ve soğutma döngülerinin, reaksiyon döngüsüne katılanlardan biri bitene veya enzimin reaksiyonu sürdürebilmesinin imkansız hale geldiği zamana kadar devam edebileceği, yüksek DNA konsantrasyonlarında DNA' nın kendi kendini PRİME etmeye başlayıp, özgün olmayan DNA dizinleri sentezleyebileceği fakat Isıtma-Soğutma döngülerini belli bir sayıda sabitleyerek, başlangıçtaki materyel miktarına ve Isıtma-Soğutma döngülerinin etkinliğine bağlı olarak, bunun engellenebileceği vurgulanmıştır (82).

Konvensiyonel serolojik tanı yöntemlerinin konjenital toxoplasmosis, transplantasyon ve AIDS gibi çeşitli nedenlerle immün sistemi yetersiz hale gelişmiş şahıslarda zamanında ve doğru tanının her zaman mümkün olamaması sonucu, Toxoplasmosis tanısında PCR kullanılmaya başlanmıştır (50, 60, 61,66).

PCR çalışması sırasında mutlaka eldiven giyilmesine, en ufak bir örnek veya kimyasalla bulaş şüphesi olduğunda eldiven değiştirilmesine, PCR' ın o evresine ait pipetler kullanılmasına, çalışmaların tümü Toxoplasma PCR' ı için ayrılmış kabinde

yapılıp, pipet uçlarının ayrı bir yerde yakılarak yok edilmesine, koruyucu gözlük ve maske kullanılarak çalışılmasına dikkat edilmiş, PCR çalışılacak örneklerdeki DNA ve RNA Protease K kullanılarak serbestleştirilmiştir.

EDTA ile ortamdaki magnezyumun kelat oluşturup, enzimlerin DNA' yı sindirmesi engellenmiş, SDS' in deterjan etkisi ile lipidler ve proteinler solubilize edilmiş, TEN tampon solusyonu ile doyurulmuş sıvı fenol kullanılarak DNA çıkartılmış, SDS ile isoamil alkol içindeki kloroform ile fenol uzaklaştırılmıştır. Alkol fazların yoğunluğu arttırmak ve ortamdaki % 0,1' lik 8-hidroksiquinolon fenolün rengini sarıya çevirip fazlar arasında renk farkı yaratmak amacıyla kullanılmış, DNA % 100 etanol kullanılarak çöktürülmüştür.PCR çalışılmadan önce örneklerle aşağıdaki işlemler uygulanmıştır;

Amnion mayii çoksa santrifüje edilip çökeltisi, az ise doğrudan kullanılmıştır.

Föetal kan / bebek kanı antikoagulanlı ise doğrudan, koagulasyon varsa Griffit tübünbe emülsifiye edilip kullanılmıştır, gerekmedikçe homojenizasyon için diluent kullanılmamıştır

Anne/ immün sistemi sağlam hasta/ HIV-Pozitif/ kordon kanı koagüle ise Griffit tübünbe emülsifiye edilip kullanılmıştır, gerekmedikçe homojenizasyon için diluent kullanılmamıştır.

BOS yeterli miktarda ise santrifüje edilip çökeltisi, değilse doğrudan kullanılmıştır.

Kan/ kemik iliği (Antikoagulanlı) santrifüj sonrası buffy coat (beyaz hücre) kısmı kullanılmıştır.

PCR' da kullanılan sarf malzemeleri

STOK SOLUSYONLAR:

5 M	NaCl	100ml. steril distile su + 29gr. NaCl
1M	Tris	100ml. steril distile su + 12.1gr. Trizma base
0.5 M	EDTA(pH8)	100ml. steril distile su + 18.6gr. EDTA (pH, 10M NaOH ile ayarlanır)
10 M	NaOH	100ml. steril distile su + 40gr. NaOH
%100	Etanol	
%10	SDS	100ml. steril distile su + 10gr. Sodyum Dodecyl Sülfat

TEN Tampon Solusyonu

5ml.	1M Tris
2ml	5M NaCl
2ml	0.5M EDTA (pH 8)
91ml	steril distile su

TEN / % 1 SDS Tampon Solusyonu

5ml.	1M Tris
2ml	5M NaCl
2ml	0.5M EDTA (pH 8)
10ml	SDS (% 10' luk stoktan)
81ml	steril distile su

TE Tampon Solusyonu (pH 8)

1ml.	1M Tris Hcl (pH 8)
0.2ml	0.5M EDTA (pH 8)
98,8ml.	steril distile su ilave edilmiştir.

KLOROFORM / AMYL ALKOL

96ml. Kloroform + 4ml Isoamyl alkol

FENOL (STOK)

100ml. Fenol (50°C' lik su banyosunda sıvılaştırılmıştır.)

100ml. TEN / % 1 SDS Tampon Solusyonu

0,1gr. % 0,1' lik 8-Hidroksiquinolon

Solusyonlar fenol fazının TEN/ % 1 SDS Tampon Solusyonu ile iyice doyunlaşacağı şekilde karıştırılmıştır. % 0,1' lik 8-Hidroksiquinolon fenol fazını sarıya boyaması sağlanmıştır.

ETHIDIUM BROMIDE (10mg/ml)

25ml. stok solusyon + 0,25gr. Ethidium bromide

ÖRNEK Tampon Solusyonu

0,1ml. (% 10) TAE

0,5ml. % 100 Gliserol

0,4ml. H₂O

Bir iki granül Bromotimol mavisi

TAE(X10)

48,4gr. Trizma base
11,42ml. Glacial acetic asit
100ml. 0.5 EDTA (pH 8)
Steril distile su ile 1 litreye tamamlanır.

Tris HCl (1M) pH 7.4

60.6gr. Trizma base
500ml. steril distile su
pH yoğun HCl ile ayarlanmıştır.

PCR Tampon Solusyonu

3,72gr. KCl
1,21gr Tis-baz
1,5ml. 1M MgCl
0,1gr. Jelatin
Distile su ile 100ml' ye tamamlanmıştır.

NÜKLEOTİDLER

Boehringer Mannheim UK Ltd. tarafından sağlanan ;

2'Deoxy-cytidine-5'-triphosphate (dCTP) Kat.No.: 1051458

Thymidine-5'- triphosphate (dTTP) Kat.No.: 1051482

2'Deoxy-adenosine-5'-triphosphate (dATP) Kat.No.: 1051440

2'Deoxy-quanosine-5'-triphosphate (dGTP) Kat.No.: 1051466

Nükleotidler 110mM solusyonlar olarak gönderilmişlerdir, bunların kullanım konsantrasyonu olan 1.25mM konsantrasyona ayarlanması için ;

*125µl ATP, 125µl CTP, 125µl GTP, 125µl TTP, 9.5ml. PCR suyu ile karıştırılmış, 100µl birimler halinde Eppendorf tüplerinde -20°C' da saklanmıştır.

ENZİM

Product Amplitaq 250 ünite (N801-0060) International Lab. Services Ltd. UK

PCR SUYU

BDH'nin ürünlerinden Hi Per Solv Ürün No:15273

PRİMERLER

Oswel DNA Service Dept. of Chemistry Edinburg İSKOÇYA

Her primerden 0.2 μ M sipariş verilmiştir;

PRİMER 1: 5'CGC GAC ACA AGC TGC GAT AG 3'

PRİMER 2: 5'TTG CCG CGC CCA CAC TGA TG 3'

PRİMER 3: 5'CGA CAG CCG CGG TCA TTC TC 3'

PRİMER 4: 5'GCA ACC AGT CAG CGT CGT CC 3'

Primerler, israfi engellemek amacıyla, 10 μ l' lik Eppendorf tüplerine bölünerek -20°C' da saklanmıştır.

Toxoplasmosis tanısı için rutin olarak PCR çalışmalarında T. gondii' nin tek kopya olduğu bildirilen, temel yüzey antijeni, P30 geni kullanılmıştır (27).

Örnekler protokol numaralarına göre sıralanıp, su banyosunun 50°C ısınması beklenirken, her 200 μ l emülsifiye plasenta için 200 μ l Tampon/ Protease K karışımı, her 50 μ l BOS için 50 μ l Tampon/ Protease K karışımı hazırlanmıştır.

Tampon/ Protease K karışımı universal plastik tüpler içine;

2ml. TEN Tampon solusyonu

200 μ l %20' lik stok SDS (konsantrasyon % 2 olacak şekilde)

20 μ l 20mg/ml stok Proeease K (dilusyonu 1/ 100 olacak şekilde)

Karışım çalkalanırken SDS'in köpüreceği dikkate alınmış, ve emülsifiye edilmiş örnek miktarı kadar, kapakları üzerine ait oldukları hasta örneğinin numarası yazılı Eppendorf tüpleri içine konulup pipetle karıştırılmış, sonra tüpler 50°C' lik su banyosuna 3 saat süre ile konulmuş, bu sürenin sonunda her 200 μ l.örnek için 100 μ l. doymuş formol ve 100 μ l. kloroform ilave edilmiştir.

Kapağı iyice kapatılan tüplerin numaralarının silinmediği kontrol edilip her tüp en az 2-3 dakika fazların ayırtedilemeyeceği şekilde VORTEX'de çalkalanmış, tüpler bu işlemi takiben Mikrosantrifüjde 13000 rpm' de 5 dakika ya da 2500 rpm' de 15 dakika santrifüje edilip dip kısmında toplanmış olan fenol içeren faz pipet ile uygun şekilde atılarak, DNA içerdiği tahmin edilen üst kısımdaki akköz fazdan ayrılmıştır. Her tüpe, suspansiyon içindeki artık fenolü uzaklaştırmak için, başlangıçtaki örnek miktarı kadar (200 μ L örnek + 200 μ l.kloroform) kloroform konulmuştur

Tüpler kapakları kapatılıp üzerlerindeki numaralar kontrol edildikten sonra en az 2-3 dakika fazların ayırt edilemeyecek şekilde VORTEX' de karıştırılmış ve.

bu işlemi takiben Mikrosantrifüjde 13000 rpm' de 5 dakika ya da 2500 rpm' de 15 dakika santrifüje edilmiş, üst kısımdaki akköz faz, dip kısımdaki fenol içeren fazdan aradaki kritik bölgeye dikkat edilerek, ayın numara verilmiş yeni Eppendorf tüpleri içine konulmuş, her Eppendorf tüpüne içerdiği başlangıç örnek miktarının iki katı kadar % 100 Etanol ilave edilmiştir. Tüpler en az 2-3 dakika fazların artık ayırt edilemeyeceği döneme kadar VORTEX'de çalkalanmış ve -20°C' lik derin dondurucuda bir gece (zaman sıkışık ise -70°C' lik derin dondurucuda yarım saat) bırakılmıştır. Örnekler bu evrede çalışılana kadar -20°C' de saklanabilmektedir.

Çalışılacağı zaman oda ısısında çözdürülen örnekler Mikrosantrifüjde 13000 rpm.'de 30 dakika Eppendorf tüplerini kapak bağlantılarının santrifüjün dışına dönük olmasına özellikle dikkat edilerek santrifüje edilmişlerdir. İşlemin sonunda tüplerin dibinde yaklaşık 5µl. kalacak şekilde üst kısım usulüne uygun olarak atılmış, tüpler kapakları açık olarak etanolün buharlaşmasına olanak tanımak üzere sıcak odada (37°C) 30 dakika veya tüpün içeriği kuruyuncaya kadar bırakılmıştır.

Tüm tüplerin içerikleri kuruyunca tüpülerin dibinde ve duvarında oluşmuş olan DNA peletleri, eğer deposit görünüyorsa 40µl TE tampon solusyonu ile, görünmüyorsa 20µl TE tampon solusyonu ile suspense edilmiş ve tüpün duvarlarında yapışık kalmış olabilecek DNA kalıntıları pipet ucu ile kazanmıştır.

Kapakları üzerine ait oldukları hasta örneğinin numarası yazılı Eppendorf tüpleri sıkıca kapalı oldukları kontrol edildikten sonra 60°C' lik su banyosuna 10 dakika süre ile çözünmeyi kolaylaştırmak amacıyla konulmuştur. Bu evredeki DNA -20°C' lik derin dondurucuda istenildiği kadar saklanabilmektedir.

PCR çalışılacağı zaman -20°C' lik derin dondurucudan çıkarılan DNA örnekleri oda sıcaklığına eriştikten sonra 50°C' lik su banyosuna 30 dakika tutulurken, gerekli olan **MASTER MIX** aşağıdaki oranlarda

PCR Tampon solusyonu	5µl
Nükleotidler	8µl
Primer 1	0,4µl
Primer 2	0,4µl
PCR suyu	26µl
Enzim	0,2µl

elde edilen miktar, örnek sayısına, 2 pozitif, 1 negatif kontrol ve 2 pipetleme hatası eklendikten sonra çarpılarak gerekli olan Master Mix miktarı hazırlanmıştır.

MASTER MIX hazırlanırken reaktifler PCR suyu, PCR tampon solusyonu, Nükleotidler, Primerler ve en son olarak Enzim sırasıyla konulmuş karışım, polystern kapta kırık buz içinde saklanmıştır. Aynı kap içine bir başka Üniwersal tüp içinde de sadece PCR suyu konulmuştur. Kapakları üzerine ait oldukları hasta örneğinin numarası yazılı Eppendorf tüplerinden kontrollar için de 3 ilave yapıldıktan sonra yeni bir set hazırlanmıştır. Her tüpe ait olduğu DNA örneğinden 10µl üzerine de **MASTER MIX**'ten 40µl konulup pipetle iyice karıştırılmış, üzerleri de 50µl PCR yağı ile buharlaşmayı önleyecek şekilde kaplanmıştır.

Negatif kontrol olarak 10µl PCR suyu, 1.Pozitif kontrol olarak 10µl 100°C'da 10 dakika kaynatılmış Toxoplasma trofozoitleri, 2.Pozitif kontrol olarak da 1µl 920 baz çiftlik fragman + 9µl PCR suyu karışımı kullanılmıştır.

Not: 1.Pozitif kontrol olarak kullanılan 100°C' da 10 dakika kaynatılmış Toxoplasma trofozoitleri bu işlemi takiben Mikrosantrifüjde 13000 rpm' de 1-2 dakika santrifüje edilmiş, süpernatantı kullanılmıştır.

Kapakları üzerine ait oldukları hasta örneğinin numarası yazılı Eppendorf tüpleri Perkin-Elmer Citus marka Thermo-cycler cihazının ısıtıcı bölümlerine sırayla yerleştirildikten sonra tüpler +95°C' da 5 dakika kaynamaya bırakılmıştır. Cihazın mini bilgisayarı üzerinde önce +94°C' da 1 dakika, +60°C' da 1 dakika, +72°C' da 3 dakika olarak proglamlandıktan sonra bu döngünün 30 kez tekrarlanması gereği ile ilgili komut verilmiştir. Siklusun sonunda ikincil PCR reaksiyonu için gerekli Master Mix' i hazırlamadan önce her tüpte 920 baz çiftlik fragmanlar olduğunu göz önünde bulundurularak bulaşa olanak verilmeyecek şekilde ya -20°C' da veya hemen çalışılacak ise Toxoplasma PCR Kabini içinde saklanmıştır. İkincil PCR Reaksiyonu Master Mix' i;

PCR Tampon solusyonu	5 µl
Nükleotidler	8 µl
Primer 3	0,4µl
Primer 4	0,5µl
PCR suyu	25,9 µl
Enzim	0,2µl

bir örnek için gerekli yukardaki miktarın, birincil PCR reaksiyonundaki örneklerin sayısına 3 örneklik olası pipetleme hata payı eklenerek elde edilen sayı ile çarpılarak hazırlanmıştır.

Kapakları üzerine ait oldukları hasta örneğinin numarası yazılı Eppendorf tüplerinden yeni bir set hazırlanmıştır. Her tüpe ait olduğu Birincil PCR reaksiyonu ürününden 10µl, üzerine de *MASTER MIX*'ten 40µl konulup pipetle iyice karıştırılmış, üzerleri de 50µl PCR yağı ile buharlaşmayı önleyecek şekilde kaplanmış, tüplerin kapaklarının iyice kapalı olduğu kontrol edildikten sonra Eppendorf tüpleri Perkin-Elmer Cetus marka Thermo-cycler cihazının ısıtıcı bölümlerine sırayla yerleştirilmiştir.

Tüpler +95°C' da 5 dakika kaynatıldıktan sonra cihazın mini bilgisayarı önce +94°C' da 1 dakika, +60°C' da 1 dakika, +72°C' da 3 dakika olarak programlanmış ve bu döngünün 30 kez tekrarlanması gereği ile ilgili komut verilmiş, elde edilen ürün hemen kontrol edilmeyecekse + 4°C' da saklanmıştır.

NESTED PCR adı verilen bu yöntemte, istenilen DNA sırasının birincil PCR reaksiyonu ile çoğaltılmasını takiben bu dizinlerin daha ortalarından bir dizinin seçilmesi ve bu dizine uygun primerlerin ortama ilave edilmesi ile ürünlerin özgünlüğünün daha artırılmasının hedeflenmiştir (82).

Elde edilmiş PCR ürünlerini görüntülemek için Jel Elektroforezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla elimizdeki çalışılacak PCR ürünleri miktarına göre elektroforez tankı seçildikten sonra cam balonun içine 10 kez konsantre TAE solusyonundan 10ml. konulup üzerine 90ml. distile su ilave edilmiştir, içine 1gr. Agarose (TypeII Medium EEO) konulduktan sonra mikrodalga fırında 1-2 dakika ısıtılarak çözünmenin tam olması sağlanmış ve cam balon iyice çalkalanarak agarose eriği homojenize edilmiştir. Cam balon mikrodalga fırında yeniden 1-2 dakika ısıtılarak çözünmemiş agarose kalmadığından emin olunmuştur. Cam balon oda ısısında soğumaya bırakılmıştır.

Bu esnada elektroforez tankı açık ağızları otoklav bandı ile çevrilmek suretiyle hazırlanmış, elektroforez tarağı elektroforez tankına kenardan 1cm. uzağa ve tankın tabanına 0,5-1mm kalacak şekilde yerleştirilmiştir. Soğumaya bırakılan Agarose jeline, yaklaşık 56°C ulaştığında, her 50ml agarose eriği için 2µl. **Ethidium Bromide** ilave edilip iyice karıştırılmış, Ethidium Bromide ile çalışılırken bunun bir mutajen olduğu dolayısıyla eldiven ile çalışılması gerektiği unutulmamıştır.

Jel tanka dökülüp katılması beklenirken, 10 kez konsantre TAE solusyonundan 1 birime 9 birim distile su ilave edilerek 1 X TAE elde edilmiş ve elektroforez tankının alacağı miktar olan 700-800ml. hazırlanıp tanka dökülmüştür. Jel sertleştikten sonra, jele zarar vermeden tarak çok dikkat edilerek çıkarılmış, Jel tankının etrafını sınırlayan otoklav bandı alındıktan sonra elektroforez tankı elektroforez çanağına, jelin üzeri en az 1cm. yükseklikte tampon solusyonu ile kaplanacak şekilde yerleştirilmiştir.

Yağ tabakasının altındaki kısmı oluşturan ikincil PCR ürünlerinden yeni Eppendorf tüplerine 10' ar μ l. konulup, bir diğer Eppendorf tüpüne de protein marker' ı olarak kullanılan 2 μ l Hindi III ile 2 μ l Örnek tampon solusyonu karışım konulmuştur. Her ikincil PCR ürününün bulunduğu tüpe 2 μ l Örnek tampon solusyonu ilave edilmiş ,tüplerin iyice karışması sağlanmıştır. Jelin ilk çukuruna Hindi III protein marker'ı, diğer çukurlara da ikincil PCR ürünleri sırayla konduktan sonra, jelde çukurların olduğu tarafa negatif elektrot, karşı tarafına da pozitif elektrot bağlanmış, mA ve voltaj göstergeleri 0' da iken cihaz açılıp 30 saniye kadar ısınması için beklenmiş daha sonra da voltaj ibresi 75V gösterecek şekilde ayarlanmıştır.

Yaklaşık 1-1.5 saat kadar elektroforez akımına devam edilip Bromotimol mavisinin jelin diğer ucuna 1-2cm kadar yaklaştığının gözlemlenmesi ile cihaz kapatılmıştır. Eldiven yardımı ile jel alınıp karanlık odadaki **TRANSİLÜMİNATÖR** üzerine konulmuş, koruyucu gözlük takıldıktan sonra referans λ kütle markını yardımı ile birincil PCR ürünü 914 baz çiftlik bölgede, ikincil PCR ürünü 520 baz çiftlik bölgede transilüminasyon izlenmiş, gerekli durumlarda poloroid kamera ile jelin fotoğrafı çekilmiştir.

BULGULAR

17 Kasım 1993 - 14 Şubat 1994 tarihleri arasında St. George' s hastanesi Toxoplasma Referans Laboratuvarına örnekleri ulaşan 596 hastanın 342' si (%57,4) bayan, 254' ü (% 42,6) erkektir. Yaş grupları açısından hastalar incelendiğinde 68' i (% 11,4) 0-20 yaş arası, 413'ü (% 69,3) 21-40 yaş arası ve geri kalan 115 örnekte (% 19,3) 40 yaş üzerindeki hastalara aittir. Hastaların yaş gruplarına göre dağılımı tabloda gösterilmiştir. Örneklerin geliş sebeplerine göre dağılımı ise aşağıdaki gibidir:

Sadece merak nedeniyle 5

Gebelik öncesi tarama 17

Gebelik 182

Düşük ya da ölü doğum sebebini araştırma 14,

Ultrasonografik olarak anomali saptanmış Fetüslara ait örnekler 11

Annesinde özgün Toxoplasma IgM saptanmış bebeklere ait örnekler 36

Lenfadenopati (*LAP*) 37

Kronik yorgunluk şikayetleri ile başvuran hastaların örnekleri 10

Karaciğer Fonksiyon Testleri (*KFT*) Bozukluğu 7

Sarılık 9

Üst abdominal ağrı nedeniyle gelen örnek 1

Çeşitli Viral enfeksiyonlarının seyri sırasında 7

Çeşitli göz şikayetleri ile gelen örnekler 19

HIV+ veya immün yetmezliği olanlar 91

CD₄ düşüklüğü nedeniyle gelen örnekler 4

Pneumocystis carinii Pnömonisi (*PCP*) olan hastalar 3

Homoseksüel hastaya ait örnek 1

Ensefalit 4

Transplantasyon hastaları 122

İnokulasyon için gönderilen örnekler 16

İnokulasyon amacıyla gönderilen 16 örnek hariç geri kalan 580 örnekten sadece 3 tanesine örnek miktarı yeterli olmadığı için DT çalışılmamış bunlarda da ELISA ve ISAGA yöntemleri ile IgM aranmış, IgM antikorlarının tespit olunamadığı bu hastalardan yeni örnekler istenilmiş, fakat çalışma süresi içinde yeni örnekler elde edilememiştir. Bu üç hasta haricindeki 12 hastanın örnekleri de yine miktar yetmezliğinden dolayı sadece DT, ELISA IgM ve ISAGA IgM bakılmıştır. Dye test ve Latex bakılan 565 olgudan 45 (% 7,96) olguda uyumsuzluk

gözlemlenmiş ve sonuçları doğrulamak için bu 45 örnekte Direkt Agglütinasyon testi de çalışılmıştır. Bu 45 uyumsuz test sonucunun 37 (% 82) tanesinde DT negatif Latex pozitif olarak görülmüş, yapılan DA sonucunda da 36(% 97,3) örneğin sonuçları DT' i destekler nitelikte negatif sadece 1 (% 2,7) olgu Latex' i destekler nitelikte pozitif olarak bulunmuştur.6 (% 13) hasta örneğinde ise DT pozitif, Latex negatif iken DA testinin sonuçları DT' yi destekler nitelikte (% 100) bulunmuştur. Geri kalan 2 (% 5) hasta örneğinde DT 62 IU/ml, Latex 1/ 2000 iken DA 1/ 2048, DT 4 IU/ml, Latex 1/ 32 iken DA 1/ 32 bulunmuştur.

Seroloji için gönderilen 580 örnekten 304' üne (% 52,4) hem ELISA hem de ISAGA IgM çalışılmıştır. Serum miktarındaki yetersizlikten dolayı da 85 (% 14,65) hastaya sadece ISAGA IgM çalışılmıştır, bu grupta çalışılmış tüm serumlar negatif bulunduğu için, yaklaşık 18 aylık bir süre pozitif kalan antikörleri tespit edebilen bu testten sonra, yaklaşık 6 aylık antikörleri tespit edebilen ELISA IgM yöntemi için yeni örnek isteme ihtiyacı oluşmamıştır. Test sonuçları incelendiğinde her iki testin de pozitif olduğu 64 (% 21) olgudan ilk kez gelenlere ait 36 (% 56,3) örnekte ELISA IgG yöntemi ile hastalığın başlangıç tarihi hakkında bilgi verecek olan avidite araştırılmıştır. Her iki testin de negatif bulunduğu olgu sayısı (% 51,6) 157' dir. 23 (% 7,6) olguda ELISA-IgM negatif, ISAGA-IgM pozitifken, 16 (% 5,3) olguda ELISA-IgM şüpheli, ISAGA-IgM pozitif, 1 (% 0,3) olgu ELISA-IgM pozitif, ISAGA-IgM şüpheli, 40 (% 13,2) olgu ELISA-IgM negatif, ISAGA-IgM şüpheli, 3 (% 1) olguda ise her iki testte şüpheli olarak yorumlanmıştır.

Gelen bebek serumlarında ISAGA yöntemi ile IgA araştırılmış toplam 35 örnekten sadece 1' inde(% 3) pozitif olarak bulunmuştur.

ELISA-IgG ile yapılan avidite tayininde hem ELISA-IgM hem de ISAGA-IgM pozitif bulunan 36 örneğin aviditeleri, 2 olgu % 45, 1 olgu % 72, 1 olgu % 82, 2olgu % 83, 1 olgu % 86, 1 olgu % 87, 2 olgu % 88, 2 olgu % 91, 1 olgu % 94, 6 olgu % 95, 4 olgu % 97, 4 olgu % 101, 1 olgu % 103, 3 olgu % 104, 1 olgu % 106, 2 olgu % 107, 1 olgu da % 109 olarak hesaplanmıştır.

146 hamileden 87' sinde (% 59,6) LAT ve DT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM sonuçları negatif bulunmuş, 59' unda (% 40,4) yapılan testlerde hiç bir özgün Toxoplasma antikoru tespit edilememiştir,

Geçmişinde düşük hikayesi olan 7 (% 50)hamileye ait örneklerde özgün Toxoplasma antikorunu tespit edilememiş, 7 (% 50) hamileye ait örneklerde ise LAT ve DT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM sonuçları negatif bulunmuştur,

Hamilelik esnasında konjenital enfeksiyon riski taşıyan 36 annenin çocuklarına ait 33 (% 91,7) örnekte LAT ve DT pozitif, ELISA IgM, ISAGA IgM ve ISAGA IgA sonuçları negatif bulunmuş, 3 (% 8,3) örnekte ise Toxoplasma' ya özgün antikor tespit edilememiştir,

Soliter organ ve Kemik iliği nakli yapılacak 122 hastanın 52' sinde (% 42,6) Toxoplasma' ya özgün antikorlar DT ve LAT ile tespit edilmiş, 70' inde (% 57,4) ise Toxoplasma' ya özgün antikor tespit edilememiştir,

Çeşitli nedenlerle (hamilelik, merak, hamilelik öncesi tarama, hayvanlarla ilgili işlerde çalışma gibi) başvuran hastalardan kedi besleyen 31 hasta örneğinden 5' i (% 16,1) DT, LAT, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM pozitif, 18' i (% 58,1) DT ve LAT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM negatif bulunmuş, 8' inde (% 25,8) ise Toxoplasma' ya özgün antikor tespit edilememiştir,

Hamilelik sırasında veya gebelik öncesi yakın dönemde akut akkiz toxoplasmosis geçirmiş annelerden 22 tanesinde Toxoplasma enfeksiyonunun 3-6 ay arası bir dönem içerisinde geçirildiği görülmüşken, 14 tanesinde de 6-18 ay arası bir dönem içerisinde geçirildiği görülmüştür,

Karaciğer Fonksiyon Testleri bozuk olan hastaların örneklerinden 4' ünde (% 61,1) DT ve LAT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM negatif bulunurken, 3' ünde (% 38,9) ise Toxoplasma' ya özgün antikor tespit edilememiştir,

Çeşitli nedenlerle gelen 17 hasta da DT, LAT, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM pozitif konulmuştur,

Homoseksüel bir erkek hasta kuşku üzerine başvurmuş, ama Toxoplasma' ya özgün antikor tespit edilememiştir,

HIV pozitif veya AIDS tanısı almış 91 hasta örneğinden 39' unda (% 42,9) Toxoplasma' ya özgün antikor serolojik olarak saptanamamış, 52' sinde (% 57,1) olguda ise DT ve LAT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM negatif bulunmuştur.

Klinik ve radyolojik olarak ensefalit teşhisi ile gelen HIV pozitif hastalara ait 4 (% 100) serumun DT, LAT, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM pozitif olduğu görülmüştür.

Kronik yorgunluk şikayetleri olan 10 hastadan 4' ünde (% 40) Toxoplasma' ya özgün antikor tespit edilemezken, 6' sında (% 60) DT ve LAT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM negatif olduğu gözlenmiştir.

Lenfadenopati şikayetleri olan 37 olgu örneğinden 14' ünde (% 37,9) DT ve LAT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM negatif, 10' unda (% 27) DT, LAT, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM pozitif olarak değerlendirilmiş, 13' ünde (% 35,1) ise Toxoplasma' ya özgün antikor tespit edilememiştir,

Toxoplasmosis şüphesi duyan sadece merak amacıyla gelen 5 hastada da Toxoplasma' ya özgün antikor tespit edilememiştir,

Yapılan araştırmalarda CD₄ düzeyi düşük bulunan 4 olgudan 3' ünde (% 75) DT ve LAT pozitif, ELISA IgM ve ISAGA IgM negatif saptanırken, 1' inde (% 25) Toxoplasma' ya özgün antikorlar saptanamamıştır.

Klinik olarak sarılığı olan 9 hasta örneğinden 3' ünde (% 33,3) DT ve LAT pozitif, ELISA IgM ve ISAGA IgM negatif saptanırken, 6' sında (% 66,7) Toxoplasma' ya özgün antikor varlığı gözlenmemiştir.

Göz bulgusu olan 19 hastadan 10' unda (% 52,6) DT ve LAT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM negatif, 3' ünde (% 15,8) de DT, LAT, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM pozitif serolojik değerleri saptanmış, 6' sında (% 31,6) ise Toxoplasma' ya özgün antikor tespit edilememiştir,

Viral enfeksiyonlara eşlik edebilecek toxoplasmosis açısından tetkik edilen 7 örneğin 5' inde (% 71,4) DT ve LAT pozitif, ELISA IgM ve ISAGA IgM negatif bulunmuş, 2' sinde (% 28,6) Toxoplasmaya özgün antikor tespit edilememiştir,

Ultrasonografik olarak fetal anomali (böbrek kalsifikasyonu, hidrocefali, Ventrikülomegali, serebral kalsifikasyon, , intrauterin gelişme geriliği) tespit edilen 11 hastanın kordon kanı analizlerinde, hiç bir örnekte IgM sınıfı antikorlar tespit edilemezken, 3' ünde (% 27,3) sadece DT, 5' inde (% 45,4) hem DT hem de LAT, 1' inde (% 9,1) DT, LAT ve ISAGA IgA pozitif bulunmuş, 2' sinde (% 18,2) ise Toxoplasma' ya özgün antikor tespit edilememiştir,

Üst abdominal ağrı şüphesi ile başvuran 1 hastada ise DT ve LAT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM negatif bulunmuştur.

PCP teşhisi almış 3 olgunun serolojik incelenmesinde özgün Toxoplasma antikorlarına rastlanılmamıştır,

Hamilelik öncesi tarama amacıyla serum örnekleri gönderilen 17 olgudan 12' sinde (% 70,6) DT ve LAT ile pozitif sonuçlar alınmış, Toxoplasma'ya özgün IgM sınıfı antikor tespit edilememiş, 5' inde (% 29,4) özgün Toxoplasma antikorlarına rastlanılmamıştır.

16 örnek (2 BOS, 9 lenf bezi biopsisi, 2 plasenta parçaları, 1 nekrotik doku, 2 amnion sıvısı) MF1 cinsi beyaz farelere inoküle edilmiş ve sadece 2 lenf bezi örneğinden parazit izole edilmiştir. Aynı hastaların serum, BOS, amnion sıvısı örneklerinde gerçekleştirilen serolojik testlerde 9' unda (% 56,2) kronik toxoplasmosis'i (DT ve LAT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM negatif), 3' ünde (% 18,8) akut toxoplasmosis' i destekleyen (DT, LAT , ELISA IgM, ISAGA IgM pozitif) serolojik sonuçlar alınmış, 4' ünde (% 25) ise özgün toxoplasma antikorlarına rastlanılmamıştır,

İnokülasyon için gönderilen 16 örneğin dışında annelerinin serumunda özgün Toxoplasma IgM tespit edilen 36 bebek kanı, bu annelere ait örnekler, Ultrasonografi ile anomali saptanmış fetuslara ait 11, organ nakli hastalarına ait 6, göz şikayeti olan hastalara ait 4, lenfadenopati şikayeti olan hastalar ait 12 ve HIV pozitif olgulardan alınan 14 örnekte PCR çalışılmış, ayrıca serolojik olarak negatif sonuçların alındığı 5 hastanın kanı da incelenmeye dahil edilmiştir (TABLO 1, 2).

Tablo 1.

Hasta grubu	İncelenen örnek									
	Venöz kan	Lenf bezi	Nekrotik doku	Amnion sıvısı	Plasenta	Fetal kan	Humör aköz	BOS	Toplam	
<i>İmmün sistemi sağlam olanlar</i>	18	9	1						28	
<i>Gebelik tırtılları</i>	36			8	2	3			49	
<i>Göz bulgusu olanlar</i>	3						1		4	
<i>HIV pozitif olanlar</i>	12							4	16	
<i>Organ nakli (kalp)</i>	5								5	
<i>Organ nakli (kemik iliği)</i>	1								1	
Genel toplam	75	9	1	8	2	3	1	4	103	

Tablo 2.

Hasta grubu	PCR Yapılanlar		İnokülasyon uygulananlar		Toplam
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	
A) İmmün sistemi sağlam olanlar					
Venöz kan	9	9			18
Lenf Bezi	5	4	2	7	9
Nekrotik doku		1		1	1
B) Gebelik tırtırları					
Venöz kan	10	26			36
Amnion Sıvısı	3	5		2	8
Plasenta	1	1		2	2
Fetal Kan		3			3
C) Göz bulgusu olanlar					
Venöz kan	1	2			3
Humör aköz	1				1
D) HIV pozitif olanlar					
Venöz kan	5	7			12
BOS	1	3	2		4
E) Organ nakli (kalp)					
		5			5
F) Organ nakli (kemik iliği)					
		1			1
Genel toplam	36	67	4	12	87
					103

Toxoplasma DNA' sını Toxoplasma P30 genine yönelik Primerlerin kullanıldığı "Nested PCR" ile çoğaltılmıştır. Dış Primerler ile önce 914 bazçiftlik bir parça, iç Primerlerin kullanılmasıyla da 522 baz çiftlik son ürün elde edilmiştir.

İmmün sistemi sağlam hastalara ait örneklerden hiç bir venöz kan örneği fareye inoküle edilmemiş PCR ile toplam 18 örnekten 9' u pozitif, 9' u ise negatif bulunmuştur. Bu hasta grubundan pozitif bulunan tüm hasta örneklerinin serolojik tetkikinde Toxoplasma' ya özgün antikorlar tespit edilmiştir (Tüm hastalarda DT, LAT pozitif, ayrıca 2 hastada ELISA ve ISAGA IgM, 1 hastada sadece ISAGA IgM pozitif bulunmuştur), PCR ile negatif olarak saptanan hastaların hepsi serolojik olarak Toxoplasmaya özgün antikorlar taşımalarına rağmen (Tüm hastalarda DT, LAT pozitif, sadece 1 hastada ISAGA IgM pozitif bulunmuştur). Bu gruptan hastalara ait lenf bezi örneklerinde 2 olguda inokülasyon pozitif sonuçlanırken, 7 olguda inokülasyonda bir üreme tespit edilememiştir. Tüm lenf bezi biopsileri inoküle edilen hastaların (biri hariç) serolojik olarak Toxoplasma' ya özgün antikorlar taşıdıkları görülmüştür (serolojik olarak pozitif bulunan olguları 7' si akut toxoplasmayı destekleyen DT ve LAT pozitif, ELISA ve ISAGA IgM pozitif bulunurken, 1hastada sadece DT ve LAT ile tespit edilebilen Kronik latent toxoplasmosis' i düşündürülen özgün antikorlara sahip olduğu görülmüştür. Bir hastada ise hiç bir Toxoplasma' ya özgün antikor saptanamamış ve PCR ile de negatif olarak bulunmuştur. İnokülasyon ile pozitif bulunan iki olgu PCR ile de pozitif sonuç vermiştir. İnokülasyon ile negatif sonuçlanan örneklerden 7'sinden 3 daha PCR ile pozitif bulunurken 4' ü negatif bulunmuştur. Nekrotik doku (iltihab) hem serolojik, hem inokülasyon, hem de PCR ile negatif sonuç vermiştir.

Anne adaylarına ait venöz kan örneklerinden hiç biri inoküle edilmemiştir, Tüm örneklerin serolojik olarak özgün Toxoplasma antikorları içerdikleri saptanmıştır (22 örnekte DT, LAT, ELISA IgM, ISAGA IgM pozitif, 14 örnekte DT, LAT, ISAGA IgM pozitif, ELISA IgM ise negatif olarak bulunmuştur). PCR ile 10 kan örneği pozitif (7'si serolojik olarak DT, LAT, ELISA IgM, ISAGA IgM pozitif , 3' ü ise DT, LAT, ISAGA IgM pozitif, ELISA IgM ise negatif olarak bulunmuştur), geri kalan örneklerde PCR ile Toxoplasma DNA' sına özgün baz çiftlerine rastlanılmamıştır. Anne venöz kan örnekleri ile beraber gönderilen amnion sıvısı örneklerinde (anne venöz kan serolojisi akut toxoplasmosisi destekleyen DT, LAT, ELISA IgM, ISAGA IgM pozitif olarak bulunmuş, amnion sıvıları konvensiyonel yöntemlerle araştırıldığında 4' ü DT ve LAT ile pozitif , 4' ü negatif olarak bulunmuştur, inokülasyon yapılan 2 amnion sıvısından da parazit

izole edilememiş, bunlar konvansiyonel yöntemlerle de negatif bulunmuştur, fakat bu örneklerden biri PCR ile pozitif (fetal kan örneği serolojik olarak Toxoplasmaya özgün antikor içermemektedir), biri de negatif olarak gözlemlenmiştir. Bu pozitifliğin ya amnion sıvısının alınması sırasında ya da PCR işlemlerin yürütülmesi sırasında oluşan bir kontaminasyona bağlı olduğu varsayılmıştır. İnokülasyon gerçekleştirilmeyen 6 amniyon sıvısı örneğinden ikisine ait anne venöz kan örnekleri ile amnion sıvısının konvansiyonel testler ile incelenmesinde özgün Toxoplasma antikorları tespit edilmiştir. Bu örneklerde PCR ile de Toxoplasma DNA' sını tespit edilmiştir.

Anne serolojileri pozitif olmasına karşın hem konvansiyonel hem de PCR yöntemleri ile negatif bulunan 4 örnekte bebeklerin konjenital enfeksiyon riski taşımayacağına kanaat getirilmiştir. Akut toxoplasmosis bulgularını serolojik olarak taşıyan gebelere ait 2 plasenta örneğinden gerçekleştirilen inokülasyonda parazit izole edilememiş, PCR ile 1 örnekte Toxoplasma DNA' sını tespit edilirken, bir örnekte özgün DNA çoğaltılamamıştır. İnokülasyon gerçekleştirilmeyen Fetal kan örneklerinde hem serolojik olarak, hem de PCR ile pozitif bulgu elde edilememiştir (olgulardan birine ait amniyon sıvısı örneği PCR ile pozitif bulunmuştur)

Göz şikayetleri ile gelen serolojik olarak DT, LAT, ELISA IgM, ISAGA IgM pozitif bulunan 3 hastanın (bir hastanın humör aköz örneği de incelenmiştir) PCR ile incelenmesinde humör aköz örneğinde ve aynı hastaya ait venöz kanda Toxoplasma DNA' sını tespit edilmiş, diğer hastalara ait örneklerde PCR ile negatif sonuç gözlemlenmiştir.

Reaktivasyon riski taşıyan 12 HIV pozitif olgunun venöz kan örneklerinde yapılan PCR araştırmasında 5 örnekte Toxoplasma DNA' sını çoğaltmak mümkün olurken, 7 örnekte negatif sonuç elde edilmiştir. 4 BOS örneğinden ikisi inoküle edilmiş ama parazit izole edilememiştir. Venöz kan örneklerinde PCR ile pozitif sonuç alınan hastalara ait 3 BOS örneğinden sadece birinde PCR ile pozitif sonuç alınmış, venöz kan örneğinde de PCR ile negatif sonuç alınan bir hastanın BOS örneğinde de PCR ile Toxoplasma DNA' sını çoğaltmak mümkün olamamıştır.

Kalp nakli olacak 4 ve kemik iliği nakli olacak 1 hastanın (serolojik olarak DT ve LAT pozitif) PCR ile incelenen örneklerinde negatif sonuç gözlemlenmiştir.

TARTIŞMA

Toxoplasmosis yaklaşık olarak 100 yıldan beri bilinen bir hastalık olmasına rağmen lenfadenopati, glandüler ateş gibi nispeten selim tablolar oluşturması ve daha ciddi seyreden konjenital enfeksiyon prevalansının yüksek olmaması nedeniyle yeterince ciddiye alınmamış, fakat 80'li yıllarla beraber AIDS, organ nakli ameliyatları ve kanser tedavisinin yaygınlaşması Toxoplasma gibi fırsatçı enfeksiyon ajanları ile yaşamları tehdit altında olan immün sistemi baskılanmış bir insan popülasyonu oluşturunca, konuyla ilgili uzmanlar hastalığın tanı ve tedavisinde daha yeni, hassas ve hızlı yöntemler araştırmaya başlamıştır.

Antikor arayan testler incelendiğinde kullanılan antijen tipine göreserolojik testlerin 2 ana grupta toplandıkları görülmüştür (19);

1- Antijen kaynağı olarak bütün parazit kullanılan testlerin (DT, DA, IFA gibi), organizma bütünlüğü korunduğu durumlarda immün sistemin oluşturacağı antijenik cevabın daha gerçeğe yakın olacağı düşünüldüğünden, serolojik cevabının araştırılmasında daha etkin olacağı iddia edilmiştir (19).

2- Antijen kaynağı olarak bütünlüğü bozulmuş parazit kullanılan testler (CF, ELISA, ISAGA, LAT, IHA gibi) (19).

Çalışmalarımızda “ altın standart “ olarak kabul edilen DYE TEST’ i kullandık, DT ile incelediğimiz 577 örnekten 344’ ü pozitif, 231’ i negatif bulunmuştur. Toxoplasma enfeksiyonlarındaki antikor cevabının erken dönemde membran antijenlerine, kronikleştikçe sitoplasmik antijenlere yönelmesi, doğal olarak enfeksiyonun erken dönemlerinde membran antijenlerine yönelik testlerde yüksek titreler elde edilirken, kronik enfeksiyonlarda sitoplasmik antijenlere yönelik testlerle yavaş yükselen ve uzun süre tespit edilebilen antikor titrelerin elde edileceği vurgulanmıştır (19).

Bu veriler ışığında bütünlüğü bozulmuş paraziti antijen kaynağı olarak kullanan LAT, ELISA ve ISAGA yöntemlerinden de faydalanılmıştır. DT ile LAT sonuçları arasındaki uyumsuz 45 sonucun değerlendirilmesi için de yine antijen kaynağı olarak bütün parazit kullanan DA testinden yararlanılmıştır (65).

Holliman ve arkadaşlarının bir çalışmasında 4450 serolojik analizde, özgün olmayan IgM varlığına bağlanan, 59 (% 1,3) uyumsuzluk gözlenmiş, bu iki test arasındaki uyumsuzlukların testler arası duyarlılık farkından kaynaklandığı da vurgulanmıştır. Desmont ve arkadaşları 3 aydan büyük her insanın serumunda doğal oluşan IgM antikorlarının düşük titrelerde DA testinde pozitifliklere neden olabileceğini, ama bunun test edilen serumların ancak % 2' sinde uyumsuz LAT sonuçlarına yol açabileceğini bildirmiş, yüksek konsantrasyonlarda Hepatitis B virüs " e " antijeni olan serumlarda, latex partiküllerinin hazırlanması sırasında kullanılan albumin ile " e " antijeni arasındaki çapraz reaksiyona bağlanan, serum 2-mercaptoethanol ile muamele edilse bile çapraz reaksiyonların etkilenmediği, yalancı pozitif LAT sonuçları gözlenmiş, Toxoplasma trofozoitinin polar bölgesine bağlanan Toxoplasma'ya özgün olmayan IgM varlığında düşük titrelerde LAT pozitifliği izlenebileceği bildirmiştir (54, 58, 67).

Wreighitt ve arkadaşları çalışmalarında yalancı pozitif LAT sonuçlarının IgM varlığına olduğu kadar eşlik eden CMV (Sitomegalo virüs) enfeksiyonları ile de ilişkisi olduğunu vurgulamış, nadiren de olsa bazı serumların latex ile reaksiyona giren antikorlar içermesi nedeniyle de agglütinasyonların görülebileceği hatırlatılmıştır (126).

Yalancı negatif sonuçların çok nadiren, yalancı pozitif sonuçların ise bazen görülebildiği, fakat negatif örnekleri pozitif örneklerden ayırımında yaygın olarak kullanılan Latex testine (1/16 üzeri dilusyonların referans laboratuvarlarına ileri tetkik için gönderilmesi tavsiye edilen), alternatif olarak hızlı sonuç veren Slide agglütinasyon testi (ToxocellTM) geliştirilmiş, bu testin Eiken Latex agglütinasyon testinden daha özgün (% 95,8 ve % 81), hemen hemen DA ile eşit özgünlükte (% 98), Eiken Latex agglütinasyon testinden biraz daha az (% 99, % 98,7), fakat DA testinden (% 96) daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (29, 43).

DA testinin Latex agglütinasyon testinden daha az duyarlı ama daha özgün olduğunu gösteren çalışmalar bu oranları doğrular niteliktedir (54, 58).

Bir başka çalışmada da DT sonuçları ile uyumlu olduğu bildirilen IHA testinin iyi kitle tarama yöntemi olacağı, 1/64 dilusyon ile başlanarak yalancı reaksiyonların önlenilebileceği (bu dilusyonda yalancı reaksiyon yaklaşık %2 olarak hesaplanmıştır), 1/ 256 ve üzerindeki dilusyonun ise hastalıkla yeni karşılaşmış olmanın göstergesi olarak kabul edilebileceği vurgulanmıştır (58).

Çalışmamızda 565 olguda bakılmış olan DT ve LAT sonuçları karşılaştırıldığında 45 (% 7,96) olguda uyumsuzluk gözlemlenmiş ve sonuçları doğrulamak için bu örneklerde Direkt Agglütinasyon testi çalışılmış, DT negatif, LAT pozitif bulunan 37 (% 82) olgudan, 36' sında (% 97,3) DA sonucu DT' i destekler nitelikte negatif, sadece 1 (% 2,7) olguda (41 yaşında, kadın transplantasyon hastası) LAT sonucunu destekler nitelikte pozitif olarak bulunmuş bu olgudaki DT negatifliğinin ya şahsın immün sisteminin Toxoplasma membran antijenini tanıyamamasına, sadece sitoplazmik antijenlerini tanınmasına, ya da antikorun Toxoplasma membranına bağlandığı halde komplemanı bağlayamadığı için DT' in negatif olmasına yol açtığına kanaat getirilmiştir.

DT pozitif, LAT negatif bulunan 6 (% 13) hasta örneğinde ise, DA testinin sonuçları DT' yi destekler nitelikte pozitif (% 100) bulunmuş, 2 (% 5) hasta örneğinden birinde DT 62 IU/ml, LAT 1/2000 iken DA 1/2048, diğerinde DT 4IU/ml, Latex 1/ 32 iken DA 1/ 32 bulunmuştur.

İmmüno blotting ile 6 kilodaltonluk bir antijenin ELISA ile tespit edilen anti-Toxoplasma IgM antikoruna ilişkin olduğu gösterilmiştir (94). Verhofstede ve ark. 6 ticari ELISA IgM kitini karşılaştırmış, indirekt ELISA ve antikor yakalayan ELISA' ların sonuçları arasında, ne de monoklonal veya poliklonal antikor kullanan ELISA testlerinin sonuçları arasında bir fark bildirilmemiş, düşük duyarlılık testlerdeki pozitif sonuçların enfeksiyonun o andaki durumu ile daha uyumlu sonuçlar vereceği onun için akut toxoplazmosis tanısında daha yararlı olacağı kanaatine varmışlar, fakat bireyler arası immün cevap farklılığından kaynaklanan az veya çok IgM üretimi olabileceği göz önünde bulundurulduğunda da düşük duyarlılık testleri ile düşük IgM cevabı vermiş bireylerde tanıyı koymakta güçlükler yaşanabileceği vurgulanmıştır (120).

Yalancı pozitif olguların varlığını Romatoid faktör ile olan interferansa bağlayan çalışmacılar, antiviral IgM' e bağlı yalancı pozitivite gözlemlememişler, DS-ELISA ile romatoid faktöre bağlı yalancı pozitif ELISA IgM ve IgG fazlalığına bağlı yalancı negatif IgM sonuçlarında azalma sağlandığı bildirilmiş, ISAGA ile IgM aranmasının ELISA' dan daha duyarlı ve özgünlükte ELISA' dan aşağı olmadığını, ELISA ile akut enfeksiyon sonrası yaklaşık 6 ay boyunca özgün IgM antikorları saptanabilirken, ISAGA ile olguların % 80' inde 12 ayı aşkın süre özgün IgM antikorları tespit etmenin mümkün olacağını daha duyarlı olması nedeniyle

AIDS gibi nedenlerle özgün IgM cevabının düşük olması beklenen olgularda ISAGA testinin kullanılması tavsiye etmişlerdir (5, 15, 55).

Holliman ve ark.da ISAGA' nın IFA ve ELISA' dan daha duyarlı olduğunu, Skinner ve ark. ISAGA ile akut enfeksiyon sonrası 18 aya kadar IgM tespit edebildiklerini, tek örnekle tanıya gitme zorunluluğu olan hastalarda tek testin yol açabileceği yalancı sonuçları engellemek için diğer testlerle kombine kullanılması gerekliliği vurgulanmış, uyumsuz ISAGA - ELISA sonuçlarında IgG düzeyinin yardımı ile karar vermenin doğru olacağı savunmuş, ISAGA IgM pozitif, ELISA IgM negatif bulunduğu anda, eğer yüksek değerlerde özgün IgG varlığı saptanmışsa bunun enfeksiyonun aylar önce geçirildiğini gösterdiği, özgün IgG saptanamamasının ise erken primer enfeksiyonu destekler nitelikte olduğu görüşünü benimsemişlerdir (55, 110).

Seroloji için gönderilen 580 örnekten 304 (% 52,4) ile hem ELISA hem de ISAGA IgM çalışılmış, serum miktarındaki yetersizlikten dolayı da 85 (% 14,65) hastaya sadece ISAGA IgM çalışılmış, 85 serum da negatif bulunduğu için yaklaşık 18 aylık bir süre pozitif kalan antikorları tespit edebilen bu testten sonra yaklaşık 6 aylık antikorları tespit edebilen ELISA IgM yöntemi için yeni örnek isteme ihtiyacı oluşmamıştır. 23 (% 7,6) olguda ELISA-IgM negatif, ISAGA-IgM pozitif, 16 olgu (% 5,3) ELISA-IgM şüpheli, ISAGA-IgM pozitif, 1 (% 0,3) olgu ELISA-IgM pozitif, ISAGA-IgM şüpheli, 40 (%13.2) olgu ELISA-IgM negatif, ISAGA-IgM şüpheli, 3 (% 1) olguda ise her iki testte şüpheli olarak yorumlanmıştır.

Hamilelik öncesinde toxoplasmosis geçiren annelerin dolaşımındaki antikorların, fetusu, enfeksiyona karşı kısmi de olsa koruyacağı bildirilmiştir (9).

Hamilelerin 87' sinde LAT ve DT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM sonuçları negatif bulunmuştur, olgular kronik latent toxoplasmosis olarak yorumlanmış, gebelikleri sırasında herhangi bir nedenle immün sistemleri baskılanmadığında sağlıklı bebek doğurabilecekleri anlatılmıştır.

Seronegatif hamilelere kedilerden uzak durmaları, kedi kaplarını temizlerken mutlaka eldiven kullanmaları, etleri iyi pişirerek yemeleri, kedi dışkısı ile kirlenme ihtimali olan meyva ve sebze yi iyice yıkadıktan sonra, mümkünse soyarak veya haşlayarak yemeleri, çiğ süt içmemeleri önerilmiştir (54).

Çalışmamızda 59 hamileye ait özgün Toxoplasma antikoru tespit edilememiş, enfeksiyonu gebelik esnasında geçirmenin riskleri kendilerine anlatıldıktan sonra enfeksiyondan korunma için gerekli eğitim verilmiştir.

Skinner ve ark. yaptıkları çalışmada düşük hikayesi olan kadınların hepsinde ISAGA ile IgM pozitif bulunmuş (110).

Çalışmamızda geçmişinde düşük hikayesi olan 7 gebeye ait örneklerde hiç bir özgün Toxoplasma antikoru tespit edilememiş, düşük nedeninin belirlenmesi amacıyla ileri tetkiki için klinisyeni ile görüşme yapmaları tavsiye edilmiştir. Geçmişinde düşük hikayesi olan 7 gebeye ait örneklerde ise LAT ve DT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM sonuçları negatif bulunmuştur, hem ISAGA, hem de ELISA ile IgM tespit edilemeyen gebelerin düşük nedenin Toxoplasma olmadığı, olguların kronik latent toxoplasmosis olguları olduğuna kanaat getirilmiştir.

Hamilelikte geçirilen akut toxoplasmosis' in en çok % 50' sinin fetusu etkilediği, plasenta hasarının olmadığı durumlarda bebek serumunda özgün IgM tespit edilmesinin konjenital enfeksiyon tanısı lehine olduğu fakat enfekte bebeklerin bile % 25'inde negatif özgün IgM sonuçları görüldüğü bildirilmiş, IgG gösteren testlerin en az 6 ay süreyle (genellikle 1 yıl kadar) dönemler halinde, pasif geçen IgG antikorlarının eliminasyonunu takip edebilmek için tekrarlanması önerilmiştir (15).

Hamilelik sırasında veya öncesi yakın dönemde akut akkiz toxoplasmosis serolojisi saptanan, dolayısıyla konjenital enfeksiyon riski taşıyan annelerden 22' sinin Toxoplasma enfeksiyonunu, serumlarında hem ELISA, hem de ISAGA ile özgün IgM saptanmasından dolayı 3-6 ay arası bir dönem içerisinde geçirdikleri, 14' ünün de ELISA IgM negatif, ISAGA IgM pozitif olarak bulunması ve önceden alınmış örneklerinin de paralel çalışılması sonucu 6-18 ay arası bir dönem içerisinde geçirdiği kanaatine varılmış, çocuklarına ait 33 örnekte LAT ve DT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM ve ISAGA testi ile de IgA sonuçları negatif bulunmuş, olguların 1 yıl süre ile ikişer aylık periodlarla serolojik kontrollerinin tekrarlanmasına karar verilmiştir. Özgün toxoplasma antikorlarının serolojik olarak tespit edilememesinin toxoplasmosis riskinin olmadığı gösterdiği için konjenital enfeksiyon riski taşıyan annelerin çocuklarına ait 3 örnekte Toxoplasma' ya özgün antikor saptanamadığı için bu olgular takibe alınmamıştır.

Soliter organ alıcıları seropozitif ise veya alıcı verici serolojik olarak uyumsuz değilse toxoplasmosis riski olmadığı bildirilmiştir (112).

Çalışmamızda 70 hasta örneğinde Toxoplasma' ya özgün antikor tespit edilememiş, dolayısıyla bu hastalarda ileri çalışma planlanmamıştır.

Speirs ve ark. çalışmalarında 151 kalp, 39 karaciğer ve 100 böbrek nakli alıcısında serolojik olarak T. gondii açısından sırasıyla (% 14,5), (% 13,2), (% 20) uyumsuzluk saptamış ve seronegatif alıcının seropozitif bir organdan primer toxoplasmosis' e yakalanma oranını kalp transplantasyonunda % 57, karaciğer transplantasyonunda % 20 olarak bulmuş, böbrek transplantasyonlarında ise donör kaynaklı toxoplasmosis tespit edememiş, gerekçe olarak da parazitin kas dokusu içinde kistleşme eğiliminde olduğunu, transplante edilecek organın içerdiği kas dokusu miktarına bağlı olarak riskin yükseleceğini bildirmişlerdir (112).

Wreghitt ve ark. transplantasyon öncesi seropozitif bulunan 75 hastadan 3' ünde (% 4) LAT, DT ve IHA ile anlamlı bir yükselme tespit etmiş bunu alevlenme olarak yorumlamışlardır (126),

Transplantasyon öncesi seropozitif bulunan hastalarda reaktivasyona sık rastlandığı, seronegatif alıcının seropozitif bir organdan primer toxoplasmosis' e yaklanmasının fatal sonlanabileceği, donörün durumundan bağımsız olarak seropozitif kalp nakli alıcılarının az- ya da hiç risk taşımadıkları, alıcının seronegatif, donörün seropozitif olduğu durumlarda riskin çok yüksek olduğunu yayınlanmıştır (56, 76, 83,112, 126).

O'driscoll ve ark. tüm dünyadan kemik iliği (KI) nakline bağlı 25 toxoplasmosis olgusu bildirildiğini, tüm çalışmalara bakıldığında KI nakline bağlı ciddi toxoplasmosis insidansının % 0,8 olduğunu vurgulamış, olguların genellikle sekonder reaktivasyon şeklinde geliştiğinden dolayı sadece seropozitivitesi Fransa gibi yüksek toplumlarda serolojik taramanın uygun olacağını bildirmiştir (88).

Çalışmamızda soliter organ ve kemik iliği nakli yapılacak hastaların 52 tanesinde Toxoplasma' ya özgün antikorlar DT ve LAT ile tespit edilmiş, akut enfeksiyon göstergesi olarak kabul edilen özgün IgM antikorları ELISA ve ISAGA ile saptanmamıştır.17 olguda ise serolojik uyumsuzluk söz konusu olduğu için profilaktik özgün antibiyoterapi önerilmiş (pyrimethamine 25mg/ gün + folinic asid

5mg/ haftada 2 kez / 6 hafta), post operatif dönemde bu olguların hiç birinde toxoplasmosis bulgusuna rastlanılmamıştır. Seronegatif vericilerden organ alan seronegatif alıcılarda haftada bir 2 ay boyunca primer enfeksiyon açısından tetkik edilmiştir. Bu gruptaki hastalarda da toxoplasmosis bulgusu saptanmamıştır. Bulgularımız Holliman ve ark. bulguları ile uyumluluk göstermektedir.

T. gondii ookisti çıkardığı bilinen tek hayvan türünün kedigiller olduğu, ve ev kedilerinin ayrı bir önemi olduğu vurgulanmış, A. B. D.' de 3957 kedinin % 30' unda, dünyanın çeşitli bölgelerindeki 12688 kedinin % 37, 6' sında T. gondii antikorlarına rastlanılmış, 6 aydan büyük kedilerdeki antikor miktarının 6 aydan küçüklere göre 4-6 kat daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (111).

Çalışmamızda çeşitli nedenlerle (hamilelik, merak, hayvanlarla ilgili işlerde çalışma gibi) başvuran hastalardan kedi besleyenlerin 5' inde akut (DT, LAT, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM pozitif), 18' inde kronik toxoplasmosis (DT ve LAT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM negatif) teşhisleri konulmuş, 8 kişide ise Toxoplasma' ya özgün antikor tespit edilememiştir.

Akut akkiz toxoplasmosis' te karaciğer fonksiyonlarının bozulduğu, karaciğer fonksiyon testleri bozuk hastalarda IFA ve DS-ELISA ile özgün Toxoplasma IgM saptadığı bildirilmiş, fakat Toxoplasma' nın karaciğerde ne sıklıkla patoloji oluşturduğu ve mekanizması açıklık kazanmamıştır (80).

Karaciğer Fonksiyon Testleri bozuk olan hastaların örneklerinden 4' ünde DT ve LAT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM negatif bulunduğu için hastaların etken ile 18 aydan önce karşılaşmış olabileceği, dolayısıyla şu andaki şikayetlerinin Toxoplasma' ya bağlı olamayacağı, ileri biokimyasal ve radyolojik tetkiklerin gerekliliğine kanaat getirilirken, 3 olgunun serumunda Toxoplasma' ya özgün antikor tespit edilemediğinden karaciğer fonksiyon testlerindeki bozukluğun kesinlikle toxoplasmosis' e bağlı olmadığı kanısına varılmıştır

Couvreur ve Desmont yaptıkları çalışmada 225 neonatal ikter olgusunda % 2,2 konjenital toxoplasmosis saptadıklarını ve bu hastalarda ikterin aylarca sürdüğünü bildirmişlerdir (99).

Çalışmamızda klinik olarak sarılığı olan 3 hasta örneğinde kronik latent toxoplasmosis' i destekleyen (DT ve LAT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile

IgM negatif) serolojik değerler elde edilmiş, bu değerlerin akut sarılığı açıklar nitelikte olmadığına karar verilmiştir. 6 sarılıklı hastada Toxoplasma' ya özgün antikor tespit edilemediği için sarılığın toxoplasmosis dışı bir nedene bağlı olduğuna kesinlikle kanaat getirilmiştir.

Gross ve ark. alışmasında HIV-pozitif olguların % 3-40 kadarının, çoğunluğu Toxoplasma kist reaktivasyonuna bağlı, toxoplasmik ensefalit geçirdiği bildirilmiş, klinik ve radyolojik olarak ensefalit teşhisi ile gelen HIV pozitif hastalara ait 4 serumun DT, LAT, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM pozitif olduğu görülmüş ve olguların özgün tedavi sonrası radyolojik ve klinik olarak iyileşme göstermesi zerine Toxoplasmik ensefalit olarak değerlendirilmiştir (40, 41),

Holliman ve ark. toxoplasmosis seropozitivitesi olan 20 AIDS hastasına ait örneklerde DT, LAT, DS-ELISA IgM ve ISAGA IgM, PCR ve insan embrionik akciğer hücre serilerine ekim geekleştirmiş, serebral toxoplasmosis tanısını koymakta güçlüklerle karşılaştıklarını, histolojik örneklerin her zaman sağlanamadığı için tanıya çoğunlukla uygun klinik, radyolojik bulgular ve seroloji sonuçları ile gittiklerini, tanılarının da özgün tedaviye verilen klinik ve radyolojik iyileşme ile desteklendiğini vurgulamış, AIDS' li hastalarda materyal az ise daha duyarlı olduğu gözlemledikleri ISAGA IgM testinin uygulanmasının yeterli olacağını nkn bazı sekonder reaktivasyona bağlı serebral toxoplasmosis olgularında düşük oranlarda zgn IgM artışı olabileceğini, olgularının % 50' sinde IgM saptayamadıklarını, tanıda IgM saptanmadığında serebral toxoplasmosis tanısından uzaklaşılamıyacağını, yer kaplayan oluşum bulgusu nedeniyle BOS örneğinin incelenemediğini, ayrıca klinik değerinde çok fazla olmadığını işaret etmiş, AIDS' li haslarda tarama amacıyla yapılacak LAT' nin özgünlüğü artırmak amacıyla 1/128 sulandırımından, bu titrasyonda pozitif bulunan hiç bir serum DT ile negatif bulunmadığı için, başlamasının uygun olacağını bildirmiş, İngiltere' deki HIV-pozitif hastaların % 27' sinin sekonder reaktivasyona bağlı serebral toxoplasmosis riski taşıdığını, % 0,5- 1 kadarının da primer toxoplasmosis' ten etkilendiğini bildirmiştir (49, 51, 52, 53).

Pozitif Toxoplasma serolojisi olan AIDS' lilerde santral sinir sistemi enfeksiyonu geçirme riski bazı trlere görede % 6-12 ve % 30 olarak verilmiş, reaktivasyon riski taşıyan AIDS' li hastalara ömürboyu supresyon tedavisi önerilmiştir (90, 113).

Suzuki ve ark. çalışmalarında formalin ve aseton ile fikse edilmiş organizmaların agglütinasyon testinde kullanılması ile toxoplasmik ensefalitli AIDS' lilerin % 70-80' ninde tanı koyduklarını yayınlamış, Suzuki ve Remington yaptıkları çalışmada Formalin ile fikse edilmiş Toxoplasma trofozoitlerinin kullanıldığı DA testinde TE' i olan AIDS'li hastalarda TE' i olmayan AIDS' lilere göre anlamlı olarak daha yüksek titreler tespit edildiği bildirmiştir (113, 114).

Çalışmamızda HIV-pozitif veya AIDS tanısı almış 39 hasta örneğinde Toxoplasma' ya özgün antikor tespit edilemediği için reaktivasyon şüphesi görülmemiş, hastalara primer akut enfeksiyondan sakınmaları için gerekli önerilerde bulunulmuş, 52 olguda ise DT ve LAT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM negatif bulunduğu için reaktivasyon riski taşıdıkları kanaatine varılmıştır. Yapılan araştırmalarda CD₄ düzeyi düşük bulunan 3 olguda kronik latent toxoplasmosis' i destekleyen (DT ve LAT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM negatif) serolojik değerler elde edilirken, 1 hastada Toxoplasma' ya özgün antikor tespit edilememiştir.

Wong ve ark. çalışmalarında homoseksüeller ve damardan ilaç kullanan 269 hastalardan 7' sinde santral sinir toxoplasmosis' i teşhis etmişlerdir (125).

Bu veriler ışığında risk grubundan olan homoseksüel bir erkek hasta kuşku üzerine başvurmuş, ama Toxoplasma' ya özgün antikor tespit edilememiş, hastaya rutin bulaş yöntemlerinden korunma eğitimi verilmiş, önemli bir risk grubunda olduğu hatırlatılmıştır.

Jones ve ark. akkiz toxoplasmosis tanısı koydukları hastalarının % 40' ında kırıklık hissi ve halsizlik, % 37' sinde değişik oranlarda ateş tespit etmiş tanuların lenf bezi biopsisi ile değil, serolojik olarak konulduğu bildirilmiş, akkiz toxoplasmosis' te adele ve eklem hastalıklarının nadir de olsa tabloya eşlik ettiğini, polimyozit ve dermatomyozit olgularının da görülebileceğini, açıklanamayan LAP veya özgün olmayan hastalık şikayetleri olan her kadında toxoplasmosis' ten şüphelenilip araştırma yapılması önermişlerdir (80).

Kronik yorgunluk şikayetleri olan 4 hastada Toxoplasma' ya özgün antikor tespit edilemezken, 6 olguya kronik latent toxoplasmosis (DT, LAT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM negatif) teşhisi konulmuş, bu tip bulguların akut toxoplasmosis' de görülebileceği, hastaların şu andaki serolojik bulgularının akut

toxoplasmosis' i destekler nitelikte olmaması nedeniyle ileri tetkik için klinisyenleri ile görüşmeleri önerilmiştir.

McCabe ve ark. çalışmalarında yer verdikleri araştırmacıların aşağıdaki sonuçlarını yayınlamıştır. Bunlara göre Jones ve arkadaşları serolojik olarak akut akkiz toxoplasmosis teşhisi konan olguların % 97' sinde servikal, % 25 aksiller ve bir hasta da hiler LAP, Raffaty hastaların % 82' sinde servikal, % 35' inde aksiller, % 18' inde inguinal, % 8' inde göğüs duvarında LAP, Saxen ve ark. ise baş-boyun bölgesinde LAP yüzdesini 91 olarak vermiş, klinik olarak belirgin LAP şikayetlerinin % 3 ile % 7' sinden Toxoplama' yı sorumlu tutmuş, DT veya Toxoplasma IgG araştıran, DT ile uyumlu bir testte negatif olarak bulunan şahıslarda toxoplasmosis teşhisinin düşünölemeyeceğı vurgulanmıştır (80).

Çalışmamızda lenfadenopati şikayetleri olan 14 olgu örneğinde DT, LAT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM negatif bulunmuş olgular kronik latent toxoplasmosis olarak kabul edilmiş, 10 olgu DT, LAT, ELISA IgM ve ISAGA IgM pozitif bulunduğu için akut toxoplasmosis tanısını almış, 13 örnekte ise Toxoplasma' ya özgün antikor tespit edilemediğı için lenfadenopati şikayetinin toxoplasmosis harici bir nedene bağı olduğuna karar verilmiştir.

Toxoplasmosis olgularının % 90' a yakın kısmının asemptomatik seyrettiğı yayınlanmıştır (73).

Toxoplasmosis şüphesi duyan, sadece merak amacıyla gelen 5 hastada da Toxoplasma' ya özgün antikor aranmış, fakat tespit edilememiş, şahıslara primer toxoplasmosis' ten korunma yolları anlatılmış ve kadınlara hamilelik öncesi tekrar kontrole gelmeleri önerilmiştir.

Posterior üvetilerin % 30-50' sinden sorumlu tutulan toxoplamosis' in tanısında serolojik testlerin yanı sıra ön kamera ponksiyonu (ACP) ile lokal özgün Ab araştırılması önerilmiş, periferik dolaşımdaki özgün AB' ların ölçülmesinin tanı açısından belirli güçlölklere neden olduğü, standart testler ile IgM testpitinin çok nadir olacağı bildirilmiştir (2, 78).

Hastaların tümünde özgün IgG Ab' ları bulunmasına rağmen normal popülasyondaki çok yüksek prevalans (% 90) özgünlük açısından şüphelere sebep olduğü, retinal hastalığı olanlarda özgün-Toxoplasma antikorlarını % 54, kontrol

grubunda ise % 22 bulunduğu, Toxoplasma seropozitif olan 40 retinal hastalıklı kişiden 12' si sadece ISAGA ile, bir olgu ise hem ISAGA, hem de DS-ELISA ile IgM pozitif bulunmuş, kontrol grubunda sadece iki olgu ISAGA ile, 1 olgu ise hem ISAGA, hem de DS-ELISA ile IgM pozitif olarak değerlendirilmiştir (60).

DT, sulandırılmamıř serumlardaki yůksek ۆzgۆnlűđű ispatlandıđı, yalancı pozitif reaksiyonların çok nadir olduđu, imműn sistemi sađlamalarda yalancı negatiflik bildirilmediđi için gűvenilir kabul edilmiř, hastalarda retinal lezyon olsa bile DT negatif ise Toxoplasma gondii etken olarak dűřűnűlmemiř, ۆzgűn IgM' in DS-ELISA ile ortalama 8, ISAGA ile 18 ay sűreyle pozitif olarak saptandıđı bildirildiđinden, kontrol grubundaki IgM pozitif olguları, IgG serokonversiyon oranı % 0,6 olduđu hesaplandıđından, 202 olgudan 1 olguda DS-ELISA IgM, 3 olguda da ISAGA IgM pozitif saptanmasının normal olarak beklendiđi vurgulanmıř, yůksek ISAGA pozitivitesi, alevlenmelerde ancak ISAGA gibi duyarlılık ve ۆzgۆnlűđű yůksek testler ile saptanabilecek kadar az olması ile açıklanmıřtır (62).

Çeřitli gűz bulguları ile gelen hastalardan 10' unda kronik latent toxoplasmosis'i destekleyen (DT, LAT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM negatif) serolojik deđerler elde edilirken, 3' űnde akut toxoplasmosis' i dűřűndűren (DT, LAT, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM pozitif) serolojik deđerlere rastlanmıř, 6 hastada da ise Toxoplasma' ya ۆzgűn antikor tespit edilememiřtir.

McCabe ve ark. alıntı yaptığı Remington ve ark. kolej ۆđrencileri ile ilgili bir çalışmasında akut toxoplasmosis tanısı konulan hastalarda Enfeksiyűz mononűkleoz, rubella, viral farenjit, akut tonsillit ve influenza benzeri hastalıklara rastladıkları bildirmişlerdir (80).

Çalışmamızda çeşitli viral enfeksiyonların seyri sırasında eşlik edebilecek toxoplasmosis açısından tetkik edilen 7 ۆrneđin 5' inde kronik latent toxoplasmosis' i destekleyen (DT ve LAT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM negatif) serolojik değerler elde edilirken, 2 olguda Toxoplasmaya ۆzgűn antikor tespit edilememiştir, akut toxoplasmosis serolojisi saptanamadığı için şikayetlerin toxoplasma ile ilgisi olmadığına karar verilmiştir.

Patel ve ark. fetal anomali saptanan olgularda özgün IgA ölçümünün enfekte hastaların değerlendirilmesinde değerli olduğu, pasif olarak geçen IgG' nin 6 ay kadar devamlılık gösterdiği ve özgün IgM aranmasının relatif olarak duyarsız olduğu hatta IgM tespit edilememesinin konjenital enfeksiyon riskini ortadan kaldırmayacağı bildirmiştir (89).

Hamilelik seyri esnasında Ultrasonografik olarak fetal anomali (böbrek kalsifikasyonu, ventrikülomegali, serebral kalsifikasyon, hidrosefali, intrauterin gelişme geriliği gibi) tespit edilen hastaların kordon kanı analizlerinde IgM sınıfı antikorlar tespit edilemezken, 3 örnekte sadece DT, 5 örnekte hem DT hem de LAT, 1 örnekte DT, LAT ve ISAGA IgA pozitif bulunmuş, 2 olguda ise Toxoplasma' ya özgün antikor tespit edilememiştir.

Akut toxoplamosis' te abdominal LAP' ye bağlı üst abdominal ağrı bildirilmiştir (80). Bizde çalışmamızda üst abdominal ağrı şüphesi ile başvuran 1 hastada DT ve LAT pozitif, ELISA IgM ve ISAGA IgM negatif sonuçlarını elde edilmiş, sonuçların kronik latent toxoplamosis lehine olması nedeniyle olgu abdominal toxoplamosis vakası olarak yorumlanmamıştır.

İmmün sistemi sağlamlarda pulmoner toxoplamosis' in ölüme neden olmadığı, immün sistemi baskılanmışlarda ise % 40 ölüme neden olduğu bildirilmiştir (80, 93).

Özellikle AIDS ile ortaya çıkan PCP, kendisi gibi fırsatçı parazit olan T. gondii' ye de zemin oluşturacağı için, PCP teşhisi almış 3 olgu değerlendirmeye alınmış, serolojik incelenme sonunda özgün toxoplasma antikorlarına rastlanılmamıştır. Seronegatif olan hasta immün durumu göz önüne alınarak rutin Toxoplasma bulaş yolları ile ilgili olarak bilgilendirilmiştir. Serokonversiyon veya özgün IgM tespit edilmeyen olgular dışında, sadece bir defa IgG saptanmış olgularda toxoplamosis teşhisini destekleyen başka klinik bulgular yoksa, olguların pulmoner toxoplamosis olarak değerlendirilemeyeceği bildirildiğinden, olgular kontrole alınmamıştır.

Oregon' da yapılan bir çalışmanın sonucuna göre her 200 gebelikten birinin gebelik seyri sırasında akut toxoplamosis ile karşılaştığı bildirilmiştir (6).

Hamilelik öncesi tarama amacıyla serum örnekleri gönderilen 17 olgudan 12' sine ait örneklerde DT ve LAT ile pozitif sonuçlar alınmış, serumlarında Toxoplasma' ya özgün IgM sınıfı antikor tespit edilememiş, akut enfeksiyon geçirmedikleri kanaatine varılan olgular kronik latent toxoplasmosis olarak değerlendirilip, mevcut antikor düzeyinin hamilelik söz konusu olduğunda fetusu koruyucu nitelikte olduğu kadınlara anlatılmıştır. Hamile kaldıklarında veya her hangi bir nedenle immün sistemlerinin baskılanması gerekliliği doğduğunda ileri tetkikler için tekrar başvurmaları öğütlenmiştir. 5 olgunun serumlarında ise hiç bir sınıftan özgün Toxoplasma antikorlarına rastlanılmadığı için şahıslara Toxoplasma bulaş yollarından korunma eğitimi verilmiştir.

Toxoplasmosis tanısında fare inokülasyonunun duyarlılığı % 53, amniyon sıvısından yapılacak PCR' in duyarlılığı ve özgünlüğü % 100 olduğu vurgulanmıştır (78).

İnokülasyon için gönderilen 16 örnek (2 BOS, 9 lenf bezi biopsisi, 2 plasenta örneği, 1 nekrotik doku, 2 amnion sıvısı) MF1 cinsi beyaz farelere üsülüne uygun olarak inoküle edilmiş ve sadece 2 lenf bezi örneğinden yapılan inokülasyonda pozitif sonuç alınmıştır. Doku örneklerinin eşlik eden serumlarında ve BOS, amnion sıvısı örnekleri üzerinde yapılan serolojik testlerde 9 örnekte kronik toxoplasmosis'i destekleyen serolojik bulgular elde edilirken (DT ve LAT pozitif, ELISA ve ISAGA testleri ile IgM negatif), 3 örnekte akut toxoplasmosis' i destekleyen (DT, LAT , ELISA IgM ve ISAGA IgM pozitif) sonuçlar alınmış, 4 olguda ise özgün toxoplasma antikorlarına rastlanılmamıştır

Savva ve ark. çalışmalarında PCR kullanarak T. gondii' nin vücut dokuları ve sıvılarında saptanabileceğini göstermişler, Cazenave ve ark. 80 amnion sıvısından kültür ile 4, fetal kan örneklerinden 8 pozitif olgu saptayabilmişken PCR ile 10 olgu saptadıklarını ve bu iki olgunun doğumdan sonra da kesinlik kazanması ile PCR' in üstünlüğün gözlemlendiğini bildirmiş, diğer 70 olgu prenatal serolojik testlerle uyumlu olarak negatif bulunmuştur (14, 102).

Gross ve ark. serolojik ve klinik olarak toxoplasmosis tanısı almış 52 hasta örneğinin 10' unda PCR ile pozitif sonuçlar elde etmişlerdir, bunlardan biri yenidoğan, 5' i HIV-pozitif hasta, 4' ü de akut toxoplasmosis serolojisi olan LAP' li erişkinler olup fare inokülasyonunda yenidoğan ve bir HIV-pozitif hasta örneği hariç hepsi pozitif sonuç aldıklarını bildirmiş, Gross ve ark. bir başka

çalışmalarında, PCR ile pozitif buldukları örneklerden inokülasyonda başarısız olmalarını, antikor ile kaplı Toxoplasma hücrelerinin makrofajlarca fagosite edilip öldürülmelerine ve bunun sonucunda da isole edilememelerine bağlamışlar, konvansiyonel testler ile tanıdaki yanlışlığı azaltmak içinde uygun örnek kullanımını (serebral toxoplasmosis olgularında BOS), birden çok testin kombine edilmesini (immünoblott dahil), en az iki suş T. gondii kullanılmasını ve klinik örnekte T. gondii varlığının direkt göstergesi olan PCR kullanımını önermiştir (40, 41).

Holliman ve ark. başlangıçta DT ve LAT pozitif , DA-ELISA ve ISAGA IgM negatif, sonradan DS-ELISA IgM negatif, ISAGA IgM pozitif buldukları HIV-pozitif bir hastanın beyin biopsisinde PCR ile T. gondii' ye özgün DNA saptadıklarını bildirmiştir (59).

Burg ve ark. özellikle AIDS gibi erken tanı ile tedaviye bir an önce başlanmanın zorunluğu olduğu hallerde PCR ile T. gondii' nin B1 genini çoğaltılmasının tanıya çok yardımcı olduğunu bildirmiş, Holliman ve ark. benzer çalışmayı P30 geni ile gerçekleştirmiş bu genin PCR ile çoğaltılmasının AIDS' li hastaların tanısında yeri olduğunu vurgulamıştır (11, 59).

Grover ve ark. 43 akut maternal toxoplasmosis olgusunda fetal kan örneklerinde özgün IgM aranması ile 10 olgudan 3, amnion sıvısının hücre kültürüne inokülasyonu ile 4, fare inokülasyonu ile 7 pozitif olguyu saptayabildikleri halde, PCR ile 5 olgunun 5' inde de saptamışlar ve prenatal tanıda PCR' ın çok önemli bir yöntem olduğunu vurgulamışlardır (42).

Holliman ve ark. immün sistemi sağlam hasta örneklerinde venöz kanda 2 pozitif hayvan inokülasyonu 3 pozitif PCR (sadece biri inokülasyon ile uyumlu), lenf bezi ve serebral iltihap örneklerini ise inokülasyon ile negatif PCR ile pozitif bulmuş amnion örneklerinden ikisini inokülasyon, üçünü PCR ile pozitif (sadece bir olgu hem PCR hem de inokülasyon ile pozitif) bulunmuşken, fetal kan örneklerinden de inokülasyon ile 2, PCR ile 2 pozitif sonuç alınmıştır (sadece bir olgu hem PCR hem de inokülasyon ile pozitif) aynı durum plasenta örneklerinde tespit edilmiş, fetal dokularda ise 3 pozitif PCR sonucuna karşılık 1 pozitif inokülasyon gözlenmiş (bu olgu PCR ile de pozitif bulunmuştur), PCR ile pozitif buldukları 55 olgudan izolasyon ile pozitif sonuç elde edememelerini PCR' ın daha duyarlı olmasına bağlarken, PCR ile elde ettikleri yalancı negatif sonuçları DNA

örneklerinin hazırlanırken yapılan hata sonucu Taq DNA polimerazı inhibe edecek maddeleri içermesine bağlamıştır (53, 59).

Holliman ve ark. kalp nakli alıcılarında PCR ile yaptıkları araştırmada histolojik olarak ancak 2 olguda *T. gondii* gördükleri halde 8 örnekte PCR ile pozitif sonuç almışlar, PCR ile tek bir *Toxoplasma*'yı tespit edebilmenin mümkün olduğunun gösterilmesi (MacPherson ve Gajadhar PCR ile bir *Toxoplasma*'ya eşit olan 0,1pg *Toxoplasma* DNA' sını saptayabildiklerini bildirmişler) , *Toxoplasma* içermediği bilinen kontrollerin PCR ile negatif bulunması PCR ile kontaminasyona bağlı yalancı pozitif sonuçlar elde etmiş olabilecekleri olasılığını ortadan kaldırdığını vurgulamışlardır (61,66)

Van de Ven ve ark.' da PCR ile beyin dokusu, BOS, kalp ve iskelet kasında, Aouizerate ve ark. PCR ile % 33,8 olguda aköz hüümörde *T. gondii*' yi göstermişler, Ho-Yen ve ark. insan kan örneklerinde PCR' ın güvenilir bir tanı yöntemi olduğunu hatta serolojik olarak IgM inatçı pozitif olgularda PCR negatif ise fötusun risk altında olmadığı kanaatine varmışlardır (2, .46, 119).

Çalışmamızda İnokülasyon için gönderilen 16 örneğin dışında annelerinin serumunda özgün *Toxoplasma* IgM tespit edilen 36 bebek kanı, bu annelere ait örnekler, ultrasonografik olarak fetal anomali saptanmış fetuslara ait 11 örnek, organ nakli sonrası gelen 6 hastaya ait örnek, göz şikayeti olan hastalara ait 4 örnek, lenfadenopati şikayeti olan hastalar ait 12 örnek ile HIV pozitif olgulardan alınan 14 örnekte PCR çalışılmıştır. Serolojik olarak negatif sonuçların alındığı 5 hastanın kanı da incelenmeye dahil edilmiştir. İmmün sistemi sağlam hastalara ait örneklerden PCR ile toplam 18 örnekten 9' u pozitif, 9' u ise negatif bulunmuştur. Bu hasta grubundan pozitif bulunan tüm hasta örneklerinin serolojik tetkikinde *Toxoplasma*'ya özgün antikorlar tespit edilmi, tüm hastalarda DT, LAT pozitif, 2 hastada ELISA ve ISAGA IgM, 1 hastada sadece ISAGA IgM pozitif bulunmuştur. PCR ile negatif olarak saptanan hastaların hepsi serolojik olarak *Toxoplasma*'ya özgün antikorlar taşımalarına rağmen,hastaların tümü DT, LAT pozitif, sadece 1 hastada ISAGA IgM pozitif bulunmuştur.

SONUÇ

Toxoplasmosis gibi gerek ekonomik, gerek sosyal açıdan giderek artan öneme sahip sağlık sorununa yaklaşım, özellikle immün sistemi baskılanmış şahıslardaki ölümcül kliniği göz önüne alınca, tanı maliyetinin geri planlara itilmesini gerekli kılmaktadır. Ülkemizde, hijyenik şartların dünya standartlarının altında olması, başboş kedilerin varlığı bu parazitozun çok ciddi bir potansiyeli olduğunu düşürdüremekte, Toxoplasmosis tanısında bir standart saptanmamış olması problemi daha da zorlaştırmaktadır. Serbest çalışan uzmanların tarama amacıyla LAT gibi uygulaması kolay ve tehlikesiz bir testi kullanması, seropozitif olguların ileri tetkiklerinin üniversite veya devlet hastaneleri bünyelerinde kurulacak dünya standartlarına uygun referans birimlerinde DT, DS-ELISA, ISAGA, PCR, WESTERN BLOT gibi duyarlılığı ve özgünlüğü yüksek testlerle değerlendirilmesi ile bu fırsatçı enfeksiyonla mücadelede hastalara daha çok yardımcı olunacağı sonucuna varılmıştır.

ÖZET

İngiltere' deki 3 Toxoplasma referans merkezinden biri olan St.George' s Hastanesi bünyesindeki laboratuvara 17 Kasım 1993 - 14 Şubat 1994 tarihleri arasında gelen hastalara ait 596 örnekte çeşitli serolojik yöntemler ve PCR uygulanmıştır. İnokulasyon için gelen örnekler inaktivasyon uygulanmamıştır ve hiç bir HIV-pozitif olguya ait örnek inokule edilmemiştir. İnokulasyon için gelen örnekler en kısa zamanda inoküle edilmiştir.

Gelen her hasta örneğine önce Dye test (DT) ve Latex testleri (LAT) çalışılmış, iki test arasında uyumsuzluklarda Direkt Agglütinasyon (DA) testi doğrulama testi olarak kullanılmıştır. DT > 31 İÜ tüm örneklerde ve her hangi bir DT değeri tespit edilmiş transplantasyon alıcılarına ait örneklerde tek çukur ISAGA ile IgM taraması yapılmıştır. Her hangi bir DT değeri olan korioretinitli hastalara, konjenital enfeksiyon riski olan Anne/bebek çiftlerine, özgün IgG değeri tespit edilmiş hamilelere, DT ≥ 1000 İÜ örneklere, gebelik öncesi tarama yapılacak tüm örneklere üç çukur ISAGA ve ELISA ile IgM araştırması gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca DT pozitif olan 1 yaş ve altındaki tüm bebeklerde IgM yanısıra IgA da araştırılmıştır.

ISAGA ve ELISA yöntemleri ile IgM pozitif bulunan örneklerde hastalığın başlangıç tarihi ile ilgili değerlendirme yapmakta yardımcı olan ELISA IgG yöntemi ile AVIDİTE bakılmıştır.

Sonuçların değerlendirilmesi ile LAT ve DT sonuçlarının oldukça uyumlu olduğu, pozitif LAT sonucu saptanan olgularda DT, DS-ELISA, ISAGA, yapılabiliyorsa PCR ile ileri araştırmaların yapılmasının uygun olacağı, LAT' nin her laboratuvarında uygulanabilecek etkili bir tarama yöntemi olduğu, pozitif olguların referans birimlerinde Dye test ve DS-ELISA yöntemlerinin yanı sıra yardımcı testlerle (LAT, DA, IFA, ISAGA) desteklemesinin, referans merkezlerinin tanıda kullanılan yenilikleri (PCR, İmmunoblot, Western blot gibi) uygulayabilmesinin toxoplasmosis' in çağdaş tanısına katkıda bulunacağı kanısına varılmıştır.

SUMMARY

Five hundred and ninety six specimens from patients, whom attended St. George's hospital Toxoplasma Reference unit between 17th November 1993 - 14th February 1994, were evaluated by serological tests, by PCR and by mice inoculation. Specimens for inoculation were not only inactivated but also not inoculated if belong to HIV-positive patients.

Initially, DT and LAT were performed for each specimen, when discrepant results were seen DA has been performed for correction. One well ISAGA IgM screening was performed for any specimen with DT > 31 IU and specimens of transplant recipients with any DT titer. Three well ISAGA IgM and ELISA IgM were performed for specimens of patients with chorioretinitis with any DT titer, specimens of mother/ baby couples with the risk of congenital infection, specimens of pregnant women with specific toxoplasma IgG, any specimen with DT \geq 1000 IU, specimens for prepregnancy screening.

Avidity was searched by ELISA IgG on specimens with positive ISAGA IgM and ELISA IgM serology.

ISAGA IgA was also performed on specimens of infants, under the age of 1 year, with any DT titer.

After evaluating the results, it was observed that LAT gave very similar results with DT, but further assessment of positive cases should be performed by DT, DS-ELISA, ISAGA and, if available, PCR is beneficial. As a result LAT seemed to be test of choice for screening since it is easy and safe to perform. For a perfect diagnosis, it is concluded that sera with positive LAT results should be sent to reference units for further evaluation in which DT (Golden Standard), DS-ELISA IgM, ISAGA IgM are used, additional to new methods such as PCR, Western blot, Immunoblot.

KAYNAKLAR

- 1-Alford, C. A. Jr., Stagno, S., Reynolds, D. W., 1975: Diagnosis of chronic perinatal infections. Am. J. Dis. Child. Vol.129, 455-463
- 2-Aouizerate, F., Cazenave, J., Poirier, L., Verin, Ph., Cheyrou, A., Begueret, J., Lagoutte, F., 1993: Detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor by polymerase chain reaction. British J. Ophtalmol., 77, 107-109
- 3-Araujo, F. G., Barnett, E. V., Gentry, L. O., Remington, J. S., 1971: False-positive anti-toxoplasma fluorescent-antibody test in patients with antinuclear antibodies. Appl. Microbiol. 22: 270- 273
- 4-Balows, A., Hausler, W. J. Jr., Hermann, K. L., Isenberg, H. D., Shadomy, H. J., 1991: Manual of Clinical Microbiology. 5th Ed. Am. Soc. Microbiol.
- 5-Barker, K. F., Holliman, R. E., 1992: Laboratory techniques in the investigation of toxoplasmosis. Genitourin Med.; 68, 55-59
- 6-Beach, P. G., 1979: Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in pregnant women in Oregon. The J. of Infect. Dis. Vol. 140, No.5, 780-783
- 7-Benson, R. C., 1980: Current Obstetric and Gynecologic diagnosis and treatment. 3rd Ed. Lange Medical Publications
- 8-Beyer, T., Sim, V., Hutchinson, W., 1987: Cytochemistry of *Toxoplasma gondii*. VI. Polysaccharides, lipids and phosphatase on cyts forms. Tsitogia.; 19, 979
- 9-Brooks, G. F., Butel, J. S., Onston, L. N., Jawetz, E., Melnich, J. L., Adelberg, E. A., 1991: Medical Microbiology, 9th Ed., 353-355 Appleton & Lange
- 10-Budzko, B. D., Tyler, L., Armstrong, D., 1989: Fc receptors on the surface of *Toxoplasma gondii* trophozoites, A comfounding factor in testing for anti-toxoplasma antibodies by indirect immunofluorescence. J. Clin. Microbiol. 27: 959-961
- 11-Burg, J. L., Grover, C. M., Pouletty, P., Boothroyd, J. C., 1989: Direct and sensitive detection of pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by Polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. Vol.27. No.8, 1787-1792
- 12-Burg, J. L., Perelman, D., Kasper, L. H., Ware, P. L., Boothroyd, J. C., 1988: Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol., Vol. 141, No.10, 3584-3591

- 13-Candolfi, E., Derouin, F., Kien, T., 1987: Detection of circulating antigens in immunocompromised patients during reactivation of chronic toxoplasmosis. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6: 44-48
- 14-Cazenave, J., Cheyrou, A., Blouin, P., 1991: Use of polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma*. *J. Clin. Pathol.*; 44, 1037- 1039
- 15-Cazenave, J., Forestier, F., Bessieres, M. H., Broussin, B., Begueret, J., 1992: Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Congenital toxoplasmosis*; John Wiley & Sons, Ltd. 119-127
- 16-Daffos, F., Forestier, F., Capella-Pavlovsky, M., 1988: Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis. *N. Eng. J. Med.* 318: 271-275(40/50)
- 17-Decoster, A., Darcy, F., Caron, A., Capron, A., 1988: IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. *Lancet* ii: 1104-1107
- 18-Derouin, F., Sarfati, C., Beauvais, B., Iliou, M., Dehen, L., Lariviere, M., 1989: Laboratory diagnosis of pulmonary toxoplasmosis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1661-1663
- 19-Desmots, G., Thulliez, Ph. 1985: The toxoplasma agglutination antigen as a tool for routine screening and diagnosis of toxoplasma infection in mother and infant. *Develop. Biol. Standard.*; 62: 31-36
- 20-Desmots, G., 1966: Definitive serological diagnosis of ocular toxoplasmosis. *Arch. Ophthalmol.* 76: 839-851
- 21-Desmots, G., Baufine-Ducrocq, H., Couzineau, P., Peloux, Y., 1974: Anticorps toxoplasmiques naturels. *Nouv. Presse. Med.* 3: 1547-1549
- 22-Desmots, G., Couvreur, J., 1974: Congenital toxoplasmosis: a prospective study of 378 pregnancies. *N. Eng. J. Med.* 290:1110-1116
- 23-Desmots, G., Forestier, F., Thulliez, P. H., Daffos, F., Capella-Pavlovsky, Chartier, M., 1985: Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *The Lancet*, March, 500-504
- 24-Desmots, G., Naot, Y., Remington, J. S., 1981: Immunoglobulin-M immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasma infections. *J. Clin. Microbiol.* 14: 486-491

- 25-Desmonts, G., Remington, J. S., 1980: Direct agglutination test for diagnosis of toxoplasma infection. Method for increasing sensitivity and specificity. J. Clin. Microbiol. 11, 562-568
- 26-Desmonts, G., Remington, J. S., 1980: Direct agglutination test for diagnosis of toxoplasma infection: method for increasing sensitivity and specificity. J. Clin. Microbiol. ii: 562-568
- 27-Dilmen, U., Kaya, İ. S., Çiftçi, U., Gökşin, E., 1990: Antenatal screening for toxoplasmosis. The Lancet Vol. 336, 818-819
- 28-Duffy, K. T., Wharton, P. J., Johnson, J. D., New, L., Holliman, R. E., 1989 : Assessment of immunoglobulin-M immunosorbent agglutination assay (ISAGA) for detecting toxoplasma specific IgM. J. Clin. Pathol.; 42, 1291-1295
- 29-Dunford, P., Johnson, J. D., 1991: Detection of Toxoplasma-specific immunoglobulin-G: assessment of a slide agglutination test. Med. Lab. Sci. 48; 137-141
- 30-Dutton, G. N., 1986: The cause of tissue damage in toxoplasmic retinochoroiditis. Trans. Ophthalmol. Soc. UK 105: 404-412
- 31-Endo, T., Yagita, K., Yasuda, T., Nakamura, T., 1988: Detection and localization of actin in *Toxoplasma gondii*. Parasitol. Res.; 75, 102-106
- 32-Fisher, M. A., Levy, J., Helfrich, M., August, C. S., Starr, S. E., Luft, B. J., 1987: Detection of *Toxoplasma gondii* in the spinal fluid of a bone marrow transplant recipient. Pediatr. Infect. Dis. 6: 81-84
- 33-Fortier, B., Ajana, F., Pinto de Sousa, M. I., Aissi, E., Camus, D., 1991: Prévention et traitement de la toxoplasmose materno-foetale. La Presse Med. 20, No.29, 1374-1383
- 34-Foulon W., Naessens A., Volckaert M., Lauwers S., Amy J.J., 1984 : Congenital toxoplasmosis: a prospective survey in Brussels. British J. of Obstetrics and Gynaecology vol. 91. 419-423
- 35-Frenkel, J. K., Escajadilo, A., 1987: Cyts rupture as apathogenic mechanism of toxoplasmic encephalitis. Am. J. Trop. Med. Hyg.; 36, 517-522
- 36-Fulton, D. J., Turk, J. L., 1959: Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. Lancet, 11, 1068-1069

- 37-Garin, J. P., Ambroise-Thomas, P., 1963: Le diagnostic sérologique de la toxoplasmose par la méthode des anticorps fluorescents (technique indirecte). La Presse Méd. 71, 2485-2488
- 38-Goldman, M., 1957: Staining *Toxoplasma gondii* with fluorescein labelled antibody. II. A new serological test for antibodies to toxoplasma based upon inhibition of specific staining. J. Exp. Med. 105, 549-573
- 39-Golvan, Y. J., 1983: Eléments de Parasitologie Médicale. 321-334 Flammarion Med. Sciences 4 Ed. Paris
- 40-Gross, U., Müller, J., Roos, T., Schrod, L., Heesemann, J., 1992: Possible reasons for failure of conventional tests for diagnosis of fatal congenital toxoplasmosis : Report of a case diagnosed by PCR and immunoblot. Infection Vol.20, No.3, 149-152
- 41-Gross, U., Roggenkamp, A., Janitschke, K., Heesemann, J., 1992: Improved sensitivity of Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii* in biological and human clinical specimens. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Vol.11, No.1; 33-39
- 42-Grover, C. M., Thulliez, P., Remington, J. S., Boothroyd, J. C., 1990: Rapid prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis using Polymerase chain reaction and amniotic fluid. J. Clin. Microbiol., Vol.28, No.10, 2297-2301
- 43-Gusetti, N., D'Elia, R., Mottola, A., Rigoli, E., 1990: Natural immunoglobulin M antibodies against *Toxoplasma gondii* during pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol.; Vol. 162, No. 5, 1359-1360
- 44-Hall, S. M., 1991: Diagnosing maternofetal toxoplasmosis. BMJ, Vol. 302, 1208
- 45-Hedman, K., Lappalainen M., Seppäia, I., Makela, O., Recent primary toxoplasma infection indicated by low avidity of specific IgG. J. Infect. Dis. 159: 736-740
- 46-Ho-Yen, D. O., Joss, A. W. L., Balfour, A. H., Smyth, E. T. M., Baird, D., Chatterton J. M. W., 1992: Use of polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in human blood samples. J. Clin. Pathol., 45, 910-913
- 47-Hogg, G. M., Smyth, E. T., 1989: Comparison of immunosorbent agglutination assay (ISAGA) with conventional tests for routine detection of *Toxoplasma* IgM antibodies. Serodiagnosis. Immunother. 3: 185-191

- 48-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. *The J. of Pediatrics*, November, 765-769
- 49-Holliman, R. E., 1988: Toxoplasmosis and the acquired immune deficiency syndrome. *J. Infect.* 16; 121-128
- 50-Holliman, R. E., 1990: Diagnosis of toxoplasmosis. Review. Serodiagnosis and Immunotherapy in *Infect. Dis.*; 4, 83-93
- 51-Holliman, R. E., 1990: Investigation of HIV positive patients for toxoplasmosis using the latex agglutination test. *Serodiagnosis and Immunotherapy in Infect. Dis.*; 4, 249-253
- 52-Holliman, R. E., 1990: Serological study of the Prevalence of toxoplasmosis in asymptomatic patients infected with human immunodeficiency virus. *Epidemiol. Infect.*, 105, 415-418
- 53-Holliman, R. E., 1991: Clinical and diagnostic findings in 20 patients with toxoplasmosis and the Acquired Immune Deficiency Syndrome. *J. Med. Microbiol.* Vol. 35, 1-4
- 54-Holliman, R. E., Barker, K. F., Johnson, J. D., 1990: Selective antenatal screening for toxoplasmosis and the latex agglutination test. *Epidemiol. Infect.*, 105, 409-414
- 55-Holliman, R. E., Johnson, J. D., 1989: The post-natal serodiagnosis of congenital toxoplasmosis. *Serodiagnosis and Immunotherapy in Infect. Dis.*; 3, 323-327
- 56-Holliman, R. E., Johnson, J. D., Adams, S., Pepper, J. R., 1991: Toxoplasmosis and heart transplantation. *J. Heart Transplant.*; 10, 608-610
- 57-Holliman, R. E., Johnson, J. D., Constantine, G., Bissenden, J. G., Nicolaides, K., Savva, D., 1991: Difficulties in the diagnosis of congenital toxoplasmosis by cordocentesis. Case report; *British J. of Obstet. and Gynaecol.* Vol. 89, 1-4
- 58-Holliman, R. E., Johnson, J. D., Duffy, K. T., New, L., 1989: Discrepant toxoplasma latex agglutination test results. *J. Clin. Pathol.*, 42, 200-203
- 59-Holliman, R. E., Johnson, J. D., Gillespie, S. H., Johnson, M. A., Squire, S. B., Savva, D., 1991: New methods in the diagnosis and the management of

- cerebral toxoplasmosis associated with the Acquired Immune Deficiency Syndrome. *J. of Infect.* 22, 281-285
- 60-Holliman, R. E., Johnson, J. D., Savva, D., 1990: Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in association with AIDS using the Polymerase chain reaction. *Scand. J. Infect. Dis.*, 22, 243-244
- 61-Holliman, R. E., Johnson, J. D., Savva, D., Cary, N., Wrightt, T., 1992: Diagnosis of toxoplasma infection in cardiac transplant recipients using the Polymerase chain reaction. *J. Clin. Pathol.*, 45, 931-932
- 62-Holliman, R. E., Stevens, P. J., Duffy, K. T., Johnson, J. D., 1991: Serological investigation of ocular toxoplasmosis. *British J. Ophtalmol.*, 75, 353-355
- 63-Israelski, D. M., Remington, J. S., 1988: Toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Infect. Dis. Clin. North Am.*; Vol. 2, No. 2, 429-445
- 64-Jacobs, L., Lunde, M. N., 1957: A hemagglutination test for toxoplasmosis. *J. Parasitol.*, 43, 308-314
- 65-Johnson, A. M., Gu, Q. M., Roberts, H., 1987: Antibody patterns in the serological diagnosis of acute lymphadenopathic toxoplasmosis. *Aust. N. Z. J. Med.* 17; 430-434
- 66-Johnson, J. D., Butcher, P. D., Savva, D., Holliman, R. E., 1993: Application of the Polymerase chain reaction to the diagnosis of human toxoplasmosis. *J. Infect.*, 26, 147-158
- 67-Johnson, J. D., Duffy, K. T., New, L., Holliman, R. E., Chessum, B. S., Fleck, D. G., 1989: Direct agglutination test and other assays for measuring antibodies to *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Pathol.*, 42, 536-541
- 68-Johnson, J. D., Holliman, R. E., 1991: Incidence of toxoplasmosis in patients with glandular fever and in healthy blood donors. *British J. of General Practice*; 41, 375-376
- 69-Kaplan, D. S., Picciolo, G. L., 1989: Application of quatitative immunofluorescence to clinical serology: antibody levels to *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.* 27: 2008-2013
- 70-Kasper, L., Ware, P. L., 1989: Identification of stage-specific antigen of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* ; 57, 668-672

- 71-Kelen, A. E., Aylonn-Leidl, L., Labzoffsky, N. A., 1962: Indirect fluorescent antibody. method in serodiagnosis of toxoplasmosis. *Can. J. Microbiol.*, 8, 545-554
- 72-Kempe, C. H., Silver, H. K., O'Brien, D., 1982: Current Pediatric diagnosis and treatment. 7th Ed. Lange Medical Publications(current ped)
- 73-Kuman, H. A., 1992: Toxoplasmoz Kliniği. *T. Parazitol. Derg.* XVI (2) 101-106
- 74-Levy, R. M., Pons, V. G., Rosenblum, M. L., Central nervous system mass lesions in the acquired immune deficiency syndrome (AIDS) *J. Neurosurg.* 61: 9-16
- 75-Luft, B. J., Brooks, R. G., Conley, F. K., McCabe, R. E., Remington, J. S., 1984: Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome 257: 913-917
- 76-Luft, B. J., Naot, Y., Araujo, F. G., Stinson, E. B., Remington, J. S., 1983: Primary and reactivated *Toxoplasma* infection in patients with cardiac transplants. *Ann. Int. Med.* ; 99, 27-31
- 77-MacPherson, J. M., Gajadhar, A. A., 1993: Sensitive and specific polymerase chain reaction detection of *Toxoplasma gondii* for Veterinary and Medical diagnosis. *Can. J. Vet. Res.*,57, 45-48
- 78-Mandell, G. L., Bennett, J. E., Dolin, R., 1995: Mandell, Douglas and Bennett' s Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th Ed. Vol. 2, 2455-2475, Churchill Livingstone Inc.
- 79-Markel, E. K., Voge, M., John, D. T., 1992: Medical Parasitology 7th Ed. W. B. Saunders Company; 160-170
- 80-McCabe, R. E., Brooks, R. G., Dorfman, R. F., Remington, J. S., 1987: Clinical spectrum in 107 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *Review of Infect. Dis.*; Vol.), No. 4, 754-774
- 81-McCabe, R. E., Gibbons, D. Brooks, R. G., Luft, B. J., Remington, J. S., 1983: Agglutination test for diagnosis of toxoplasmosis in AIDS. *Lancet* ii: 680
- 82-McPherson, M. J., Quirke, P., Taylor, G. R., 1991: PCR A Practical Approach. IRL Press at Oxford Univ. Press(PCR)

- 83-Michaels, M. G., Wald, E. R., Fricker, F.J., del Nido, P. J., Armitage, J. 1992: Toxoplasmosis in pediatric recipients of heart transplants. *Clin. Infect. Dis.*; 14, 847-851
- 84-Naot, Y., Barnett, E. V., Remington, J. S., 1981: Method for avoiding False-positive results occurring in immunoglobulin-M enzyme-linked immunosorbent assays due to the presence of both rheumatoid factor and antinuclear antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 14: 73-78
- 85-Nichols, B. A., Chiappino, M. L., 1987: Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.*; 34, 217-226
- 86-Nichols, B. A., Chiappino, M. L., O'Connor, G. R., 1983: Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *J. Ultrastruct. Res.*; 83, 85-89
- 87-Nicolau, S., Ravello, A., 1937: La réaction de la fixation du complément dans le sérum et les extraits d'organes d'animaux atteints de toxoplasmose expérimentale. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 30, 855-859
- 88-O'Driscoll, J. C., Holliman, R. E., 1991: Toxoplasmosis and bone marrow transplantation. *Rev. Med. Microbiol.*; 2, 215-222
- 89-Patel, B., Young, Y., Duffy, K., Tanner, R. P., Johnson, J. D., Holliman, R. E., 1993: Immunoglobulin-A detection and the investigation of clinical toxoplasmosis. *J. Med. Microbiol.*; 38, 286-292
- 90-Paul, E. W., 1989: *Fundamental Immunology* 2nd Ed. Raven Press Ltd./ N. Y.
- 91-Peloux, Y., Couzineau, P., Beaufine-Ducrocq, H., Tayot, J. L., Jaquot, D., 1973: La réaction d'agglutination directe des toxoplasmes; rôle des immunoglobulines 19S et 7S. *Ann. Biol. Clin.*, 31, 185-192
- 92-Petersdorf, R. G., Adams, R. D., Braunwald, E., Isselbacher, K. J., Martin, J. B., Wilson, J. D., 1985: *Harrison's Principle of Internal Medicine*. 10th Ed. McGraw Hill International Book Company; 1200-1205
- 93-Pomeroy, C., Filice, G. A., 1992: Pulmonary toxoplasmosis: A review. *Clin. Infect. Dis.*; 14, 863-870
- 94-Potasman, I., Ararajo, F. G., Thulliez, P., Desmots, G., Remington, J. S., 1987: *Toxoplasma gondii* antigens recognised by sequential samples of serum obtained from congenitally infected infant. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1926-1931

- 95-Potasman, I., Resnick, L., Luft, B. J., Remington, J. S., 1988: Intratechal production of antibodies against *Toxoplasma gondii* immunodeficiency syndrome (AIDS). Ann. Intern. Med. 108: 49-51
- 96-Pouletty, P., Kadouche, J., Garcia-Gonzales, M. et al., 1985: An anti-human μ -chain monoclonal antibody: use for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* by reverse immunosorbent assay. J. Immunol. Methods 76: 289-298
- 97-Prömpeler, H. J., Vogt, A., Petersen, E. E., 1989: Toxoplasmose-Diagnostik in der Schwangerschaft. Geburtsh.u. Frauenheilk, 49, 642-648
- 98-Remington, J. S., 1969: The present status of IgM fluorescent antibody technique in the diagnosis of congenital toxoplasmosis. J. Pediatr. USA, 75, 1116-1124
- 99-Remington, J. S., Desmonts, G., 1983: Toxoplasmosis. In: Remington, J. S., Klein, J., eds. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. Philadelphia: W. B. Saunders, 1983; 191-332
- 100-Rothova, A., van Knappen, F., Baarsma, G., S., Kruit, P. J., Loewer-Sieger, D.H., Kijlstra, A., 1986: Serology in ocular toxoplasmosis. Br. J. Ophthalmol. 70: 615-622
- 101-Sabin, A. B., Feldman, H. A., 1948: Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (toxoplasma) Science, 108, 660-663
- 102-Savva, M., Morris, J. C., Johnson, J. D., Holliman, R. E., 1990: Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. J. Med. Microbiol. Vol. 32, 25-31
- 103-Schmidt, G. D., Roberts, L. S., 1989: Foundations of Parasitology. 4th Ed. Times Mirror/ Mosby College Publishing; 123-129
- 104-Schwartzman, J. D., Krug, E. C., Binder, L. J., Payne, M. R., 1985: Detection of the microtubule cytoskeleton of the coccidian *Toxoplasma gondii* and the hemoflagellate *Leishmania donovani* by monoclonal antibodies specific for Beta Tubulin. J. Protozool.; 32, 747
- 105-Schwartzman, J. D., Pfefferkorn, E. R., 1983: Immunofluorescent localization of myosin at the anterior pole of the coccidian *Toxoplasma gondii*. J. Protozool.; 30, 657-661

- 106-Seguella, J. P., Bessieres, M. H., Foisy, C., Launais, B., Pozet, S., Recco, P., Linas, M. D., 1976: Application de la réaction d'hémagglutination indirecte au séro-diagnostic de la toxoplasmose. Utilisation d'un antigène soluble. *Méd. et Mal. Infect.*, 6, 268-274
- 107-Seguella, J. P., Bessieres, M. H., Linas, M. D., Recco, P., Regnard, J., Jaubert, M., 1982: Toxoplasmose: sérodiagnostic par immunoenzymologie (ELISA) *Méd. et Mal. Infect.*, 12, 459-465
- 108-Sibley, L. D., Krahenbuhl, J. L., 1988: Modification of cell phagosomes by *Toxoplasma gondii* involves redistribution of surface proteins and secretion of 32 kDa protein. *Eur. J. Cell. Biol.*; 47, 81-87
- 109-Sims, T. A., Hay, J., Talbot, I. C., 1988: Host-parasite relationship in the brains of mice with congenital toxoplasmosis. *J. Pathol.*; 156, 255-261
- 110-Skinner, L. J., Chatterton, J. M. W., Joss, A. W. L., Moir, I. L., Ho-Yen, D. O., 1989: The use of an IgM immunosorbent agglutination assay to diagnose congenital toxoplasmosis. *J. Med. Microbiol.*; 28, 125-128
- 111-Smith, J. L., 1991: Foodborne toxoplasmosis. *J. of Food Safety*; 12; 17-57
- 112-Speirs, G. E., Hakim, M., Calne, R. Y., Wreghitt, T. G., 1988: Relative risk of donor-transmitted *Toxoplasma gondii* infection in heart, liver and kidney transplant recipients. *Clin. Transplantation*; 2, 257- 260
- 113-Suzuki, Y., Israelski, D. M., Danneman, B. R., Stepick-Bieck, P., Thulliez, P., Remington, J. S., 1988: Diagnosis of toxoplasmic encephalitis in patients with Acquired Immune Deficiency Syndrome by using a new serologic method. *J. Clin. Microbiol.*; Vol. 26, No. 12, 2541-2543
- 114-Suzuki, Y., Remington, J. S., 1990: Importance of membrane-bound antigens of *Toxoplasma gondii* and their fixation for serodiagnosis of toxoplasmic encephalitis in patients with Acquired Immune Deficiency Syndrome *J. Clin. Microbiol.*; Vol. 28, No. 10, 2354-2356
- 115-Thorburn, H., Williams, H., 1972: A stable hemagglutination antigen for detecting toxoplasma antibodies. *J. Clin. Pathol.*, 25, 762-767
- 116-Threnkeld, M. G., Graves, A. H., Cobbs, C. G., 1987: Cerebrospinal fluid staining for the diagnosis of toxoplasmosis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *Am. J. Med.* 83: 599-600

- 117-Thulliez, Ph., Dutriat, P., Saulnier, M, Vernes, A., Desmonts, G.,1988: Evaluation de trois réactifs de détection par immunocapture des IgM spécifiques de la toxoplasmose. Rev. french Lab. 169: 25-31
- 118-Unat, E. K., Yücel, A., Altaş, K., Samastı, M., 1991: Unat' in Tıp Parazitolojisi. 4. baskı, 601-622
- 119-Van de Ven, E., Melchers, W., Galam, J., Camps, W., Meuwissen, J., 1991: Identification of *Toxoplasma gondii*, by B1 gene amplification. J. Clin. Microbiol. Vol. 29, No.10, 2120-2124
- 120-Verhofstede C., Van Rentergem L., Plum J., 1989: Comparison of six commercial enzyme linked immunosorbent assays for detecting IgM antibodies against *Toxoplasma gondii*. J. Clin. Pathol. 42:1285-1290
- 121-Voller, A., Bidwell, D. E., Barlett, A., Fleck, D. G., Perkins, M., Oladehin, B., 1976: A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody. J. Clin. Pathol. 29, 150-153
- 122-Welch, P.C., Masur, H., Jones, T. C., Remington, J. S.,1980: serologic diagnosis of acute lymphadenopathic toxoplasmosis. J. Infect. Dis. 142: 25655-264
- 123-Werk, R., 1985: How does *Toxoplasma gondii* enter host cell? Rev. Infect. Dis.; 7, 449-457
- 124-Werk, R., Dunker, R., Fisher, S., 1984: Polycathionic polypeptides: a possible model for the penetration-enhancing factor in the invasion of the host cells by the *Toxoplasma gondii*. J. Gen. Microbiol.; 130, 927-933
- 125-Wong, B., Gold, J. W., Brown, A. E., et al., 1984: Central nervous system toxoplasmosis in homosexual men and parenteral drug abusers. Ann. Intern. Med. 100: 36-42
- 126-Wreghitt, T. G., Hakim, M., Gray, J. J., Balfour, A. H., Stovin, P. G. I., Steward, S., Scott, J., English, T. A. H., Wallwork, J., 1989: Toxoplasmosis in heart and heart and lung transplant recipients. J. Clin. Pathol., 42, 194-199
- 127-Yaşarol, Ş., 1984: Medikal Parazitoloji. 2. Baskı, Ege Üniv. Tıp Fak. Yayınları No. 93
- 128-Zaman, V., Keong, L. O., 1990: Hanbook of Medical Parasitology. 2nd. Ed.Churchill Livingstone 70-78

ÖZGEÇMİŞ

3 Nisan 1962 yılında İzmir' de doğdum, sırasıyla Namık Kemal İlkokulu ve Bornova Anadolu Lisesini bitirdikten sonra 1980 yılında Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesinde bir yıl okuyup, 1981 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesini kazandım, fark derslerini vererek 2. sınıfa devam ettim. 1985 yılında öğrenci değişim programı ile Macaristan' daki Pecs Üniversitesi Gastroenteroloji bölümünde 1 ay staj yaptıktan sonra Tıp fakültesini 1986 yılında iyi derece ile bitirdim.

19 ay süre ile Afyon ili Şuhut İlçesine bağlı çakırözü köyü sağlık ocağında ve İzmir ili Yamanlar köyü sağlık ocağında zorunlu hizmet yükümlülüğünü yerine getirdim. Askerlik hizmetimi Yedek subay olarak 16 ay süre ile Samsun ve Gelibolu' da tamamladım 1987 yılında 2 ay süre ile İskoçya' daki Royal Hospital For Sick Children' da çocuk cerrahisi bölümünde çalıştım.

1990 yılı Mart ayından beri Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim dalında Doktora çalışmalarına başlayıp, 1993 yılı sonunda 3 ay süre ile İngiltere' deki St. George's Hastanesi bünyesindeki Toxoplasma Referans Laboratuvarında tez çalışmalarını yaptım.

Evliyim, 7 yaşında bir kızım var. İyi derecede İngilizce ve Almanca biliyorum

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ



Public Health Laboratory Service

Public Health Laboratory
St. George's Hospital
Blackshaw Road
London SW17 0QT
Fax 081-682 1320
Telephone 081-672 9944

Our ref

Your ref

re: DR A YÜKSEL GÜRÜZ

I can confirm that Dr Gürüz received specialised training at the Public Health Laboratory Service Toxoplasma Reference Unit, during the period 17th November 1993 to 14th February 1994. During this time, Gürüz received instruction and practical experiences in the performance of the Sabin-Feldman dye test, latex agglutination test, direct agglutination test, μ -chain capture ELISA, IgM and IgA immunosorbent agglutination assays (ISAGA), parasite isolation and passage using mouse inoculation and parasite detection using polymerase chain reaction (PCR) with nested primers to the B1 and p30 genes. During this period the laboratory investigated over 2,000 clinical samples. In addition, Dr Gürüz was given instruction in the interpretation of test findings and management of clinical toxoplasmosis in the context of lymphadenopathy, pregnancy, neonatal disease, ocular disease, solid organ transplantation, bone marrow transplantation and HIV infection.

Please contact me if you require any further details.

R E Holliman BSc MSc MD MRCPATH
Consultant Medical Microbiologist
Director: PHLS Toxoplasma Reference Unit