

Toksoplazmosis teşhisinde Sabin-Feldman testi ve ELISA IgM antikorlarının karşılaştırılması

Gönül Aslan¹, Kürşat Altıntaş²

¹Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin

²Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Parazitoloji Bilim Dalı, Ankara

Amaç: Toksoplazmosis tanısında kullanılan ELISA IgM testi ve Sabin-Feldman testlerinin duyarlılıklarının karşılaştırılması amacıyla bu çalışma planlanmıştır. **Yöntem:** Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Bilim Dalına toksoplazmosis şüphesi ile başvuran hastalardan alınan 4-5cc venöz kanlardan ayrılan serumlarda Sabin-Feldman testi ve ELISA IgM testiyle toksoplazma antikorları araştırıldı. **Bulgular:** Sabin-Feldman testi ile % 16,9, ELISA IgM yöntemiyle % 1,5 seropozitivite tesbit edildi. Mükerrer düşük hikayesi olan bir hastada hem ELISA IgM hem de Sabin-Feldman testi pozitif bulunmuştur. **Sonuç:** Sabin-Feldman testi uygulanamayan laboratuvarlarda, farklı fraksiyondaki spesifik antikorları saptaması, hastalığın klinik takibi ve konjenital toksoplazmosisli olguların saptamasındaki uygulama kolaylıkları açısından ELISA yönteminin toksoplazmosis tanısında kullanılabileceği inancındayız.

Anahtar kelimeler: Toksoplazmosis, teşhis, ELISA, Sabin-Feldman testi, abortus

Comparison of Sabin-Feldman Test and ELISA IgM Antibodies in the Diagnosis of Toxoplasmosis

Objective: Comparison sensitivity of ELISA IgM and Sabin-Feldman test which used to determining toxoplasmosis. **Methods:** Sabin-Feldman and ELISA IgM antibodies were analysed in toxoplasmosis suspected patients who were submitted to the Parasitology Department of Medical Faculty of Ankara University. **Results:** Seropositivity of Sabin-Feldman test and ELISA IgM were found be 16.9% and 1.5%, respectively. Both ELISA IgM and Sabin-Feldman tests gave positive results in one patient having recurrent abortion. **Conclusion:** We belive that the ELISA method can be use in laboratories which could not performed Sabin-Feldman methods, to detect different fractions of specific antibody, clinically follow up and congenital toxoplasmosis cases.

Key words: Toxoplasmosis, diagnosis, ELISA, Sabin-Feldman test, abortion

Genel Tıp Derg 2000;10(4):161-4.

Toksoplasma gondii fekal-oral yolla, transplasental geçişle, kan ya da kan ürünlerinin transfüzyonu, organ transplantasyonu ile alınmakta veya laboratuvar enfeksiyonu şeklinde bulaşmaktadır (1,2).

Ookist içeren toprak ile bulaşan sebze ve meyvelerin

yenmesi veya bunlarla temas eden ellerin yıkanmadan ağıza götürülmesi ile ookistler alınarak GİS epitelinde trofozoitleri oluşturur. GİS epitelinde çoğalan trofozoitlerin kan yolu ile yayılımı parazitemiyi başlatır. IgM ilk 2-6 haftada en yüksek düzeyde seyeder, daha sonra IgG antikorları yükselmeye başlar (3).

Toksoplazmosisin genellikle asemptomatik ve subklinik seyreden bir hastalık olması nedeniyle klinik görünümün, hastalık için spesifik

Yazışma Adresi: Yrd.Doç.Dr.Gönül Aslan, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 33070-Zeytinlibahçe, Mersin

olmadığından, kesin teşhiste fazla önemi yoktur. Direkt tanı yöntemlerinin çok pahalı olması, çok zaman alması ve etkenin her zaman görülememesi gibi sebeplerle tedavi endikasyonunun konması ve tedavinin sürdürülmesi konularında özellikle konjenital toksoplazmosis açısından serolojik testlerin ön plana çıkmasına neden olmuştur. Toksoplazmosisin serolojik tanısında en fazla kullanılan ve sonuçları güvenilir yöntemler ; Sabin-Feldman (SF) boyama yöntemi (veya dye test, DT), indirekt fluorezan antikor testi (IFAT), enzim işaretli antikorla yapılan, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ve indirekt hemaglutinasyon testi (IHAT), lateks aglutinasyonları (LA) ve modifiye aglutinasyon testleridir (4-7).

Çalışmamızda Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Bilim Dalı'na başvuran 65 hasta serumunda SFT ve Ken Star EIA Toxoplasma IgM kiti kullanılarak anti toksoplazma antikorları araştırılmıştır.

Yöntem

Bu çalışmada Eylül 1996-Aralık 1996 döneminde A.Ü.Tıp Fakültesi Parazitoloji Bilim Dalına toksoplazmosis şüphesi ile başvuran 65 hastalardan aseptik şartlarda alınan 3-5cc venöz kanların serumları ayrılarak, çalışma gününe kadar -20 °C de saklandı.

Sabin Feldman Testi (SFT)

Uygulanan Lizis testi Sabin-Feldman yönteminin Desmontes tarafından başkalaştırılmış şeklidir (8). Bu uygulamada metilen-bleu kullanılmamakta, pozitif sonuç varlığında parazitlerdeki lizis faz-kontrast mikroskopide değerlendirilmektedir.

Testte antijen olarak A.Ü. Tıp Fakültesi Parazitoloji Bilim Dalı'nda müteakkip pasjlarla devamlılığı (5-6 Swiss Albino fare kullanılarak) sağlanan *T.gondii* suşu kullanıldı. İntraperitoneal olarak *T.gondii* zerk edilmiş fareden 3. günde periton sıvıları 0.5-1cc alındı. Toksoplazma pozitif serum ve aktivatör varlığında kullanıma uygun olan antijen tespit edildi .

Hasta serumları klasik yöntemle 1/16'dan 1/4096 'ya kadar FTS ile sulandırıldı. 0,05 ml (1 damla) hacimdeki serum sulandırılmaları üzerine aynı hacimde ön testte seçimi yapılmış antijen (*T.gondi* ile enfekte fare periton sıvısı) ve iki hacim aktivatör serum ilave

edildi. 37°C de 30 dakika benmaride inkübasyonu yapıldıktan sonra, faz-kontrast mikroskopta değerlendirildi.

Toksoplazmosis yönünden pozitif hastaların serumları ile muammele edilen toksoplazmalar kararmış granüllü, cidarları parçalanmış görünümde iken negatif ve hastaların serumları ile karşılaşan parazitler parlak, cidarları belirgin ve ışık kırıcı görünümde idiler.

ELISA IgM testi

Prensip olarak purifiye *T.gondii* antijeni ile kaplanmış kuyucuklara dilue edilmiş hasta serumu eklendiğinde (eğer hastada *T.gondii* IgM spesifik antikor mevcutsa) antijene bağlandı. Tüm bağlanmayan materyal yıkanarak uzaklaştırıldı. Enzim konjugatı eklenerek antijen-antikor kompleksine bağlanması sağlandı. Enzim konjugatın fazlası yıkandı, takiben substrat ve kromojen eklendi. Enzim konjugat katalitik reaksiyonu belli bir zamanda durduruldu. Meydana gelen rengin yoğunluğu örnekteki IgM sfesifik antikorunun miktarıyla orantılıydı. Optik dansiteleri (OD) 450Nm dalga boyunda okundu. Kalibratör, negatif ve pozitif kontrollerle karşılaştırılarak değerlendirildi.

Serumların OD değerleri kalibratör OD değerine oranlanarak Toxo M, indeksi hesaplandı. Bu indeks 0,80 'den küçükse negatif, 0,80-1,000 arasındaysa şüpheli, 1,000 'den büyükse pozitif olarak değerlendirildi.

İstatistik değerlendirmelerde "SPSS 9'0 for Windows" istatistik yazılım paket programı kullanıldı. Verilerin istatistiksel analizinde Wilcoxon Rank testi kullanıldı. P=0.002 anlamlı kabul edildi

Bulgular

Çalışmamızda SFT (1/16-1/1024 titrelerde) % 11,9, ELISA IgM % 1,5 ve SFT ile ELISA IgM birlikte % 1,5 seropozitif değerlendirilmiştir (Tablo 1).

Sabin-Feldman Test ve ELISA IgM Test Wilcoxon testle karşılaştırıldı İki test arası fark (p=0,002 olarak) anlamlı bulunmuştur.

Düşük ve ölü doğum hikayeleri olan ve olmayan şahısların serumlarında toksoplazmosis yönünden Elisa IgM antikorları araştırılmış, Düşük ve ölü doğum hikayesi olan 8 kişilik gruptan bu hastada

pozitif bulunurken bu şikayetleri taşımayan diğer gruba ait 57 hastanın hiçbirinde pozitiflik saptanmamıştır.

Tablo 1. Testlere göre pozitif ve negatif oranları

Testler	n	Pozitif		Negatif	
		Sayı	%	Sayı	%
Sabin-Feldman (1/16-1/64)	65	11	16,9	54	83
ELISA IgM	65	1	1,5	64	98

Tablo2. Çeşitli yaş gruplarında Sabin Feldman ve ELISA IgM sonuçları

Yaş Grupları	Sabin Feldman		IgM	
	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif
15-25	15	6	21	-
26-35	27	4	30	1
36-45	12	1	13	-
Toplam	54	11	64	1

Tartışma ve sonuç

Toksoplazmosisin dünyamızda bütün coğrafik kuşaklarda yaygın olarak bulunduğu bildirilmektedir. T. gondii enfeksiyonlarına karşı gelişen immün cevabın enfeksiyona neden olan suşun virulansı, parazitin sayısı, formu gibi çok çeşitli faktörler tarafından etkilendiği ve tek bir antikor tarafından oluşturulmadığı bilinmektedir. Bunun yanında kullanılan antijenin özellikleri, aranan antikorun tipi ve uygulanan testlerin sensitiviteleri ve spesifiteleri antikor arayan testler ile immün yanıtın tespitini kısıtlayan faktörler olarak sıralanmaktadır (9,10).

Balfour ve ark. ELISA yöntemiyle spesifik IgM ve SFT karşılaştırmışlar ; ELISA yönteminin SF dye testten daha az hassas olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada dye testle karşılaştırılan enzim immunoassay sisteminin hassasiyetinin IgM sonuçlarıyla birlikte IgG sonuçlarının da hesaba katılmasıyla yükseleceği bildirilmektedir (11).

Doğan ve arkadaşları spesifik toksoplazma IgG'lerle SFT arasında büyük bir uyum gözlemişler, fakat aynı uyumu anti-toksoplazma IgM ELISA ile SFT arasında tespit edememişlerdir (12).

Evcî habituel abortuslu kadınlarda anti toksoplazma IgM antikorlarını % 1.2, kontrol gruplarında % 0.0 anti-toksoplazma IgG' yi ise habituel abortuslularda

% 41.3, kontrol gruplarında % 35.0-42.1 olarak bildirmiştir (13).

Çalışmamızda SFT ile % 16.9, ELISA IgM yöntemiyle % 1,5 seropozitivite tespit ettik (Tablo 1). Düşük ve ölü doğum hikayesi olan 8 hastadan 1'inde ELISA IgM ile 3'ünde SF ile seropozitivite tespit edilmiştir. ELISA IgM ve SFT ile pozitif 1 hastanın mükerrer düşük hikayesi bulunmaktadır .

Altıntaş ve ark 1991-1995 yılları arasında Ege Üniversitesi Parazitoloji Anabilim Dalı'na başvuran 9410 kişide IFAT ve ELISA ile anti toksoplazma antikorlarını (IgG) % 49.4 pozitif bulmuşlardır (14).

Sabin-Feldman Dye Test bu güne kadar toksoplazmosis tanısında duyarlı ve güvenilir bir yöntem olarak yerini korumakta ve referans test olarak bildirilmektedir. Test uygulanırken kullanılan canlı trofozoitler laboratuvar enfeksiyonu açısından tehlike oluşturabilse de gerekli önlemlerle tehlike riski azaltılabilmektedir. Test genellikle enfeksiyondan 1-2 hafta sonra pozitif olmaya başlamakta, 6-8 haftada pik yapmakta ve bir reenfeksiyon yoksa 1-2 yıl içinde düşmekte veya uzun bir süre azalarak devam etmekte fakat düşük titrelerde hayat boyu pozitif kalmaktadır.

ELISA bir çok araştırmacı tarafından tanıda en duyarlı ve hassas yöntem olarak bildirilmektedir. Enzim ile işaretli antiglobülin kullanılarak antikorların arandığı ELISA yöntemi ile farklı fraksiyondaki spesifik antikorların saptanması olanağı, hastalığın klinik takibi ve konjenital toksoplazmosisli olguların saptanması yönünden değer taşımaktadır. Yöntemin uygulama kolaylığı, çok sayıda örneğin bir arada çalışılabilmesine olanak vermesi ve spesifik IgM antikorlarını saptayarak hastalığın klinik evresine açıklık getirmesi gibi avantajlarından dolayı genellikle tercih edilmektedir (6,11,15,16). Ancak Chatterton'un referans laboratuvarı çalışmalarında ELISA test sonuçlarında % 2.0 oranda yalancı pozitifliklere raslanabildiği bildirilmektedir (17).

Sonuç olarak rutin laboratuvar uygulamalarında uygulama kolaylığı açısından ELISA IgG ve IgM 'in birlikte kullanılabileceği ancak referans laboratuvarlarda altın standart olarak değerini koruyan Sabin-Feldman dye testinin kullanılması gerektiği inancındayız.

Kaynaklar

1. Robert E, McCabe SR. *Toxoplasma gondii*. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennety JE, editors. Principles and practice of infectious disease. 2nd Ed. New York: Wiley Medical Publ; 1985 p.1540-9.
2. Balsari A, Molina V. ELISA for toxoplasma antibody detection a comparison with other serodiagnostic test. J Clin Pathol 1980;33:640-3.
3. Kanra G, Yurdakök M. Toxoplasmosis. Katkı Ped Derg 1988;9:321-40.
4. Altıntaş K: Toxoplasmosis tanısında uygulanan başlıca yöntemlerin kalitatif ve kantitatif değerleri (Uzmanlık Tezi). Ankara: Ankara Üniv.; 1973.
5. Gülmezoğlu AH, Gülmezoğlu E. Toksoplasma tanısında serolojik testlerin değerlendirilmesi. Mikrobiyoloji Bült 1986;20:295-303.
6. Altıntaş N: Türkiye'de toksoplazmosis tanısında kullanılan yöntemler. İçinde: 1.Ulusal Toxoplazma Kongresi Kitabı. Ankara: 1996. p.12-4.
7. Wilson M, Ware DA, Juranek DD. Serologic aspects of toxoplasmosis. Jama 1990;196:277-80.
8. Leclong M, Desmonts G. L'emploi du microscope a contraste de phase dans la reaction de Sabin-Feldman. Compt Rend Soc de Biol 1951;115:1160-4.
9. Jennum PA, Stray-Pedersen BS. Development of specific immunoglobulins G,M and A following primary toxoplasma gondii infection in pregnant women. J Clin Microbiol 1998;36:2907-13.
10. Evans R. Life cycle and animal infection. In: Ho-Yen DO, Joss AWL, editors. Human toxoplasmosis. New York: Oxford University Press; 1992. p.2:26-51.
11. Balfour AH, Harford JP. Detection of specific IgG and IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* with a commercial available enzyme immunoassay kit system. J Clin Pathol 1985;38:679-89.
12. Doğan N, Akgün Y, Altıntaş K. Comparison of different EIA kits and Sabin-Feldman test serologic diagnosis of toxoplasmosis. J Health Sci 1992;4:1-12.
13. Evci K, Sözen T H. Habituel abortus etiyolojisinde Toksoplasma gondii infeksiyonunun yeri. Ankara Üniv Tıp Fakültesi Mecmuası 1990:103-11.
14. Altıntaş N, Kuman HA, Akısı C, Aksoy U, Atambay M. Toxoplasmosis in last four year in agcan region. Turkey. J Egypt Soc Parasitol 1997;27:439-43.
15. Ashburn D, Evans R, Skinner LS, Chatterton JM, Joss AW, Ho-Yen DO. Comparison of relative uses of commercial assays for *Toxoplasma gondii* IgM antibodies. J Clin Pathol 1992;45:483-6.
16. Joss AWL, Diagnosis. In: Ho-Yen DO, Joss AWL, editors. Human toxoplasmosis. New York: Oxford University Press; 1992. p.4:79-112.
17. Chatterton JW. Pregnancy. In: Ho-Yen DO, Joss AWL, editors. Human toxoplasmosis. New York: Oxford University Press; 1992. p.6:144-83.