

Toxoplasmosis Şüpheli Hastalara Ait Serolojik ve Moleküler Test Sonuçlarının Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi

Retrospective Evaluation of Serologic and Molecular Test Results of Toxoplasmosis Suspected Patients

Emrah ERDOĞAN¹, Merve YÜRÜK¹, Eda SİVCAN¹, Serkan KARACA¹, Hanife TEMEL¹, Tuba ŞABANOĞLU¹, Aslıhan GÜLTEKİN¹, İzzet ŞAHİN¹

¹ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

¹ Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Kayseri, Turkey.

Makale Atfı: Erdoğan E, Yürük M, Sivcan E, Karaca S, Temel H, Şabanoğlu T ve ark. Toxoplasmosis Şüpheli Hastalara Ait Serolojik ve Moleküler Test Sonuçlarının Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2019;53(1):96-105

ÖZ

Hem sağlık hem de ekonomi açısından önemli bir protozoon olan *Toxoplasma gondii*, çeşitli sıcakkanlı omurgalıları enfekte eden geniş bir konak yelpazesi olan zorunlu hücre içi parazittir. İnsanlar, kontamine su ve besinleri tüketerek, doku kisti içeren çiğ veya az pişmiş etleri yiyerek, kan nakli, organ nakli ve transplental geçiş gibi değişik yollarla enfekte olabildiği için, toksoplazmozis son derece yaygın görülmektedir. Bu çalışmada, toksoplazmozis şüpheli hastalara ait serolojik ve moleküler test sonuçlarının retrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı rutin seroloji ve moleküler tanı laboratuvarlarımıza toksoplazmozis ön tanısı ile başvuran hastalardan alınan kan, beyin omurilik sıvısı (BOS), amniyon sıvısı, perikard sıvısı, apse örneklerine anti-*T.gondii*-IgG ve anti-*T.gondii*-IgM ELISA, anti-*T.gondii*-IgM IFAT ve anti-*T.gondii*-IgG avidite serolojik testleri ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testleri uygulanmıştır. Taranan 6547 hastadan kadın hastaların %3.3'ü (n= 220) yalnız IgM pozitifken, hem IgG hem de IgM pozitif olanların oranı %9.2 (n= 598) olarak tespit edilmiştir. Erkek hastalarda pozitiflik oranları daha düşük olup yalnız IgM seropozitif hastalar %0.6 (n= 45) iken, hem IgG hem de IgM pozitif olan hastaların oranı %0.8 (n= 47) olarak belirlenmiştir. Toplam hasta sayısının %6.4'ünü (n= 425) oluşturan yenidoğanlarda IgG ve IgM antikorlarının pozitif olduğu olgu sayısı 20 (%0.3), tek başına IgM seropozitif olanların sayısı 25 (%0.4) olarak saptanmıştır. Yalnız IgM antikorları bakımından pozitif olan 290 hastaya ait örneklerde Indirect Fluorescent Antibody Technique (IFAT) yöntemi kullanıldığında bu hastaların 22'sinin anti-*T.gondii*-IFAT IgM pozitif olduğu tespit edilmiştir. Hastalarda IgM seropozitifliğine bakılmaksızın IgG antikorları bakımından pozitif olarak belirlenen hastalarda anti-*T.gondii* IgG avidite testi uygulanmış IgM negatif olan hasta serumlarının %0.7'sinde (n= 18) düşük avidite, %6.5'inde (n= 179) sınırdan avidite tespit edilmiştir. IgM pozitif hastaların %2.6'sında düşük avidite tespit edilmiştir. Anti-*T.gondii* IgM negatif ve IgG pozitif olarak değerlendirilen olgulardan PCR ile dokuzu pozitif, ikisi negatif olarak saptanmıştır. Bu hastalardan birinin seroloji testi sonrası gönderilen amniyon sıvısında PCR yöntemiyle pozitif sonuç belirlenmiştir. PCR ile 20 BOS örneğinde yedi örnek pozitif olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, anti-*T.gondii* IgM negatif ve IgG pozitif olduğu tespit edilen sekiz kan örneğinin daha sonra yapılan PCR sonucuna göre yedisinin pozitif ve birinin negatif olduğu tespit edilmiştir. Perikard sıvısı ve apse materyalleri ile çalışılan PCR testleri negatif olarak tespit edilmiştir. ELISA testlerinde

oluşabilecek yanlış negatiflikler veya çapraz reaksiyon sonucu yanlış pozitiflikler gibi şüpheli veya riskli durumlarda, altyapısı uygun olan laboratuvarların moleküler temelli testleri uygulaması ile gereksiz ilaç tedavisi veya girişimsel yaklaşımların önüne geçilebilir. Bu nedenle, riskli durumlarda serolojik testlere ek olarak moleküler testlerin uygulanmasının daha güvenilir sonuçlar verebileceği kanısındayız.

Anahtar kelimeler: *Toxoplasma gondii*; ELISA; IFAT; avidite; PCR.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a compulsory intracellular protozoan parasite with a wide range of host in warm-blooded vertebrates and has importance in terms of health and economy. Toxoplasmosis is very common because it can infect people with a variety of ways; ingestion of contaminated water and nutrients; raw or undercooked meats containing tissue cysts, blood transfusions, organ transplantantation and transplacental transfer. The aim of this study was to evaluate serologic and molecular test results of toxoplasmosis pre-diagnosed patients. Anti-*T.gondii*-IgG, anti-*T.gondii*-IgM ELISA, anti-*T.gondii*-IgM IFAT and anti-*T.gondii*-IgG avidity serological tests and PCR tests were applied by using blood, cerebrospinal fluid, amniotic fluid, pericardial fluid and abscess samples from patients who have admitted to Erciyes University Faculty of Medicine Department of Parasitology routine serology and molecular diagnosis laboratories with a pre-diagnosis of toxoplasmosis. Among 6547 patients 3.3% (n= 220) were only IgM positive, 9.2% were both IgG and IgM positive (n= 598). Among male patients, the positivity rates were lower and only IgM seropositive patients were 0.6% (n= 45) while the frequency of both IgG and IgM positive patients was 0.8% (n= 47). The number of both IgG and IgM seropositive cases among new borns, constituting 6.4% (n= 425) of the total number of patients, was 20 (0.3%) and the number of IgM seropositive samples was 25 (0.4%). Only 290 patients positive for IgM antibodies were studied for IFAT and 22 of these patients were positive for anti-*T.gondii*-IFAT IgM. Anti-*T.gondii* IgG avidity test was performed in all IgG positive patients regardless of their IgM seropositivity; low avidity was found in 0.7% (n= 18) of IgM-negative patients' sera and equivocal avidity was detected in 6.5% (n= 179). Low avidity was detected in 2.6% of IgM positive patients. Nine of the patients evaluated as anti-*T.gondii* IgM negative and IgG positive were detected as positive by PCR and two of them were negative. One of these PCR-positive patient's amniotic fluid was sent after the serological test results and detected as positive. Twenty CSF samples were studied by PCR and 7 samples were positive. Also, 8 blood samples which were anti-*T.gondii* IgM negative and IgG positive were found to be positive in 7 and negative in one sample with PCR results, subsequently. PCR tests with pericardial fluid and abscess materials were found to be negative. In the case of suspicious or risky situations such as false negatives or false positives resulting from cross-reaction that can occur in ELISA tests, unnecessary medication or interventional approaches can be avoided by applying molecular-based testing at laboratories with appropriate infrastructure. For this reason, we believe that the application of molecular tests in addition to serological tests in risky situations may give more reliable results.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; ELISA; IFA; avidity; PCR.

GİRİŞ

Toxoplasma gondii, çeşitli memeli ve kuş türlerini enfekte eden zorunlu hücre içi protozoon parazittir. *T.gondii*, geniş bir konak yelpazesi olan, sağlık ve ekonomi açısından önem arz eden bir parazit olarak kabul edilmektedir. Hem kasaplık hayvanlarda hem de insanlarda transplasental olarak bulaşması sonucunda düşük, ölü veya hastalıklı doğumlara neden olmaktadır. Ayrıca immünokompromize hastalarda diğer birçok organ tutulumu yanında beyin tutulumu sonucu oluşturduğu meningoensefalit tablosu ile ölümlere sebep olmaktadır. İnsanlar enfeksiyonu, kontamine su ve besinleri tüketerek, doku kisti içeren etleri çiğ veya az pişmiş şekilde yiyerek, kan nakli, organ nakli ve transplasental geçiş gibi değişik yollarla alabildiği için, toksoplazmozis son derece yaygın görülmektedir. Bu tip parazitozlarda toplumların gelenekleri ve beslenme alışkanlıkları hastalığın boyutlarını doğrudan etkileyen faktörler arasında önemli bir yer tutmaktadır¹⁻⁵.

Ülkemizde yapılan çok sayıda seroprevalans araştırması 40 yaşın üstündeki popülasyonda %60'ın üzerinde *T.gondii* seropozitifliği bulunduğunu göstermektedir⁶. Sadece gebeler incelendiğinde, IgG pozitifliğinin %34-70 arasında değiştiği, düşük, ölü doğum, erken doğum yapmış olanlarda ise %37-84 arasında bulunduğu bildirilmiştir⁶.

Toksoplazmozisin klinik belirtileri patognomonik olmayıp, yerleştiği organa göre değişmektedir. Doğru tanı koyabilmek için değişik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler, doğrudan ve dolaylı tanı yöntemleri olmak üzere iki grup altında incelenebilir. Doğrudan tanı; etken izolasyonu, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), antijen spesifik lenfosit transformasyonu, lenfosit kopyalama tekniği ve histolojik yöntemler ile yapılmaktadır. Dolaylı yöntemler, *T.gondii*'ye özgü antikorları belirlemek üzere kullanılan serolojik testleri kapsamaktadır. Olgunun durumuna göre bu yöntemlerden biri seçilmektedir. Vücut sıvıları dışında diğer dokularda da PCR ile konjenital, oküler ve yaygın toksoplazmozisin tanısı konulabilmektedir. Konjenital toksoplazmozisde; gebenin toksoplazmozis tanısında, serolojik yöntemler öncelikli düşünülse de gebeliğin on sekizinci haftasından sonra amniyon sıvısında PCR çalışmak bebeğe bulaşın tanısında daha başarılı sonuç vermektedir. Amniyon sıvısında %65-80, plasenta örneğinde %60, beyin omurilik sıvısı (BOS)'nda %17-100 ve oküler toksoplazmozis olgularında %100 oranında başarı sağlanmaktadır. Gebelik esnasında konjenital toksoplazmozis tanısı yalnız PCR ile konulabilmekte ve fare peritonu içinde takizoitlerin üretimi ile PCR'nin beraber kullanımı %60 oranında başarı sağlamaktadır⁵. Hastalığın serolojik tanısı, enfeksiyonun genellikle subklinik seyrettiği durumlarda oldukça önem kazanmaktadır. Akut enfeksiyon sırasında ilk önce IgM antikorları yükselmektedir. Bu antikorlar 4 hafta içinde en yüksek seviyeye ulaştıktan sonra 6-8 aylık bir süreçte gerilemektedir. IgG antikorları daha geç oluşmaya başlayıp 1-2 ay içinde en yüksek seviyelerine ulaşmaktadır. Nüks olmayan durumlarda 2 yıl içinde gerilemektedir. "Indirect Fluorescent Antibody Technique (IFAT)" yöntemi canlı parazite ihtiyaç duyulmaması nedeniyle avantajlıdır. IgM antikorlarını saptayarak akut toksoplazmozisi belirlemektedir. Dezavantajı pahalı gereçlere ihtiyaç duyulmasıdır. ELISA, toksoplazmozisdeki fraksiyonları saptama olanağı ile akut-kronik toksoplazmozis ayrımı ve konjenital olguların takip edilmesinde tercih edilmektedir. Günümüzde toksoplazmozis tanısında ELISA'nın IgG, IgA ve IgE için özelleşmiş alt türleri ve IgM için de "double sandwich" yöntemi kullanılmaktadır. Konjenital toksoplazmozis şüphesi ile doğan bebeklerde çeşitli radyolojik tetkiklerle konjenital toksoplazmozisin karakteristik belirtilerinden olan kafa içi kalsifikasyon ve göz tetkikleriyle koryoretinit taraması yapılmaktadır⁷⁻⁹.

Çalışmada, toksoplazmozis şüpheli hastalara ait serolojik ve moleküler test sonuçlarının retrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma için Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onayı (Tarih: 21.03.2018 ve Karar no: 208/168) alındı.

Hasta Örnekleri

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı rutin seroloji ve moleküler tanı laboratuvarlarımıza toksoplazmozis ön tanısı ile başvuran hastalardan alınan kan, BOS, amniyon sıvısı, perikard sıvısı, apse örneklerine serolojik ve moleküler testler uygulandı. Buna göre çalışmada, toksoplazmozis ön tanısı konulan 6547 hastanın verisi retrospektif olarak değerlendirildi.

Serolojik Testler

Anti-*Toxoplasma gondii*-IgG ve anti-*T.gondii*-IgM ELISA testleri için DIAPRO ticari kiti (Milano, İtalya) kullanıldı. Tüm analiz işlemi imalatçının önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Örnekler, 1:100 oranında seyreltilerek ve kuyucuklara 100'er µl konuldu. Her kalibratörün 100 µl'si ile negatif ve pozitif kontroller de kuyucuklara dağıtıldıktan sonra 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Yıkamadan sonra, kuyucuklara 100 µl konjugat ilave edildi ve plaklar, 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Son bir yıkama adımından sonra, antikorlar 100 µl "3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine substrat ile tespit edildi. Reaksiyon 20 dakika sonra 100 µl 0.1 M H₂O₂ ile durduruldu ve plaklar bir ELISA okuyucuda 450 nm ile 620 nm dalga boyunda okundu. Tüm serum örnekleri analiz edildi. Anti-*T.gondii*-IgM IFAT için Euroimmune ticari kiti (Lübeck, Almanya) kullanıldı. Serum örnekleri, eurosorb çözeltisinde vorteksleme ile yüzde 1:16 oranında seyreltildi ve daha sonra ticari kit işlemine göre 3500 x g'da 5 dakika santrifüj edildi. Antijen kaplı preparatlara, 30 µl seyreltilmiş serum örneklerinin supernatantı eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra preparatlar, 5 dakika boyunca PBS solüsyonu ile yıkandı ve 25 µl'lik konjuge antijen-antikorla kaplı alanlara eklendi. Karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra yıkama işlemi tekrarlandı. Preparatlar 480 nm dalga boyundaki flüoresan mikroskopu ile incelendi. Anti-*T.gondii*-IgG avidite testi için Euroimmune (Lübeck, Almanya) ticari kiti kullanıldı. Seyreltilmiş her serum örneğinin 100 µl'si, negatif ve pozitif kontroller kuyucuklara çift sıra halinde dağıtıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Sonra bir kez 300 µl yıkama çözeltisi ile yıkandı, ardından çift sıra halinde dağıtılmış olan örneklerden ilk sıradaki kuyucuklara 200 µl fosfat, ikinci sıradaki kuyucuklara 200 µl üre eklendi. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Sonra kuyucuklar tekrar 3 kez yıkandı. Kuyucuklara 100 µl konjuge eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Son yıkamadan sonra 100 µl TMB substrat eklendi. Tepkime, 15 dakika sonra 100 µl 0.1 M H₂O₂ ile durdurularak, kuyucuklar bir ELISA okuyucuda 450 nm ile 620 nm dalga boylarında okunarak, tüm serum örnekleri analiz edildi.

Moleküler Testler

Hasta örneklerinden 200 µl alınarak ticari kit (Qiagen, ABD) işlemine göre DNA izolasyonu yapıldı. SYBR Green karışımı (2x) 10 µl, her bir primer 1 µl, kalıp DNA 5 µl, dH₂O 3 µl olacak şekilde qPCR karışımı hazırlandı ve uygun sıcaklık döngüsüne göre gerçekleştirildi (Tablo I). Örnekler aynı zamanda konvansiyonel PCR yöntemi ile incelendi. Amplifikasyon tepkimeleri; 12.5 µl (2x) amplifikasyon karışımı, 5 µl kalıp DNA, her bir primer 1 µl olacak şekilde hazırlanan karışım ile gerçekleştirildi (Tablo I). PCR ürünleri %1.5 agaroz jelde yürütüldü ve ardından DNA bantları görüntüleme cihazında (Chemidoc MP, Biorad, ABD) görüntülendi ve değerlendirildi.

Tablo I. *Toxoplasma gondii* Moleküler Tanısında Kullanılan Primerler

Hedef gen	Primer adı ve dizisi	PCR ürün büyüklüğü
B1	Tg 1: 5'-AAAAATGTGGGAATGAAAGAG-3' Tg 2: 5'-ACGAATCAACGGAATGTAAT-3'	469 bç
Repeat region	Tg AF 146527 RT F: 5'-GAGACAGAGTCGGAGGCTTG-3' Tg AF 146527 RT R: 5'-GTGCATCTGGATTCTCTCC-3'	62 bç
B1	Tg B1 RT F: 5'-CCCACCACGCAGAATCAT-3' Tg B1 RT R: 5'-CATTGTGCGGCTACTTTAGAAAC-3'	64 bç
529 bp RE	Tg repr 529 RT F: 5'-GTAGATGAAGGCGAGGGTGA-3' Tg repr 529 RT R: 5'-TCCGGTGTCTCTTTTCCAC-3'	68 bç

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

BULGULAR

Bu çalışmada, 2013 Haziran-2017 Haziran tarihleri arasında farklı polikliniklerden gelen hasta örneklerinin sonuçları *T.gondii* pozitifliği yönünden taranmıştır. Serum örneklerinde anti-*T.gondii* ELISA ile antikor aranmasının yanı sıra kan, BOS, amniyon sıvısı, perikard sıvısı, beyin apse materyallerinde PCR ve qPCR yöntemleriyle *T.gondii* DNA varlığı araştırılmıştır. Taranan kadın hastaların %3.3'ü (n= 220) yalnız IgM pozitifken, hem IgG hem de IgM pozitif olanların oranı %9.2 olarak bulunmuştur (n= 598). Erkek hastalarda pozitiflik oranları daha düşük olup yalnız IgM seropozitif hastalar %0.6 (n= 45) iken, hem IgG hem de IgM pozitif olan hastaların oranı %0.8 (n= 47) olarak tespit edilmiştir. Toplam hasta sayısının %6.38'ini (n= 425) oluşturan yenidoğanlarda IgG ve IgM antikorlarının pozitif olduğu olgu sayısı 20 (%0.3), tek başına IgM seropozitif olanların sayısı 25 (%0.38) olarak belirlenmiştir (Tablo II).

Hastalarda IgM seropozitifliğine bakılmaksızın IgG antikorları bakımından pozitif olarak belirlenen hastalarda anti-*T.gondii* IgG avidite testi çalışılarak IgM negatif olan hasta serumlarının %0.7'sinde (n= 18) düşük avidite, %6.5'inde (n= 179) sınırdan aşan avidite tespit edilmiştir. IgM pozitif hastaların %2.6'sında düşük avidite tespit edilmiştir. Düşük avidite akut enfeksiyon lehine olmakla beraber her zaman akut enfeksiyonu göstermemektedir. Avidite matürasyonunda gecikmeler olabilmektedir. Bu nedenle, IgM pozitifliği olan 72

Tablo II. Cinsiyete Göre Anti-*T.gondii* IgM ve IgG Değerleri

Sonuçlar	Erkek		Kadın		Yenidoğan		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%
IgG (-) IgM (-)	428	6.5	2715	41.5	350	5.3	3493	53.35
IgG (+) IgM (-)	185	2.8	1884	29	30	0.4	2099	32.06
IgG (-) IgM (+)	45	0.6	220	3.3	25	0.38	290	4.42
IgG (+) IgM (+)	47	0.8	598	9.2	20	0.3	665	10.15
Toplam	705	10.7	5417	83	425	6.38	6547	100

hastada daha muhtemel olmakla beraber, 90 hastanın olası akut toksoplazmozis bulgusu olan düşük avidite değerlerine sahip olduğu saptanmıştır (Tablo III). Sadece IgM antikorları bakımından pozitif olan 290 hastaya IFAT çalışılmış ve bu hastaların 22'sinin anti-*T. gondii*-IFAT IgM pozitif olduğu tespit edilmiştir.

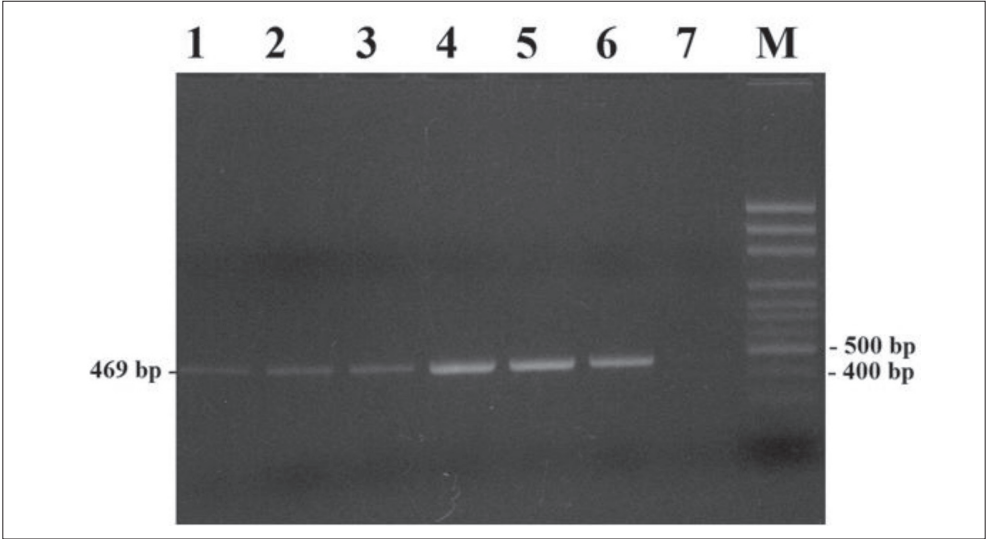
Farklı kliniklerden moleküler yöntemler ile inceleme yapılması için gönderilen örneklerle (Tablo IV) doktor istemine bağlı olarak PCR ve qPCR yöntemleri karşılaştırmalı uygulanmıştır. Buna göre, 149 kan örneği içerisinde iki kadın hasta ve bir yenidoğan hasta örneğinin sonucu pozitif olarak saptanmıştır (Şekil 1,2). Moleküler tanı laboratuvarımıza ulaştırılan toplam 16 farklı amniyon sıvısından sekizinin sonucu pozitif bulunmuştur. BOS materyalinin incelenmesi sonucunda dört kadın hasta, iki erkek hasta ve bir yenidoğan örneği pozitif olarak değerlendirilmiştir. Kadın hastadan gönderilen apse materyali ve yenidoğandan alınan perikard sıvısı negatif olarak belirlenmiştir (Tablo V). Anti-*T.gondii* IgM negatif ve IgG pozitif olarak değerlendirilen hasta gruplarına ait kan örneklerinin dokuzu pozitifken, ikisi PCR ile negatif olarak saptanmıştır. Bu hastalardan birinin seroloji testi sonrası gönderilen amniyon sıvısı ile PCR çalışılarak pozitif sonuç elde edilmiştir. Ayrıca, seronegatif sekiz örneğin yedisi PCR ile pozitif olarak saptanırken, bir olgunun negatif sonuç verdiği tespit

Tablo III. Anti-Toxoplasma gondii IgG Pozitif Olguların IgM Pozitifliğine göre Anti-Toxoplasma gondii IgG-Avidite Sonuçları

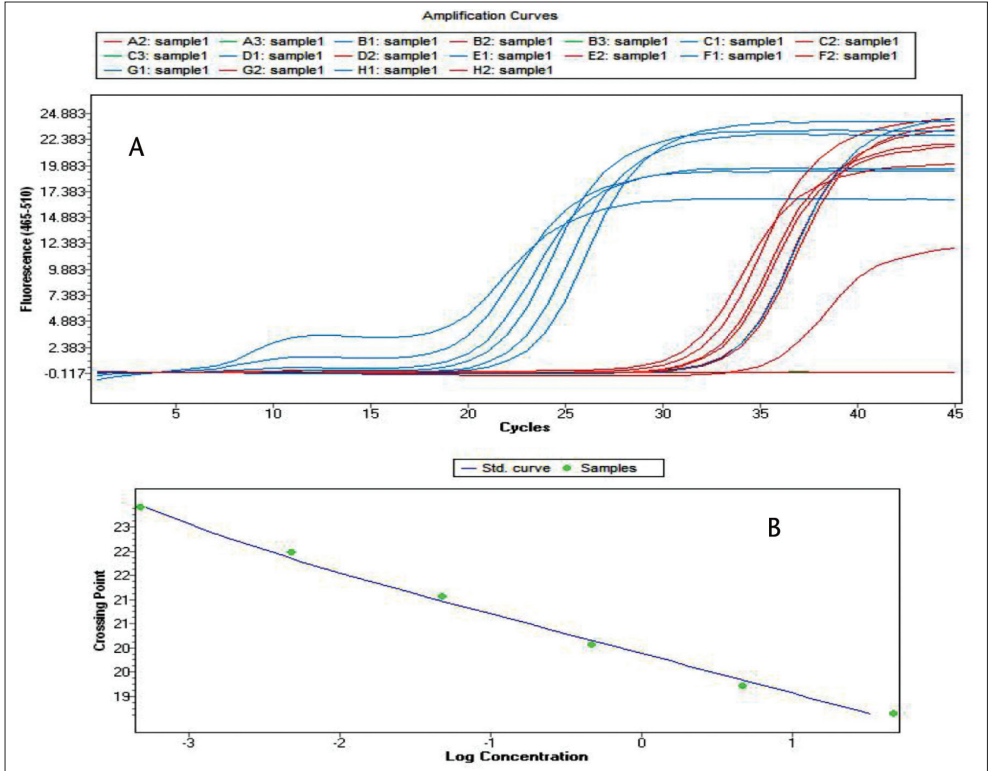
Anti-Toxoplasma gondii IgG-avidite	IgM (+) IgG (+)		IgM (-) IgG (+)		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Yüksek avidite	449	16.2	1902	68.8	2351	85
Düşük avidite	72	2.6	18	0.7	90	3.3
Sınırdan avidite	144	5.2	179	6.5	323	11.7
Toplam	665	24.05	2099	76	2764	100

Tablo IV. Toxoplasma gondii ile ilişkili Seroloji Tanı Laboratuvarımıza En Çok Örnek Gönderen Klinikler ve Hasta Sayıları

Bölüm	Hasta sayısı
Kadın Doğum Polikliniği	4142
Pediyatri Yenidoğan Polikliniği	425
Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği	266
Pediyatri Kemik İliği Transplantasyonu Polikliniği	306
Pediyatri Nöroloji Polikliniği	150
Göz Hastalıkları Polikliniği	252
Pediyatri Hematoloji ve Onkoloji Polikliniği	420
Diğer	586
Toplam	6547



Şekil 1. Hasta BOS örnekleri PCR ürünlerinin jel görüntüsü; 1-3: Hastalara ait PCR ürünleri, 4-6: Pozitif kontroller, 7: Negatif kontrol, M: 100 baz çifti (bp) DNA moleküler ağırlık belirteci (GeneAll, Güney Kore).



Şekil 2. qRT-PCR ile pozitif saptanan hastalar; A: Amplifikasyon eğrileri, B: Standart eğrisi.

Tablo V. Moleküler Tanı Laboratuvarımıza *Toxoplasma gondii* ile İlişkili Gelen Hasta Örnekleri ve Değerlendirme Sonuçları

Örnek	Kadın		Yenidoğan		Erkek		Toplam
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	
Kan	2	27	9	96	0	15	149
Amniyon sıvısı	8	8	-	-	-	-	16
BOS	4	2	1	9	2	2	20
Perikard sıvısı	-	-	0	1	0	0	1
Beyin apse	0	1	-	-	-	-	1

BOS: Beyin omurilik sıvısı.

Tablo VI. Farklı Hasta Gruplarından PCR ile Değerlendirilen Örneklerin Seropozitiflikleri

Moleküler testler (PCR, qRt-PCR)	Serolojik testler (anti- <i>Toxoplasma gondii</i> IgM ve IgG)							
	IgM (+)	IgG (+)	IgM (+)	IgG (-)	IgM (-)	IgG (+)	IgM (-)	IgG (-)
Pozitif	1		3		9		7	
Negatif	-		-		2		1	

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

edilmiştir (Tablo VI). PCR pozitif olgulardan, serolojik testler sonucu yalnız IgG pozitifliği bulunan sekiz hastadan birinde sınırda avidite, geri kalanlarında yüksek avidite, hem IgG hem de IgM pozitifliği bulunan bir hastada ise yüksek avidite tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

T.gondii, insan dahil memelileri ve kuşları enfekte edebilen, kozmopolit yayılışa sahip bir zoonozdur. Sıcak ve nemli yerlerde, soğuk ve kuru bölgelere göre daha yüksek oranda görülmektedir⁴. Dünyada bildirilen 38 salgın içinde; su kaynaklı 8 (%21), toprakla temas kaynaklı 10 (%26.3), kontamine sebze tüketimi kaynaklı 2 (%5.3), çiğ veya az pişmiş et tüketimi kaynaklı 17 (%44.7) salgın bulunmaktadır. Avustralya, Brezilya, Kanada, Kore ve Amerika'da kistle kontamine çiğ veya az pişmiş et tüketimine bağlı salgınlar; Kanada'da ve Brezilya'da ookistle kontamine su kaynaklı salgınlar; Brezilya'da, Amerika'da ve Birleşik Krallık'ta çiğ keçi sütü tüketimine bağlı salgınlar bildirilmiştir¹⁰. Tayland'da ise gebe kadınlarda; yaş, içme suyu kaynaklarının temizliği ve yerleşim yeri faktörlerinin seropozitifliğe etkili olduğu gösterilmiştir¹¹. Türkiye'de gebelerde, doğurganlık çağındaki kadınlarda, bazı yörelerde farklı yaş gruplarında ve değişik sosyoekonomik koşullara sahip bireylerde çok sayıda seroprevalans araştırması yapılmıştır. Doğurganlık çağındaki 943 olgunun retrospektif olarak değerlendirildiği çalışmada %28.5 anti-*T.gondii* IgG ve %0.9 anti-*T.gondii* IgM seropozitifliği belirlenirken, başka bir çalışmada 3 yıllık bir dönemde toksoplazmozis şüpheli gebe olan ve olmayan 1296 hastadan alınan kan örneklerinde gebelerde %24.2 IgG ve %0.7 IgM, gebe olmayanlarda %37 IgG ve %0.9 IgM seropozitifliği saptanmıştır^{12,13}. Benzer bir diğer çalışmada toplanan 322 örneğin %63.4 IgG ve %4 IgM pozitifken

gebelerde (n= 210) bu oranlar sırasıyla %39.5 ve %3.8 olarak tespit edilmiştir¹⁴. Gebelerde yapılan başka bir çalışmada yaş ortalaması 29 olan olguların IgG ve IgM pozitifliklerinin sırasıyla %28.8 ve %2.7 olduğu gebelerin %58.9'unun riskli davranış öyküsü bulunduğu bildirilmiştir¹⁵. Diğer bir çalışmada ilk trimesterde 16-48 yaş aralığındaki 2011 gebe olguda TORCH taranması ile %31.4 IgG ve %0.8 IgM seropozitifliği bildirilmiştir⁶. Benzer bir başka çalışmada anti-Rubella ve anti-CMV pozitiflikleri saptanan gebelerde anti-*T.gondii* IgG ve IgM pozitiflikleri sırasıyla %43.9 ve %2.5 olarak tespit edilmiştir¹⁶. Anti-*T.gondii* antikorlarının araştırılması amacıyla başvuran 1-68 yaş aralığındaki 1887 olgunun %24'ünde pozitiflik saptanmış ve bu sonucun yaş artışı ile pozitif korelasyonu olduğu bildirilmiştir¹⁷. Başka bir çalışmada ise erkeklerde seropozitiflik oranlarının kadınlara göre nispeten daha düşük olduğu gösterilmiştir¹⁸. Tarımcılıkla uğraşan bir popülasyonda doğurganlık çağındaki kadınlarda *T.gondii* seroprevalansının incelendiği bir çalışmada mevsimlik işçi olarak tarım çalışanı olmanın, artan yaşın, üç veya daha fazla gebelik geçirmiş olmanın, enfeksiyon riskini anlamlı oranda artırdığı gösterilmiştir¹⁹.

Bu çalışmanın sonuçlarının, literatürdeki mevcut çalışmaların sonuçlarını serolojik incelemeler bakımından destekler nitelikte olduğu tespit edilmiştir. Ancak, anti-*T.gondii* antikorları bakımından seronegatif görülen gebe ve yenidoğanlarda ELISA testinin doğrulanması için yapılan PCR testleri sonucunda sekiz olgunun yedisinin pozitif olduğu ve yalnız IgM seronegatif 11 olgunun yedisinin pozitif olduğu tespit edilmiştir. Bu, ELISA testinin moleküler yöntemler kadar duyarlı olmadığını göstermektedir. Moleküler testler ile pozitifliği saptanan hastaların serolojik test sonuçlarına bakıldığında sekiz hastada yalnız IgG pozitifliği tespit edildiği ve bu olguların da sınırda veya yüksek aviditesinin olduğu; hem IgG hem de IgM pozitifliği bulunan bir hastanın ise yüksek aviditesi olduğu tespit edilmiştir. Rutin tanı laboratuvarında TORCH panelinde bulunan anti-*T.gondii* IgG ve IgM ELISA testleri, gebeliğin ilk trimesterinde olan hastalarda çalışılmaktadır. İki hafta sonra kan örneklerinde yalnız IgM pozitifliği bulunan bu hastaların, tekrarlanan ELISA testi sonucunda bu durumun devam etmesi üzerine destekleyici bir test olarak kanda veya amniyon sıvısında qPCR testi çalışılmıştır. Anti-*T.gondii* IgM bakımından pozitif olduğu tespit edilen hastaların devam eden gebelik sürecinde bu testler ile takibi yapılmıştır. Bu durum, çoğunluğu gebelerden ve yenidoğanlardan oluşan olgularda rekürens olabileceği ile açıklanabilir. Bununla birlikte, gebeliğinin geç döneminde serolojik test yapılan bir hastada, gebeliğin erken döneminde geçirilmiş bir enfeksiyona bağlı olarak oluşan IgM antikorları negatifleşmiş olabilir ancak bebekte intrauterin bulaş gerçekleştiğinden özellikle 18. haftadan sonra alınacak amniyon sıvısında çalışılan PCR ile doğru tanının konulabilmesi mümkün olabilir.

Sonuç olarak, ELISA test sonuçlarının bu gibi durumlarda PCR ve qPCR sonuçları ile karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir. ELISA testlerinde oluşabilecek yanlış negatiflik veya çapraz reaksiyon sonucu yanlış pozitiflik gibi şüpheli veya riskli durumlarda, altyapısı uygun olan laboratuvarların moleküler temelli testleri uygulaması ile gereksiz ilaç tedavisinin veya girişimsel yaklaşımların önüne geçilebilir. Bu nedenle, riskli durumlarda serolojik testlere ek olarak moleküler testlerin uygulanmasının daha güvenilir sonuçlar verebileceği kanısındayız.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Kaye A. Toxoplasmosis: Diagnosis, treatment, and prevention in congenitally exposed infants. J Pediatr Health Care 2011;25(6):355-64.
2. Hökelek M, Açıcı, M. Toxoplasmosis, pp:803-30. In: Doğanay M, Altıntaş N (eds) Zoonozlar: Hayvanlardan insanlara bulaşan enfeksiyonlar. 2009, Vol:1. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.
3. Saygı G. Paraziter hastalıklar ve parazitler, pp:143-54. 2009, Vol:1. Es Form Ofset Ltd. Şti, Göztepe, İzmir.
4. Doğan KB. Uzmanlık tezi: Gebelerde *Toxoplasma gondii* ve sitomegalovirüs seropozitiflik, serokonversiyon ve fetusa geçiş oranının değerlendirilmesi. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya 2006.
5. Döşkaya M, Gürüz Y. *Toxoplasma gondii*'de moleküler yapı çalışmaları pp:429-52. In: Özcel M A, Tanyüksel M, Eren H (eds) Moleküler Parazitoloji. 2009, Vol:1. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, Bornova, İzmir.
6. Doğan K, Güraslan H, Özel G, Aydan Z, Yaşar L. Gebelerde *Toxoplasma gondii*, Rubella, Sitomegalovirüs, Sifiliz ve Hepatit B seropozitiflik oranları. Türkiye Parazit Derg 2014;38:228-33.
7. Garcia LS. Diagnostic Medical Parasitology, pp:130-41. 2007, Vol:5. ASM Press, Washington.
8. Gürüz Y, Delibaş SB. Toxoplasmosis ve İmmünolojisi, pp:167-94. In: Özcel MA, Turgay N, İnci A, Köroğlu E (eds) Tıbbi ve veteriner immünoparazitoloji. 2007, Vol:1. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, Bornova, İzmir.
9. Yazar S, Kuk S, Miman Ö, Saygı G. Saygı'nın temel tıbbi parazitoloji'si. 2016, 1. Baskı. Kayseri: Erciyes Üniversitesi Yayınları.
10. Meireles LR, Ekman CC, Andrade HF Jr, Luna EJ. Human Toxoplasmosis outbreak and the agent infecting form. Findings from a systematic review. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2015;57(5):369-76.
11. Andiappan H, Nissapatorn V, Sawangjaroen N, Chemoh W, Lau YL, Kumar T, et al. Toxoplasma infection in pregnant women: a current status in Songklanagarind hospital, southern Thailand. Parasites Vectors 2014;7:239.
12. Yazıcı V, Kale A, Malatyali E, Ertaçlar H. Kocaeli Derince'de *Toxoplasma gondii* serolojisi için gönderilen doğurganlık yaş grubundaki olgulara ait sonuçların retrospektif olarak değerlendirilmesi. Türkiye Parazit Derg 2014;38:223-7.
13. Selek MB, Bektore B, Baylan O, Ozyurt M. Üçüncü basamak bir eğitim hastanesinde 2012-2014 yılları arasında gebelerde ve toksoplazmosis şüpheli hastalarda *Toxoplasma gondii*'nin serolojik olarak araştırılması. Türkiye Parazit Derg 2015;39:200-4.
14. Demiroğlu T, Polat ZA, Celik C. Kilis Devlet Hastanesi Kadın Doğum Polikliniğine başvuran doğurgan çağıdaki kadınlarda *Toxoplasma gondii* seropozitifliğine etki eden risk faktörlerinin araştırılması. Türkiye Parazit Derg 2015;39:299-304.
15. Gencer M, Cevizci S, Saçar S, Vural A, Cakır Güngör AN, Uysal A, et al. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Obstetri Polikliniğine müracaat eden gebelerde anti-*Toxoplasma gondii* antikorlarının dağılımı ve risk faktörlerinin irdelenmesi. Türkiye Parazit Derg 2014;38:76-80.
16. Aynioğlu A, Aynioğlu O, Altunok ES. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, Rubella and Cytomegalovirus among pregnant females in north-western Turkey. Acta Clinica Belgica 2015;70(5):321-4.
17. Aşçı Z, Akgün S. Afyon İlinde bir seroloji laboratuvarına *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*) antikorları araştırılması amacıyla başvuran olgulara ait sonuçların değerlendirilmesi. Türkiye Parazit Derg 2015;39:9-12.
18. Alver O, Göral G, Ercan İ. Investigation of serological results of patients with suspected Toxoplasmosis admitted to the ELISA laboratory of Uludağ University Hospital between 2002-2008. Türkiye Parazit Derg 2014;38:141-6.
19. Doni NY, Simsek Z, Gurses G, Yıldız Zeyrek F, Demir C. Prevalence and associated risk factors of *Toxoplasma gondii* in female farm workers of southeastern Turkey. J Infect Dev Ctries 2015;9(1):87-93.