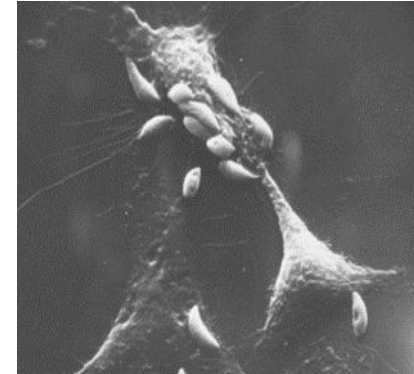
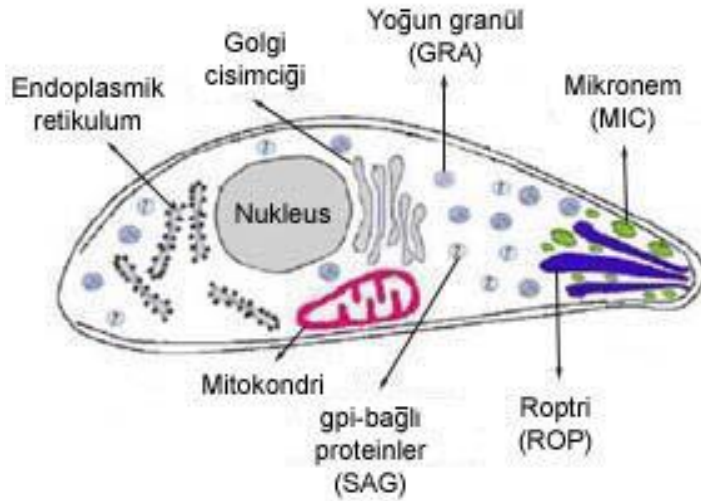


İmmünsüpresif hastalar için önem taşıyan bazı etkenlerin mikrobiyolojik tanısı;
Toxoplasma gondii

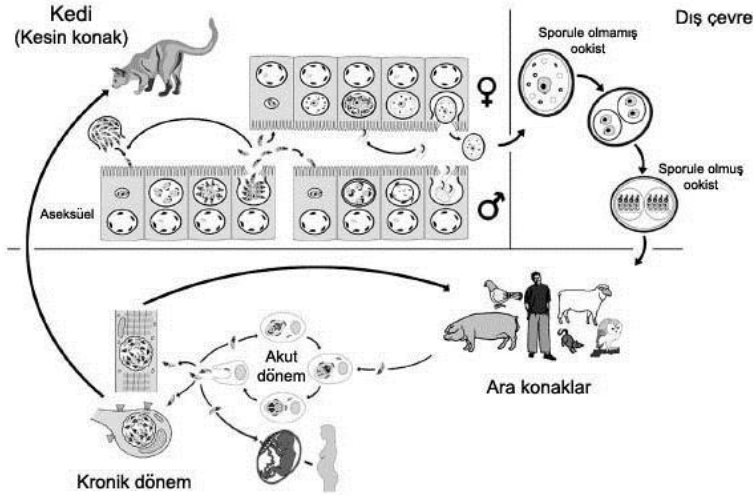
Prof. Dr. A. Yüksel GÜRÜZ
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

Toxoplasma gondii

- Geniş konak çeşitliliği sebebiyle medikal önemi yüksek bir protozoondur.



Epidemiyoloji



- İnsan enfeksiyonları sıklıkla;
 - ✓ kedi dışkısı ile atılan *T. gondii* ookistleri ile kontamine olmuş su ve besinlerin tüketilmesi,
 - ✓ doku kisti içeren etlerin çiğ veya az pişmiş şekilde yenmesi,
 - ✓ akut enfekte anneden fetusa transplental yolla bulaş ile geliştiği gösterilmiştir.

Epidemiyoloji

- 500 milyon insanın enfekte
 - ✓ Avrupa'da % 37-58 (Paris'te % 67.3)
 - ✓ A.B.D.'de % 22,5
 - ✓ Türkiye'de % 30-60
- Yaşla toxoplasmosis prevalansı artmaktadır.
- Toxoplasmosis tedavisinin yıllık maliyeti 7.7 milyar USD.
- Prevalans değerleri ve oluşan ekonomik etki göz önüne alındığında, Türkiye için de risk oldukça yüksektir.

Su kaynaklı salgınlar

- 1979 yılında Panama'da A.B.D. askeri birliğinde
- 1995 yılında İngiliz Kolumbiya'sı, Büyük Victoria'da 7718 kişi
- 2001 yılında Güney Brezilya'nın Parana eyaleti Santa Isabel do Ivai' da yüzlerce insan
- 2002 yılında, İzmir'de, askeri hava harp okulunda 171 pilot adayı

Kategori B Biyoterörizm Ajanı

Epidemiyoloji

İmmun sistemi baskılanmış kişilerde

- ✓ Dünya genelinde immün sistemi baskılanmış hasta sayısındaki artış, toxoplasmosis reaktivasyonu riskini de arttırmaktadır.
- ✓ İS baskılanmış hastalarda toxoplasmosise bağlı morbidite ve mortalite, tanıda geç kalınması, özgün tedaviye veya profilaksiye en kısa sürede başlanılamaması sebebiyle yükselmektedir.

Epidemiyoloji

- HIV ile enfekte hastalar arasındaki toxoplasmosis prevalansı ABD'de %15-40 iken batı Avrupa ve Afrika'nın belirli bölgelerinde % 96'ya kadar çıkmaktadır.
- Transplant alıcılarında değişik sıklıklarla toxoplasmosis geliştiği gözlemlenmiştir.

Epidemiyoloji

- Kalp, kalp-akciğer ve akciğer transplantasyonlarından sonra
 - Primer toxoplasmosis % 50-61,
 - Reaktivasyon ise % 1.2-2 oranında görülürken
- Renal transplantasyon alıcılarında %1,
- Kök Hücre Transplantasyon alıcılarında % 1-23,
- Karaciğer transplantasyon alıcılarında % 1-10 arasında değişen değerler bildirilmektedir.

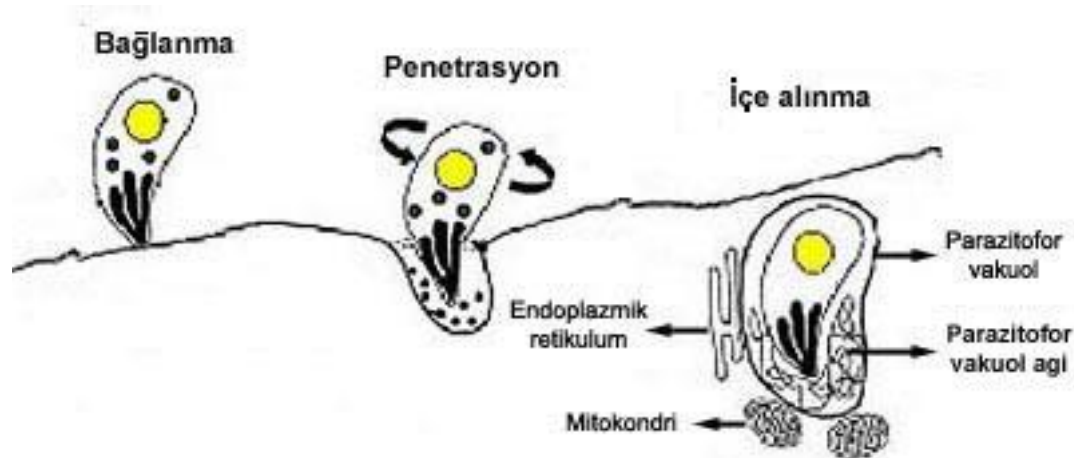
Epidemiyoloji

- İmmun sistemi baskılanmış hastalarda toxoplasmosis tanısındaki zorluklar insidans verilerine de olumsuz olarak yansımaktadır.
- Çünkü;
 - ✓ **Kliniği atipiktir,**
 - ✓ **Serolojik tanı yetersiz kalabilir (Baskılanmış immün sistem = Yetersiz Antikor yanıtı)**
 - ✓ **Moleküler Tanı yöntemleri yaygın kullanılmamaktadır.**

Patogenez

T.gondii'nin bir hücreyi invazyonu

- Üç basamakta gerçekleşir;
 - Bağlanma,
 - Parazitin aktin-myozin sistemi ile penetrasyon,
 - Parazitofor vakuol oluşumu ile hücre içine giriş
- Enfeksiyonun kronikleşmesiyle doku kistleri içindeki bradizoitler öncelikle beyin ve kas dokusuna yerleşir.



Klinik

- ✓ İmmun sistemi sağlam kişilerde oluşan toxoplasmosis
- ✓ İmmun sistemi baskılanmış kişilerde toxoplasmosis
- ✓ Oküler toxoplasmosis (toxoplasmik retinokoroidit)
- ✓ Konjenital toxoplasmosis

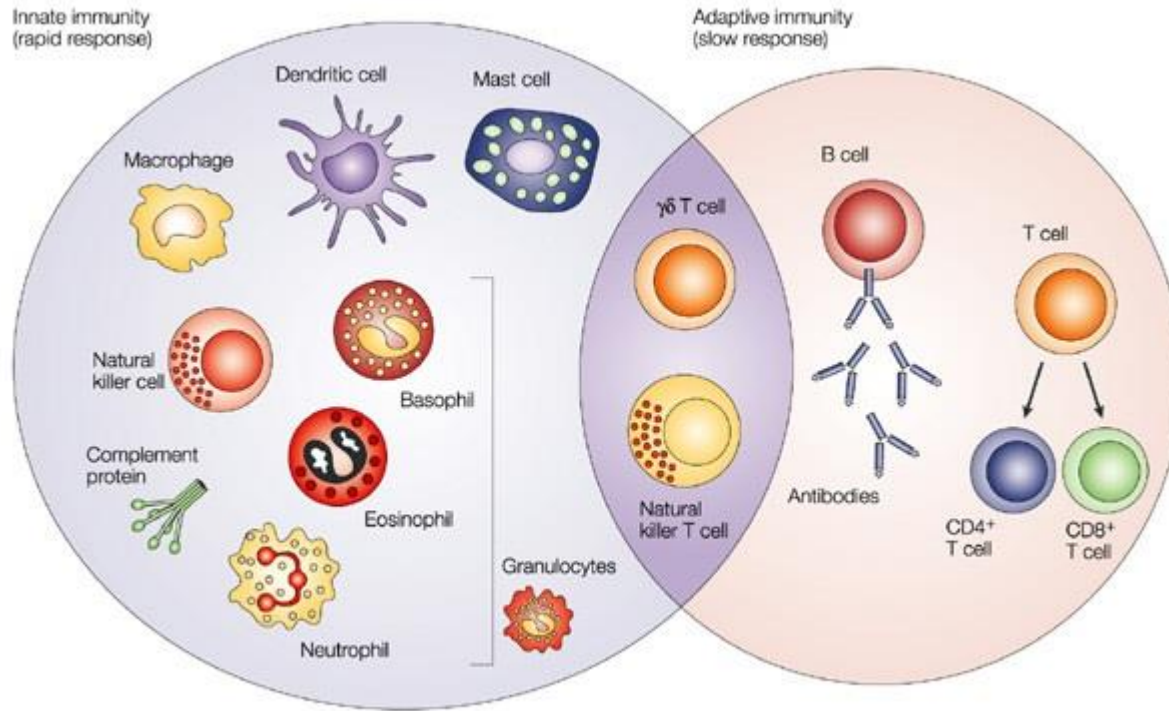
İmmun sistemi baskılanmış kişiler

- İmmun sistemi baskılanmış hastalarda sıklıkla reaktivasyon, nadiren primer enfeksiyon şeklinde görülür fakat hayati tehdit eden klinik tablolara yol açar.



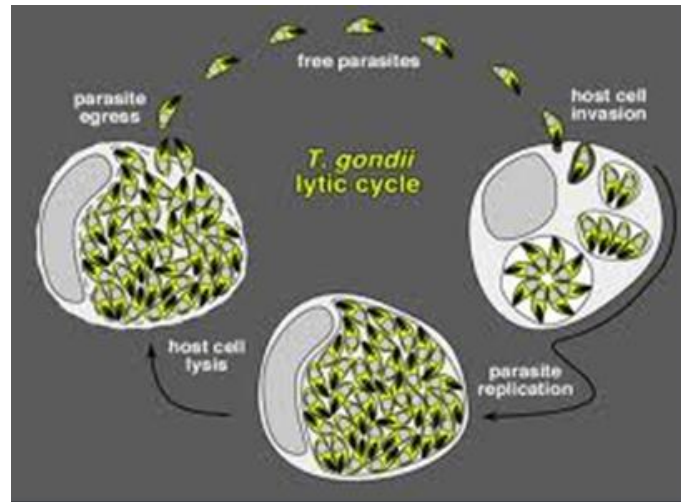
İmmun sistemi baskılanmış kişiler

- Vakaların çoğunda hem hücresel, hem de humoral immün yanıt bozulmuştur.



İmmun sistemi baskılanmış kişiler

- Bir kere enfekte olan kişilerde beyinde oluşan doku kistleri gelişmez ve toxoplazmik ensefalit gelişir.
- Yırtılan doku kistinden serbestleşen bradizoitler komşu hücreleri istila eder, immün yanıtla karşılaşmadığı için takizoitlere dönüşerek daha hızlı çoğalmaya başlarlar.
- Doku nekrozu artar, kontrol edilmez ise hızla fatal bir tabloya dönüşür.



İmmun Sistemi Baskılanmış Hastalar

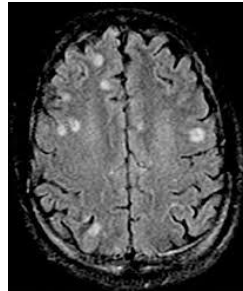
- AIDS hastalarında olduğu gibi transplantasyon hastalarında da CD₄ lenfosit sayısı <200 hücre/ml ise TE riski artar.
- Ayrıca transplantasyon alıcılarında doku rejeksiyonu (GVHD) gelişmesini engellemek için verilen profilaksi, gelişen GVHD'nin tedavisinde kullanılan ajanlar immün cevabın daha da bozulmasına yol açmakta, reaktivasyon olasılığını arttırmaktadır.

İmmun Sistemi Baskılanmış Hastalar

- Kemik iliği transplant alıcılarında ve AIDS hastalarında toxoplasmosis genelde latent enfeksiyonun reaktivasyonu şeklinde görülürken,
- Kalp transplant alıcılarında ise genelde seronegatif alıcıya, seropozitif donörden kalp nakledilmesine bağlı primer toxoplasmosis geliştiği yayınlanmıştır.
- Her iki tablo da ağır ve dissemine toxoplasmosis kliniği ile seyreder.

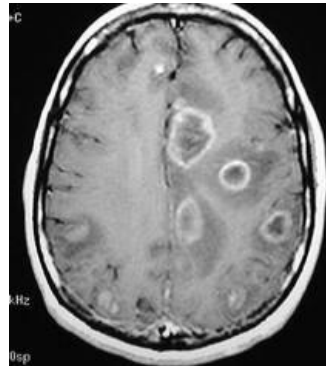
İmmun Sistemi Baskılanmış Hastalar

- Bu hastalarının klinik tablosunda en sık saptanan bulgu ateş olup (%45-80), ayrıca tutulan organlara ait bulgular tabloya eklenmektedir.
- En sık tutulan organlar
 - ✓ beyin (toxoplasmik ensefalit)
 - ✓ akciğer (toxoplasmik pnömoni)
 - ✓ göz (toxoplasmik retinokoroidit)



İmmun sistemi baskılanmış kişiler

- TE en sık AIDS ve allojenik KHT hastalarında bildirilmektedir.
- TE çoğunlukla transplantasyon sonrası ilk üç ay içinde görülmekte, erken dönemde gelişen TE'in mortalite oranı hastalığın geç dönemlerinde görüleden daha yüksek olduğu bildirilmiştir.
- Bu hastalarda TE'e bağlı mortalite oranı %55 olarak gösterilmiştir



Radyolojik Bulgular

- **Akciğer:** Direkt Akciğer grafilerinde yaygın bilateral alveoler/intertisyel infiltrasyonu seyreden intertisyel pnömoni bulgusu vardır.
- **Beyin:** Beyinde tek nodül veya bilateral multipl nodüler lezyonlar görülür;
 - ✓ AIDS hastalarında % 70-80 oranında bilateral multipl lezyonlar izlenir.
 - ✓ Lezyonlar genelde kortiko-medüller bölgede veya bazal ganglionlardadır
- MRI, BT'den daha hassastır.

Tanı

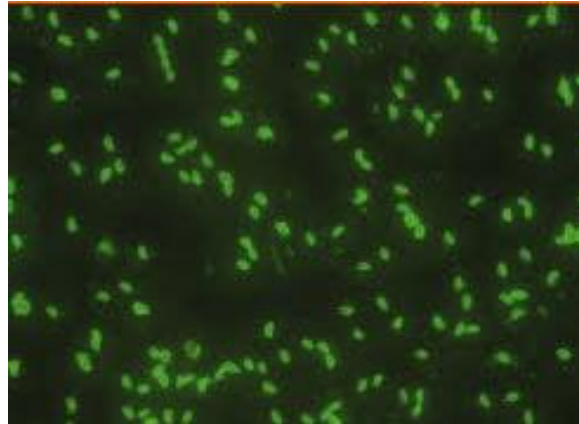
- ✓ **İndirekt Tanı:** Sabin Feldman Dye test, IFAT, ELISA, ISAGA, DA testi gibi *T.gondii*' ye karşı oluşan antikörleri göstermeye yönelik yöntemler
- ✓ **Direkt Tanı:** PZR, izolasyon ve histoloji gibi parazitin kendisini, DNA'sını görmeyi/göstermeyi hedefleyen yöntemler

İndirekt tanı

- **Sabin Feldman Dye Test**
 - ✓ Altın standart olarak kabul edilmektedir.
 - ✓ Antikor ve kompleman varlığında canlı takizoitlerin lizisine dayanır, özgünlüğü ve duyarlılığı yüksektir.
 - ✓ IgG antikorları araştırılmaktadır.

İndirekt tanı

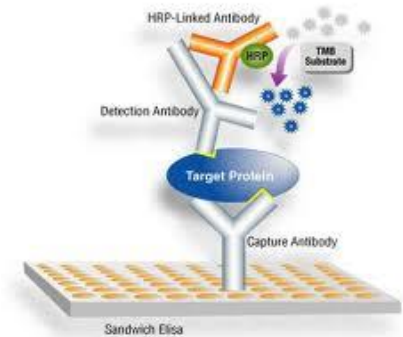
- **İndirek Flouresan Antikor Testi (İFAT)**
 - ✓ Belli dalga boyunda fluoresans veren bileşiklerle işaretli anti-antikorlar, lam üzerindeki takizoitlere bağlanan şüpheli serumdaki özgün antikorları görünür hale getirir.
 - ✓ Konjuge değiştirilerek IgG ve IgM antikorları araştırılabilir.



İndirekt tanı

- **ELISA**

- ✓ Antijen antikor kompleksi peroksidaz, alkalen fosfataz gibi bir enzimle işaretli anti-insan antikorlarla görünür hale getirilir
- ✓ IgG, IgM, IgA ve IgE antikorlarının saptanmasında en sık kullanılan testtir. Canlı takizoit kullanılmadığı için riski azdır
- ✓ Avidite çalışmalarında da üre ve üresiz yıkama aşamaları ile IgG ELISA yöntemi kullanılır.



İndirekt tanı

- **IgG-Avidite Testi**

- ✓ İmmunojenik olarak aktif bölgenin bağlantı gücünü ortaya çıkarmaya yarayan, spesifik IgG antikorlarının fonksiyonel afinitesinin ölçümü esasına dayan.
- ✓ Avidite ile antijenin antikora bağlanma gücü derecelendirilerek enfeksiyonun başlangıç zamanı belirlenmeye çalışılır.

$$\text{Avidite indeksi} = \frac{\text{Üre ile yıkama sonrası OD}}{\% 2.5 \text{ PBS-CB ile yıkama sonrası OD}} \times 100$$

| | | |
|---------------------------|---|-----------------|
| Avidite indeksi < % 20 | : | Düşük avidite |
| Avidite indeksi % 20 – 30 | : | Şüpheli avidite |
| Avidite indeksi > % 30 | : | Yüksek avidite |

İndirekt tanı

- **IgM-ELISA**

- ✓ Akut toxoplasmosisin tanısında önemli bir yöntemdir.
- ✓ İlk iki haftada artış gösteren IgM antikorlar enzim ile işaretli anti-human IgM monoklonal antikorları kullanılarak saptanmaktadır.

Enzim Immün Assay IgM değerinin hesaplaması ve değerlendirilmesi

$$EIU = \frac{\text{Örnek absorbens-Negatif kontrol absorbens}}{\text{Pozitif kontrol absorbens-Negatif kontrol absorbens}} \times 100$$

| EIU değerleri | Yorum |
|---------------|-------------------|
| < 20 | Negatif |
| 21-40 | Sınırdaki pozitif |
| 41-100 | Pozitif |
| >100 | Kuvvetli pozitif |

İndirekt tanı

- **IgM -ISAGA**
 - ✓ ISAGA testinde şüpheli serumda bulunan anti-*Toxoplasma* IgM antikoru, anti-insan IgM antikoru ile katı faza bağlanmakta, üzerine eklenen takizoitlerin aglütinasyonu çıplak gözle değerlendirilmektedir.

IgM ISAGA değerlendirilmesi

| IgM ISAGA puanı | Yorum |
|-----------------|-------------------|
| 0–5 | Negatif |
| 6–8 | Sınırdaki pozitif |
| 9–12 | Pozitif |

İndirekt tanı

| | Antikor tipi / test | Tarama | Gebelik | Yeni doğan | Göz tutuluşu | İmmün yetmezlik |
|---------------|---------------------|--------|---|---|---|---|
| İndirekt tanı | IgG | + | + (risk altındaki kadınların ve korunanların) | + (maternal antikorlar bebekte 12. aya kadar kalabilir; maternal veya fetal IgG ayrımının WB ile yapılması) | + (düşük titrede pozitiflikler genelde konjenital enfeksiyonun reaktivasyonunda saptanır; göz içi antikor üretimi [göz ve kan antikor titresi oranı]) | + (reaktivasyon riski olan hastaların tanısında; AIDS ve KI transplant hastaları) |
| | IgG avidite | - | + (yüksek avidite sonucu 3-4 ay öncesi enfeksiyon düşündürmez; düşük avidite antikorlar kalabilir) | - | + (yüksek avidite sonucu 3-4 ay öncesi enfeksiyon düşündürmez; düşük avidite antikorlar kalabilir) | - |
| | IgM | - | + (IgM antikorları uzamış sürelerde kalabilir, negatif IgM hamile kadında ilk 2 trimesterde enfeksiyon olmadığını gösterir) | + (ISAGA enzim immün assay'den daha sensitif; maternal veya fetal IgG ayrımının WB ile yapılması) | + (yüksek titrede pozitiflik akut kazanılmış enfeksiyon, negatif sonuç konjenital enfeksiyonun reaktivasyonunda saptanır) | + (IgM sonucunun değeri düşüktür; aktif veya latent hastalık olabilir veya olmayabilir) |
| | IgA | - | + (IgA antikorları uzun süre kalabilir) | + (IgM testlerine göre daha değerlidir) | - | - |
| | IgE | - | + (yüksek spesifite, düşük sensitivite) | - | - | - |

İki Önemli Nokta...

- Ağır immunsupresyon altındaki hastalarda humoral immun yanıtın baskılanması sonucu;
 - * **Reaktivasyon gelişen vakalarda IgG antikör titrasyonları değişmeyebilir, hatta düşebilir**
 - * **Primer enfeksiyon durumunda IgM antikörlerinin oluşmayabilir veya testin cut-off seviyesine yaklaşmaz, IgG antikörleri da erken dönemde serolojik testler ile saptanacak seviyeye ulaşmayabilir**

Yanlış negatif sonuçlara sebep olmaktadır...

İndirekt tanı

- Ağır immünsüpresyon ve kullanılan ilaçların yan etkisi ile lökonötropeni neden olur buna bağlı antikor oluşumu ve antikor titrelerinde beklenen artış izlenmez.
- Düzenli serolojik takip yapılan seropozitif transplant alıcılarında;
 - Antikor titrelerinde artış olmadığı,
- Seronegatif alıcılarda;
 - IgM oluşmadığı
 - IgG antikorlarında beklenen şekilde artış izlenemediği veya erken dönemde hiç oluşmadığı görülmüştür.

İndirekt tanı

- ✓ Toxoplasmosis riskinin belirlenmesinde faydalı bir olan serolojik yöntemler, İmmun sistemi baskılanmış veya bozulmuş hastalarda yetersiz kalmaktadır.

EÜTF Parazitoloji AD Seroloji Laboratuvarı

- **Toxoplasmosis Rutin Serolojik tanısı**
 - ✓ **IFAT**
 - ✓ **IgG-Avidite**
 - ✓ **IgM-ELISA (ticari kit)**

Direkt tanı

- **Şüpheli Materyel**
 - ✓ Doku (kemik iliği aspirasyon materyali, plasenta, beyin, karaciğer ve endomyokard biyopsi örneği)
 - ✓ Vücut sıvısı (amnion sıvısı, periferik kan, beyin omurilik sıvısı, idrar, vitröz sıvı, BAL, pleural sıvı, ascit) örneklerinde *T. gondii*'nin görüldüğü, izolasyonunun veya DNA'sının gösterildiği yöntemlerdir.
 - **PZR**
 - **Hayvan inokülasyonu**
 - **Hücre kültürüne ekim**
 - **Mikroskopi**

Direkt tanı

- Direkt tanıda (mikroskopik, hayvan inokülasyonu ya da hücre kültürü) duyarlılığı ve özgüllüğü daha yüksek olan **Polimeraz Zincir Reaksiyonu** tercih edilmektedir.
 - **Konvansiyonel PZR**
 - **Nested PZR**
 - **Real Time PZR**
 - **Multipleks PZR**

Direkt tanı

- PZR yöntemlerinde hedef gen olarak,
 - **B1 gen** (Genbankası no: AF179871)
 - P30 (SAG1) (Genbankası no: M23658)
 - 18 S rDNA (Genbankası no: X75429)
 - **RE=repeated element** (Genbankası no: AF146527)
 - 2000 yılında tanımlanan bu genin (529 bp) B1 genine göre daha duyarlı olduğu ileri sürülmüştür.
 - Polimorfizm analizlerinde Mobil Genetik Element (MGEs) geni tercih edilmektedir.
 - SAG2, SAG3, SAG4, GRA4, GRA6, MAG1, BAG1, BR4 genleri araştırma amaçlı kullanılmaktadır.

EÜTF Parazitoloji AD Moleküler Laboratuvarı

- Toxoplasmosisin PZR ile rutin tanısında,
 - ✓ Real Time PZR
 - RE geni (AF146527)**

Real Time PZR

T. gondii AF146527 geni

ctgcagggaggaagacgaaagttgtttttatTTTTTTCTTTTTGTTTTCTGATTTTGTTTTTTGACTCGGGCCAGCTGCGTCTGTCGGGATGA
gaccgcggagccgaagtgcgttttctTTTTTGACTTTTTGTTTTTCACAGGCAAGCTCGCTGTGCTTGGAGCCACAGAAGGGACAGAAGTCG
aaggggactacagacgcgatccgctcctccagccgtcttggaggagagatatcaggactgtagatgaaggcgagggtgaggatgagggggtg
gcgtggtgggaagcgcagagagtcggagaggggagaagatgttccggcttggctgcttttctggaggggtggaaaaagagacaccggaatgc
gatccagacgagacgcgctttcctcgtggtgatggcggagagaattgaagagtgagagaagagggcgagggagacagagtcggaggcttggg
cgaagggaggaggaggggtagggagaggaatccagatgcactgtgtctgcag

134 bp
Real Time PZR
amplifikasyon
bölgesi

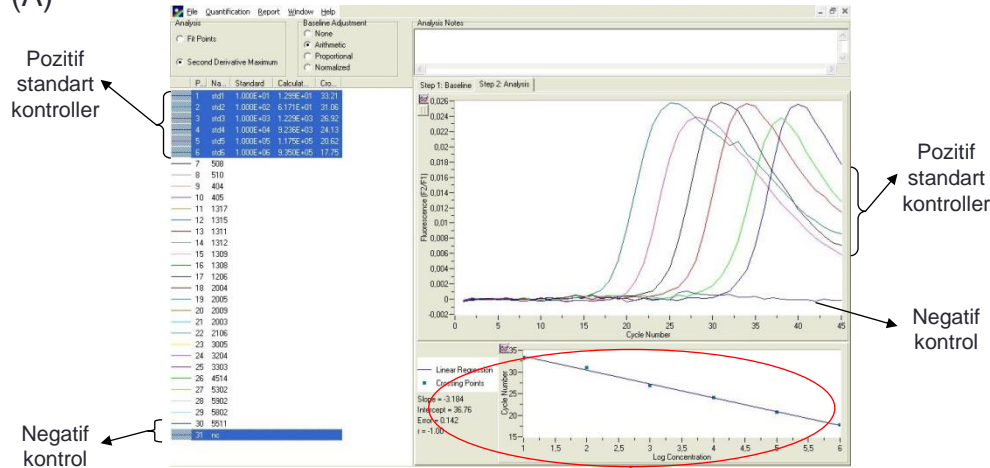
Real Time PZR'da AF146527 geni içerisindeki 134 bp uzunluğundaki bölge,

- ✓ Primerler
- ✓ Hibridizasyon problemleri kullanılarak çoğaltılmaktadır.

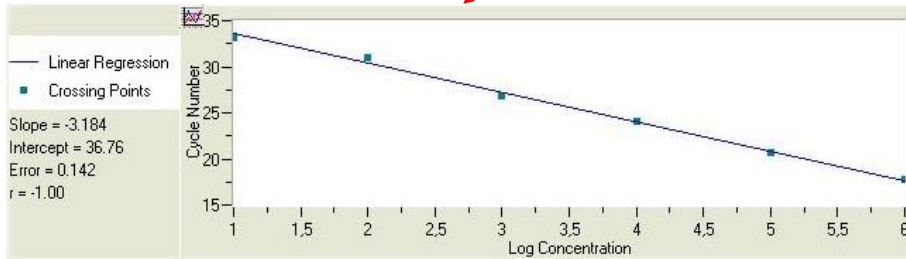
Real Time PZR

Quantifikasyon analizi

(A)



(B)

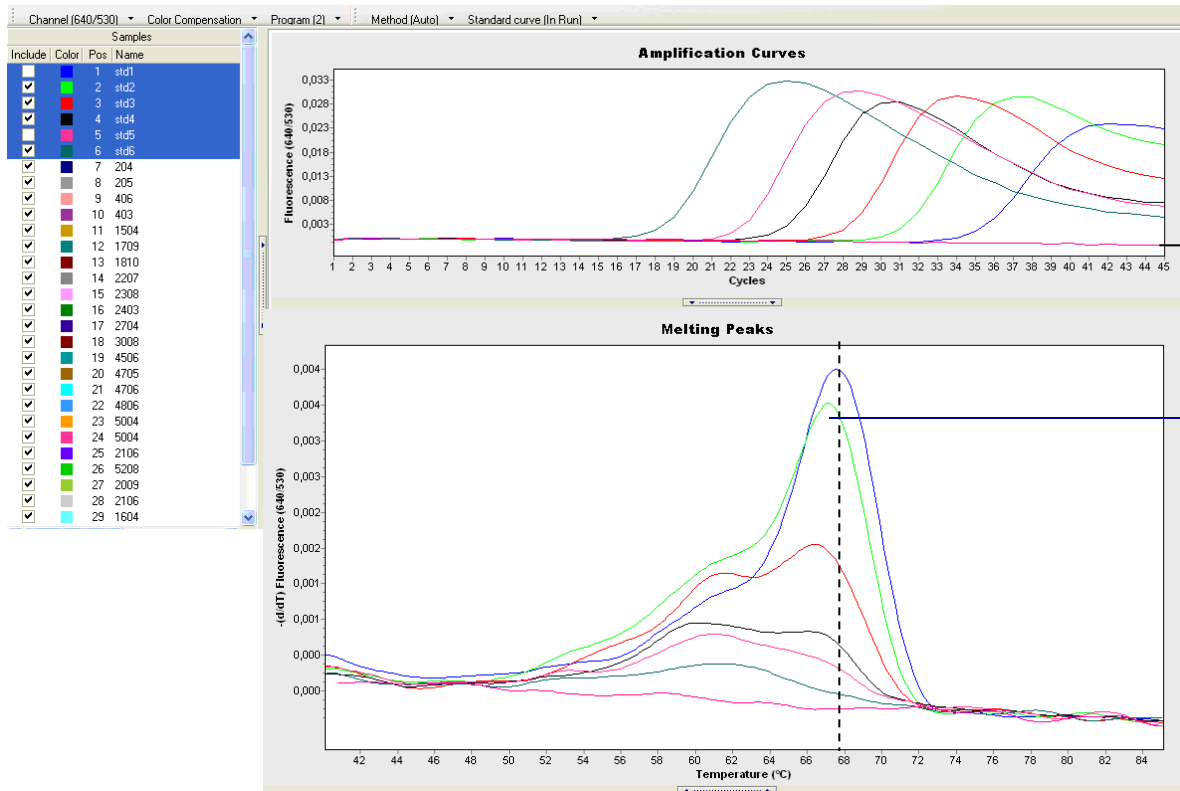


Pozitif kontrol ve standart eğri oluşturmak için

- ✓ *T. gondii* DNA konsantrasyonu 10^1 - 10^6 / reaksiyon olan altı ayrı örnek kullanılmaktadır
- ✓ Negatif kontrol olarak Distile su kullanılmaktadır

Real Time PZR

Erime eğrisi (melting curve) analizi



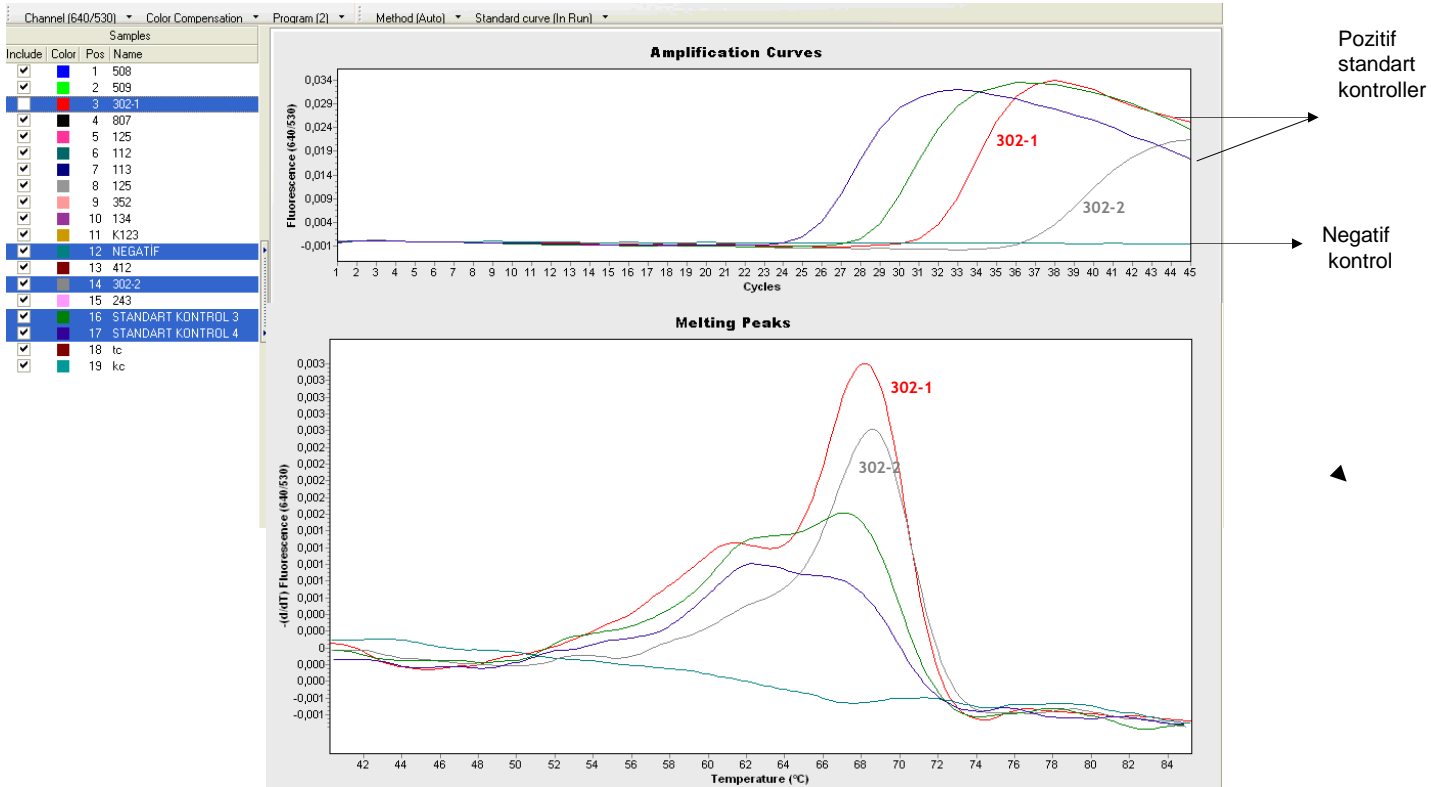
Pozitif standart kontroller

Negatif

Tm (melting point)
67,5°C

Real Time PZR

Toxoplasmosis teşhisi konulmuş hastaların tedavi takibi



TEŒEKKÜRLER...

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji A.D