

Značaj serološke dijagnostike gastrointestinalnih infekcija

Prim.dr.sc. Oktavija Đaković Rode

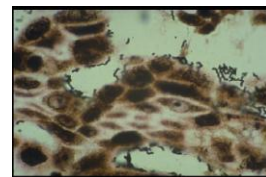
ODABRANE TEME

- *Helicobacter pylori*
- *Salmonella typhi*
- *Echinococcus*
- *Trichinella*
- *Taenia solium*
- *Toxocara*
- *Toxoplasma gondii*

Helicobacter pylori

H.pylori

- Akutni gastritis,
peptički ulkus,
adenokarcinom želuca
- Marshall i Warren
Nobelova nagrada 2005.



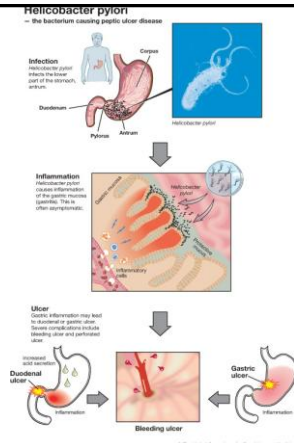
A silver stain of *H. pylori* on gastric mucus-secreting epithelial cells (x1000).
From Dr. Marshall's stomach biopsy taken 8 days after he drank a culture of *H. pylori* (1985).

H.pylori

The 2005 Nobel Prize in Physiology or Medicine

3 October 2005:

The Nobel Assembly at Karolinska Institute has today decided to award The Nobel Prize in Physiology or Medicine for 2005 jointly to **Barry J. Marshall** and **J. Robin Warren** for their discovery of "the bacterium *Helicobacter pylori* and its role in gastritis and peptic ulcer disease"



H.pylori



- Gram-negativni zavijeni, pokretni štapići
- **Uzgoj:** obogaćene hranjive podloge (brucela-, Columbia-, KA) i mikroaerofilna atmosfera (5-6% kisika)
- Optimalna temperatura 37 stC
- Raste sporo (3-7 dana)
- Kolonije na KA glatke, prozirne, bez hemolize
- bolje raste uz 5-12% CO₂

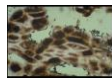
Dijagnostika H.pylori

• IZRAVNA DIJAGNOSTIKA

- Biopat želuca – 2 uzorka antruma i 2 korpusa → što prije u mikrobiološki laboratorij ili u transportnu podlogu (Stuartova podloga)
- Obogaćene hranjive podloge (Skirrow) i mikroaerofilna atmosfera
- Zasiјavanje na podlogu s ureom – za 1-1.5 sat urea će se razgraditi

• Mikroskopski preparat

- po Gramu ili bojanje srebrnom

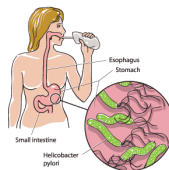


• ODREĐIVANJE ANTIGENA U STOLICI

- EIA, ICA

• “Urea izdisajni test”

- pacijent popije ureu markiranu neradioaktivnim izotopom C¹³ i nakon nekog vremena izdiše i mjeri se u izdahnutom zraku C-atomi iz ureje



• NEIZRAVNA DIJAGNOSTIKA – određivanje IgM, IgG i IgA

SEROLOŠKA DIJAGNOSTIKA H.PYLORI

- Testovi koji se temelje na reakciji Ag-At
- **Određivanje antigena u stolici (EIA, ICA)**
- **EIA za IgM, IgG, IgA**
- **Brzi test određivanja antigena u stolici (EIA, ICA)**
 - dobar indikator aktivne bolesti
 - Visoka osjetljivost i specifičnost
 - ICA test visoke kvalitete (rekombinantni antigeni CagA, VacA) s monoklonskim At
 - osjetljivost ~ 81%, specifičnost ~ 92% (J Investigative Med 2010.)

SEROLOŠKA DIJAGNOSTIKA *H.PYLORI*

- **Anti-*H.pylori* IgM, IgG, IgA EIA**
 - Niska PPV; visoka NPV



- **IgM**
 - indikator aktivne bolesti;
 - minorno dijagnostičko značenje;
 - povišen samo akutno nakon infekcije;
 - jako niska osjetljivost
- **IgG i IgA**
 - Ne razlikuje aktivnu infekciju
 - razlike između djece i odraslih
- Kinetika **IgG** → praćenje uspješnosti terapije:
 - Pad titra **IgG** oko 40-50% nakon 3 mjeseca
- **IgA** dijagnostički značajan za oko 2-7% bolesnika
 - IgA - osjetljivi marker za nastanak gastričnog karcinoma;
 - bolesnici s anti-CagA At imaju češće IgA povišena At (→ CagA povezuje se s povećanim rizikom za peptički ulkus i gastrični Ca)

SEROLOŠKA DIJAGNOSTIKA *H.PYLORI*

Anti- <i>H.pylori</i>	Specifičnost	Osjetljivost
IgM	95.8% 97% djeca 93.4% odrasli	6.8% 9% djeca 4.4% odrasli
IgG	61% 82.6% djeca 46.2% odrasli	87.6% 85.6% djeca 88.6% odrasli
IgA	67.6% 95.8% djeca 48.8% odrasli	63.4% 29.6% djeca 73.8% odrasli

She RC. Clin Vacc Immunol 2009

EPIDEMIOLOGIJA *H.pylori*

- Kolonizacija želuca u zemljama u razvoju je oko 80%
 - Visoka od ranog djetinjstva
- Kolonizacija želuca u SAD oko 30%
- Prevalencija raste s dobi
 - Dob 10 godina = oko 5 %
 - Dob 30 godina = oko 25%
 - Dob 60 godina = oko 50%
- Dob i manji prihodi su glavni rizici za infekciju *H.pylori*



Salmonella typhi

SALMONELLA

(rod)



- Porodica *Enterobacteriaceae*
- Dvije vrste
 - *Salmonella enterica* – 6 podvrsta
 - razni serotipovi (*S. enterica* serotip Typhi, Paratyphi A, B, C, itd.)
 - podvrsta I; patogene za čovjeka
 - *S. bongori* (zmije, kornjače, gušteri, ribe, insekti)

Salmonella

- **PRIJENOS:** feko-oralno
- Trbušni tifus - *S. typhi*
 - prilagođena samo za čovjeka
 - Samo jedan serovar *S. typhi*
- *S. enteridis* također patogena samo za čovjeka
 - >2300 serovara (npr. *S. paratyphi* A, B, C)
- Druge salmonele su **zoonoze**
 - bakterije iz latentno zaraženih životinja
 - ingestija jaja, meso, mliječni proizvodi; kućni ljubimci
- **KLICONOŠTVO** – prolazno; traje 2-3 tjedna
 - dugotrajnije nakon trbušnog tifusa (3%)

KLINIČKA SLIKA SALMONELOZA

3 tipa bolesti

1. gastroenteritis
2. crijevne groznice
3. septički sindrom

S. typhi

CRIJEVNE GROZNICE

- Inkubacija 5-14 dana
- najteži oblik – trbušni tifus – *S. typhi* (izvor samo čovjek)
 - iz tankog crijeva subepitelijalno u limfno tkivo – u krvotok, jetru, slezenu, pluća
 - **POČETAK** → postupni porast temperature do visokog febriliteta kontinuiranog tijeka; glavobolja i opći simptomi (bez simptoma probavne infekcije!)
 - nakon sekundarnog umnožavanja u crijevima mogu se javiti probavne smetnje i proljev
 - mrljasti svijetlo-ružičasti osip u 1/3 oboljelih
- **Komplikacije** izvan probavnog sustava
 - meningitis, upala pluća, bubrega, zglobova
- **Komplikacije** u probavnom sustavu
 - krvarenje, perforacija, peritonitis

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA SALMONELOZA

UZORCI

- **gastroenteritisi:**
 - stolica,
 - povraćene mase,
 - sumnjiva hrana
- **sepsa:**
 - krv
 - uzorak sekundarno zahvaćenog organa (likvor, iskašljaj, punktat)
- **trbušni tifus i crijevne groznice:**
 - krv, koštana srž
 - nakon 10-15 dana stolica i urin
 - **Serum za At.**

CRIJEVNA GROZNICA - TRBUŠNI TIFUS

- **KULTIVACIJA**
 - prvi tjedan bolesti - **krv** za hemokulturu
 - iza 2. tjedna - **stolica, mokraća**
- **DOKAZ ANTIGENA** u serumu ili urinu
 - Protusmjerna imunoelktroforeza (CIE) jednog seruma za detekciju O-antigena *S.typhi* u ranoj fazi bolesti
- **SEROLOŠKA DIJAGNOSTIKA – At**
 - **Widalov test** → praćenje dinamike titra At
 - Brzi dot-EIA test za specifična IgM i IgG At na *S.typhi* – osjetljivost 95%
- **Dijagnostika kliconoštva**
 - Stolica (češće), urin → kultura
 - Duodenalna kapsula (*gelatin capsule string test*)

Widalov test za dokaz infekcije *S.typhi*

• AGLUTINACIJA PO WIDALU

- **Anti-O At** (somatska) - potvrđuju akutnu infekciju
- **Anti-H At** (flagelarna) - kasnije stvaranje i dugo perzistiranje
- **Anti-Vi At** - u trbušnom tifusu dugo ostaju nakon ozdravljenja;
 - Za dijagnostiku kroničnih nositelja;
 - Postoji 80 Vi-fagotipova;
 - fagotipizacija potrebna za utvrđivanje povezanosti izvora i bolesnika
 - Osjetljivost za Vi-At 70%; nije 100% specifično
 - Različiti testovi: pasivna HA, CIE, ELISA, (Vi-Ag *Citrobacter*-a obložen na eritrocitima za određivanje anti-Vi At)

Widalov test za dokaz infekcije *S.typhi*

- Parni serumi u razmaku 7-10 dana
- 4x porast titra H- ili O-aglutinina ukazuju na bolest
- Ranije cijepjenje TAB ostavlja rezidualni titar H aglutinina godinama i u tih je bolesnika važniji porast O-aglutinina
- Nedostatak Widalovog testa je potreba parnog seruma za interpretaciju
- Interpretacija u ne-endemskim krajevima rezultata testiranja prvog seruma → porast titra O i H-aglutinina (npr. titar > 320 indikativan za infekciju *S.typhi*)

Noviji testovi

- Brza serološka dijagnostika *S. typhi*
 - određivanje anti-*Salmonella* 09 IgM (Lim PL. 1998.)
 - *S. typhi* i salmonele grupe D imaju sličnost u **09 antigenu** koji sadrži šećer **alfa-D-tyvelose** koja je ekstremno rijetka u prirodi
- *Rapid detection is now available in the market*
 - *Typhidot* = a qualitative detection test against a specific antigen of *Salmonella typhi*. It can detect both IgG and IgM separately and simultaneously. Thus, indicating the status of acute infection, convalescence or previous exposure
 - *Salmonella typhi* IgG/IgM Rapid test = an immunochromatographic assay for rapid, qualitative and differential detection of IgG and IgM antibodies to *Salmonella typhi* in human serum, plasma or whole blood
- Brzi test za anti-*Salmonella* 09 IgM (TUBEX test) koristan za serodijagnostiku **netifusnih salmonela** u ne-endemskim područjima
 - Lažno pozitivno na netifusne salmonele nakon infekcije *S. typhi*
 - Ispitati križnu reaktivnost nakon ranijih salmoneloza

PARAZITI

Eozinofilija

- > 450 eozinofila/ μ l
- Alergije
- Neoplazme
- Autoimune bolesti
- **Infektivne bolesti → paraziti (helmiti) najčešći uzrok**
- Jednostanični paraziti obično ne uzrokuju eozinofiliju

Maguire JH. Diseases due to parasites. U: Mandell GL, Benett JE, Dolin R, ur. Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Elsevier; 2005; str. 3258-3315.

Paraziti → EOZINOFILIJA

<i>Ancylostoma</i>	<i>Echinococcus</i>	<i>Hymenolepis</i>	<i>Strongyloides</i>
<i>Angiostrongylus</i>	<i>Echinostoma</i>	<i>Loa loa</i>	<i>Taenia</i>
<i>Anisakis</i>	<i>Enterobius</i>	<i>Mansonella</i>	<i>Toxocara</i>
<i>Ascaris</i>	<i>Fasciola</i>	<i>Onchocerca</i>	<i>Trichinella</i>
<i>Capillaria</i>	<i>Fasciolopsis</i>	<i>Opisthorchis</i>	<i>Trichostrongylus</i>
<i>Clonorchis</i>	Filarije	<i>Paragonimus</i>	<i>Trichuris</i>
<i>Dirofilaria</i>	<i>Gnathostoma</i>	<i>Schistosoma</i>	
<i>Dracunculus</i>	<i>Heterophyes</i>	<i>Spirometra</i>	

SEROLOŠKA DIJAGNOSTIKA PARAZITARNIH BOLESTI

- Humoralni imunosni odgovor
- Problem → lažno pozitivne reakcije
- Western blot – potvrdni test (?)
- Tumačenje rezultata:
 - akutna infekcija,
 - kronična infekcija,
 - nespecifična reaktivnost

VALJKASTI CRVI, OBLIĆI – NEMATODE

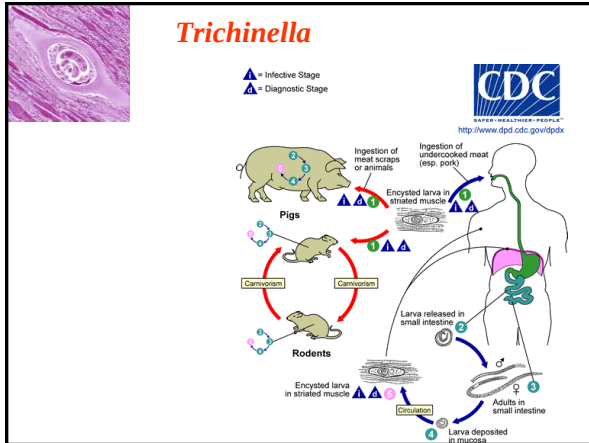
PRIMARNA LOKACIJA	UZROČNIK	PRIJENOS	ENDEMSKA PODRUČJA	DIJAGNOZA
PROBAVNI SUSTAV	<i>Enterobius</i>	ingestija jaja	širom svijeta	jaja na koži
	<i>Trichuris</i>	ingestija jaja	širom svijeta, posebno tropski krajevi	jaja u stolicu
	<i>Ascaris</i>	ingestija jaja	širom svijeta, posebno tropski krajevi	jaja u stolicu
	<i>Ancylostoma Necator</i>	ličinke penetriraju kožu	širom svijeta, posebno tropski krajevi	jaja u stolicu
	<i>Strongylolides</i>	ličinke penetriraju kožu i autoinfekcija	primarno tropski krajevi	ličinke u stolicu
	<i>Trichinella</i>	ličinke u nekuhanom mesu	širom svijeta	ličinke encistirane u mišiću; serologija
	<i>Anisakis</i>	ličinke u nekuhanim plodovima mora	Japan, SAD, Nizozemska	klinički

VALJKASTI CRVI, OBLIĆI – NEMATODE

PRIMARNA LOKACIJA	UZROČNIK	PRIJENOS	ENDEMSKA PODRUČJA	DIJAGNOZA
TKIVA	<i>Wuchereria</i>	ugriz komarca	primarno tropi	preparat razmaza krvi
	<i>Onchocoerca</i>	mušice papučarice (simulide)	Afrika, centralna Amerika	biopsija kože
	<i>Loa</i>	Obad	tropska Afrika	preparat razmaza krvi
	<i>Dracunculus</i>	ingestija račića roda (Cyclops)	tropska Afrika i Azija	Klinički
	<i>Toxocara - ličinke</i>	ingestija jaja	širom svijeta	klinički i serologija
	<i>Ancylostoma - ličinke</i>	penetracija kože	širom svijeta	klinički

Trichinella

- Rod *Trichinella*
- 11 genotipova → 8 vrsta:
 - *T. spiralis* (genotip T1)
 - *T. nativa* (T2)
 - *T. britovi* (T3)
 - *T. pseudospiralis* (T4)
 - *T. murelli* (T5)
 - *T. nelsoni* (T7)
 - *T. papuae* (T10)
 - *T. zimbabwensis* (T11)



Trichinella – LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

- IZRAVNA
 - Trihineloskopija
 - Histološki pregled uzorka
 - Umjetna digestija
 - Molekularna dijagnostika
- NEIZRAVNA
 - Serologija – (IgE – kratko prisutna, nisu dijagnostički značajna) → IgM → IgG → kinetika titra
 - Metode: IFA, EIA, WB

Trichinella - serologija

- Serokonverzija (*T. spiralis*) - 2-3 tjedna nakon infekcije
 - Za *T. britovi* SK nakon 10 tjedana
- Vrh titra At oko trećeg mjeseca
- Perzistiranje At
- Razina At ne korelira s težinom i kliničkim tijekom bolesti
- IgM - može biti dugo pozitivan nakon akutne bolesti
- IgG - doživotno

Murray C. 2010.; Bruschi F. Am J Trop Med Hyg. 1990; 43: 186-193.

Trichinella - EIA

- 100% osjetljivi 50.dan
- 88% rezultata ostaje pozitivno 2 godine nakon infekcije
- EIA testovi se razlikuju prema antigenima na koje se određuju specifična At
 - Izolirane ličinke trihinele dobivene metodom umjetne digestije
 - Moguće križne reakcije s *Toxocara* sp., *Anisakis*, *Loa loa*
 - Ekskretorno - sekretorni antigeni dobiveni *in vitro* kultivacijom ličinki
 - TSL- antigen (tivelozni) – predominantni antigeni epitop iz kutikule parazita, aktivno se luče i u mišićima tijekom infekcije
 - Veća specifičnost, manja osjetljivost od ekskretorno-sekretornog Ag

Trichinella - IFA

- Antigen: rezovi inficiranog mišića ili čitave ličinke fiksirane formalinom
- Česte lažno pozitivne reakcije
- IgM može perzistirati godinama nakon infekcije
- Autoimunosne bolesti
- Svaki IFA pozitivan nalaz treba potvrditi EIA ili WB metodom

ALGORITAM ZA DIJAGNOZU AKUTNE TRIHINELOZE

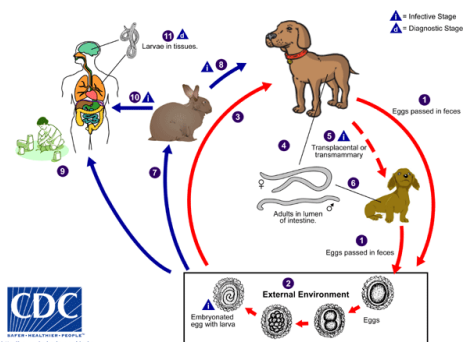
	SIMPTOMI		
A	1.vrućica,	AKUTNA TRIHINELOZA	SIMPTOMI
	2.edem kapaka i/ili lica,		
B	3.mijalgija	Malo vjerojatno	1A ili B ili C
	1.proljev,	Suspektno	1A ili 2B + 1C
C	2.neurološki simptomi,	Moguće	3A + 1C
	3.kardijalni simptomi,	Jako moguće	3A + 2C
D	4.konjunktivitis,	Potvrda	3A + 2C + 1D ili A ili B + 1C + 1D
	5.subungvalna hemoragija,		
	6.kožni osip		
C	1.eozinofilija (>1000 eozinofila /mL) i/ili povišeni ukupnih IgE,		
	2.povišeni mišićni enzimi		
D	1.pozitivna serologija visoko specifičnog testa,		
	2.serokonverzija,		
	3.pozitivna biopsija mišića		

TOKSOKAROZA

- Sinonimi: Toxocariasis, toxocarosis, visceralna larva migrans, okularna larva migrans
- Nematode:
- *Toxocara canis*
- *Toxocara cati* (rjeđe)
- Ingestija **jaja** (infektivna) iz zemlje kontaminirane psećim izmetom
- Larve se izlegu u tankom crijevu i migriraju preko jetre u pluća i druga tkiva, ali u ljudi ne sazrijevaju do odraslih oblika
- U većine se eliminiraju ili se stvori granulom



Toxocara canis



TOKSOKAROZA - dijagnostika

- DIJAGNOZA:
- Nalaz ličinki u bioptičkom materijalu
- **Serologija:**
- *T. canis* IgG
- EIA
 - Križna reaktivnost – strongiloidoza, trihineloza, filarijaza, fascioloz
- WB

TOKSOKAROZA - SEROLOGIJA

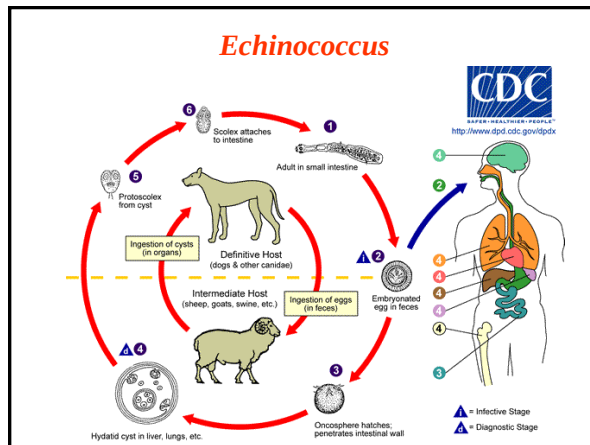
- Određivanje At
- EIA
 - 1. antigenima ličinke (larve) ekstrahirane iz embrioniranih jaja ili
 - 2. oslobođene in vitro kultivacijom infektivne ličinke
- *Toxocara* ekskretorni/sekretorni (TES) antigeni (2) su bolji jer ne zahtijevaju dodatni korak absorpcije-purifikacije za povećanje specifičnosti
- Osjetljivost i specifičnost testova se ne može procijeniti budući da nema testova za detekciju parazita *Toxocara* u ljudi
- Procjena osjetljivosti:
 - kod visceralne larva migrans (LM) → oko 78%
 - kod okularne LM → 73% uz COV titar ≥ 32 ; ako se COV titar snizi na 8 povećava se osjetljivost na 90%
- Specifičnost kod okularne LM povećava se ako se testira očna vodica na At → specifičnost >90% uz titar ≥ 32

TOKSOKAROZA - SEROLOGIJA

- **OPREZ:** TITAR At ne mora značiti akutnu bolest *Toxocara canis*!
- Moguć je anamnestički odgovor nakon asimptomatske infekcije u manjeg broja ljudi
- Prevalencija varira ovisno o dobi, rasi i socioekonomskom statusu

TRAKAVICE – razred Cestoidea

	PRIJENOS	PRIJELAZNI NOSILAC	ZAHVAĆENO TKIVO	DIJAGNOZA
<i>Taenia solium</i>	A) ingestija ilkrice u nedovoljno termički obrađenoj svinjetini	Svinja	probavni sustav	jajašca i proglotide u stolici
	B) ingestija jaja u hrani i vodi kontaminiranoj humanim fecesom		cisticerki u mozgu i očima	biopsija, CT, serologija
<i>Taenia saginata</i>	ingestija ilkrice u nedovoljno termički obrađenom mesu	Goveda	probavni sustav	proglotide u stolici
<i>Dyphylbothrium latum</i>	ingestija ličinki u nedovoljno termički obrađenim ribama	rak (Copepoda) i ribe	probavni sustav	jaja s operkulumom u stolici
<i>Echinococcus granulosus</i>	ingestija jaja u hrani kontaminiranoj psećim izmetom	ovce	hidatidne ciste u jetri, plućima, mozgu	biopsija, CT, serologija



Echinococcus - DIJAGNOSTIKA

- UZV, CT ili sl. + pozitivna serologija
- **Biopsija** – iznimno - ako je slikovni prikaz suspektan, a serologija negativna

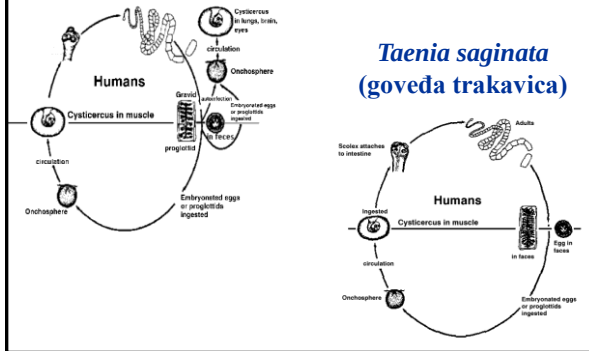
Echinococcus – IMUNODIJAGNOSTIKA

- Lažno pozitivne reakcije: drugi helminti, Ca, kronični imunološki poremećaj
- Negativni test ne isključuje ehinokoku – neke osobe nemaju detektabilna At.
- Detektabilna At ovisi o lokaciji, integritetu, vitalnosti ciste s larvama.
 - Ciste u jetri – veća vjerojatnost za razvoj At nego ciste u plućima
 - Intaktna hijaline ciste – niska osjetljivost za razvoj At
 - Ciste u plućima, mozgu i slezeni – slabija seroreaktivnost
 - Ciste u kostima – stimuliraju detektabilna At
- Oštećenje ciste abruptno stimulira At
- Bolesnici sa starim, kalcificiranim ili mrtvim cistama općenito su seronegativni

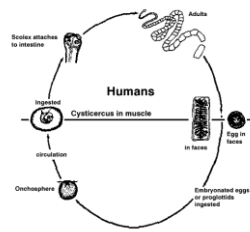
Echinococcus granulosus – IMUNODIJAGNOSTIKA

- Testovi: EIA, IFA, IHA, (lateks aglutinacija); imunoelktroforeza
 - Osjetljivost: 60-90%
- Antigen u testu – nepročišćena tekućina hidatidne ciste
- **Imunoelktroforeza** → visoko specifična, slabije osjetljiva; dobra za postkiruršku evaluaciju – relativno brza reverzija u negativni rezultat nakon uspješnog zahvata
- Najbolje koristiti kombinaciju testova
- Probir: EIA ili IFA → potvrda: **imunoblot** ili **gel imunodifuzija** za dokaz ehinokoknog "Arc 5" antigena
- "Arc 5" lažno pozitivan u 5-25% neurocisticerkoza
- Dinamika antitijela nepouzdana:
 - Nakon uspješne kirurgije → pad titra At ili nestaju; titar ponovo poraste ako se pojavi nova cista
 - Test "Arc 5" ili IgE At ~ pad At 24 mjeseca nakon kirurgije; IHA ostaje pozitivan najmanje 4 godine
- Kemoterapiju ne prati pad titra At
- Ograničena korist monitoriranja At tijekom bolesti

Taenia solium (svinjska trakavica)



Taenia saginata (goveđa trakavica)



CISTICERKOZA

- Ingestija jaja *T.solium* u hrani ili vodi; prljave ruke
- Ličinke (larve) prolaze kroz zid tankog crijeva i cirkulacijom u druga tkiva gdje encistiraju i stvaraju **cisticerke** – najčešće SŽS → epi, hidrocefalus, neurološki simptomi
- Ingestija nedovoljno termički obrađenog mesa svinje sa cisticerkima uzrokuje intestinalnu infekciju s odraslim trakavicama – **tenijaza**
- **AUTOINFEKCIJA** – razvoj cisticerkoze

Cisticerki

- Cisticerki secerniraju prostaglandine i druge komponente (paramyosin, teniastatin, sulfatni polisaharidi) koji **inhibiraju ili mijenjaju aktivaciju komplementa** i proizvodnju prostaglandina što rezultira minimalnom upalom oko žive ciste
- Humoralna At ne ubijaju zrele metaceste
- Teniastatin može interferirati s proliferacijom limfocita i funkcijom makrofaga **inhibirajući staničnu imunost**
- S vremenom parazit izgubi kontrolu nad obranom domaćina što aktivira upalni odgovor koji degenerira cisticerk
- Upalni odgovor u parenhimu SŽS uzrokuje tipične epi napade
- Daljnja degeneracija cisticerka dovodi do stvaranja **granuloma** koji se resorbira ili stvori ožiljak i kalcifikat
- Mnogobrojne parenhimne ciste mogu razviti difuzni cerebralni edem – cisticerni encefalitis koji može progredirati u meningoencefalitis, granulomatozni meningitis, fokalni granulom ili apsces, hidrocefalus, ependimitis ili arteritis
- 10-20% bolesnika s neurocisticerkozom imaju ekstraparenhimalnu bolest

Cisticerkoza - DIJAGNOSTIKA

- CT, MR
- Probir **EIA** - IgG reaktivna s Ag ciste *T.solium*
 - osjetljivost 95%;
 - križna reaktivnost s ehinokokom
- Potvrdni test **WB** – purificirani glikoproteini *T.solium*
- 6 specifičnih gp – osjetljivost 98%; specifičnost 100%
- Uzorci serum i likvor

Cisticerkoza – serologija

- **EITB** (enzyme-linked immunoblot transfer blot) test – anti-cisticerkna At u serumu i likvoru
 - Osjetljivost 94% kod multiplih lezija ili ekstrapiramidne infekcije, ali 28% kod jedne parenhimne lezije
 - Može postati negativan ako cista odumre ili kalcificira
- **ELISA** – s nefrakcioniranim Ag – problem osjetljivosti i specifičnosti → za likvor
 - Križna reaktivnost
- **WB** – kvalitativna detekcija IgG – osjetljivost 95%; specifičnost 100%
- Osjetljivost ELISA za likvor oko 80%
 - Lažno pozitivna: hidatidne ciste, filarijaza, TBC meningitis, virusni encefalitis
 - Aktivni upalni odgovor → visoki titar At
 - Intraventrikularne ciste → niski titar
- ELISA s monoklonskim at HP10 za detekciju sekretorno/ekskretornih Ag iz likvora – rezultati slični EITB
- Nema PCR testa
- Jaja *T. solium* se vrlo rijetko nađu – nema odraslih oblika
- Lumbalna punkcija: obično nepotrebna; normalna glukoza i proteini i blago povišeni leukociti; ako je oštećena cista koja komunicira s likvorom → visoka eozinofilija

Mansur MM, 2010.

Serologic and Molecular Tests for Parasitic Infections

Infection	Antibody	Antigen or DNA/RNA
Protozoans		
Amebiasis	EIA	EIA, PCR
Babesiosis	IFA	PCR
Chagas disease	IFA, EIA	—
Cryptosporidiosis	—	EIA, DFA, PCR
Giardiasis	—	EIA, DFA, PCR
Leishmaniasis	IFA, EIA	—
Malaria	IFA	PCR, ICG
Toxoplasmosis	IFA, EIA (IgG and IgM)	—
Roundworms		
Filariasis	—	EIA, PCR
Strongyloidiasis	EIA	—
Trichinellosis	EIA	—
Toxocariasis	EIA	—
Flukes		
Schistosomiasis	FAST- ELISA, IB	—
Tapeworms		
Cysticercosis	IB, EIA	—
Echinococcosis	EIA, IHA, IB	—

www.dpd.cdc.gov/dpdx

DIJAGNOSTIKA TOKSOPLAZMOZE

Toxoplasma gondii

- Protist
- Razred kokcidija, koljeno *Apicomplexa*
- Obvezno unutarstanični parazit

Toxoplasma gondii

➤ 3 RAZVOJNA STADIJA

1. **Tahizoit** (trofozoit) – akutni stadij
2. **Bradizoit** – tkivna cista
3. **Sporozoit** – oocista

Toxoplasma gondii

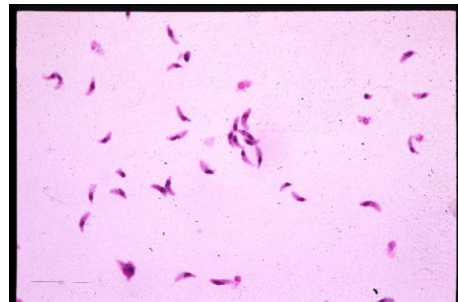
- TAHIZOITI I BRADIZOITI SE ANTIGENO RAZLIKUJU
- **SVI RAZVOJNI OBLICI SU INFEKTIVNI!!**

Građa i biološka svojstva *T.gondii*

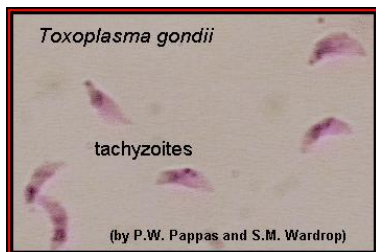
1. TAHIZOITI ili TROFOZOITI

- u tkivu u **akutnom stadiju** infekcije
- napadaju mišiće, srce, jetru, slezenu, limfne čvorove, središnji živčani sustav
- brzo se razmnožavaju u napadnutim stanicama, razaraju ih i ulaze u druge dok ne encistiraju u **TKIVNU CISTU**

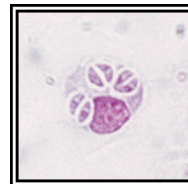
Tahizoiti



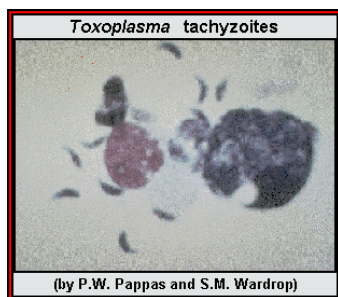
Tahizoiti



Unutarstanični tahizoiti



Tahizoiti



2. BRADIZOITI - tkivna cista

• TKIVNA CISTA

– okruglasta s nekoliko desetaka do stotina bradizoita

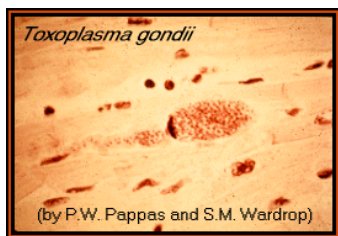
• Osjetljiva na povišenu temperaturu i smrzavanje

– Ugiba:

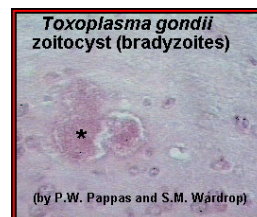
- na – 7°C nakon 4 dana
- na + 58°C nakon 15 minuta
- smrzavanje na – 20°C / 24 sata

• LATENTNA INFEKCIJA

Tkivna cista (zoitocista) u srčanom mišiću ispunjena bradizoitima



Bradizoiti u mozgu eksperimentalno inficiranog miša



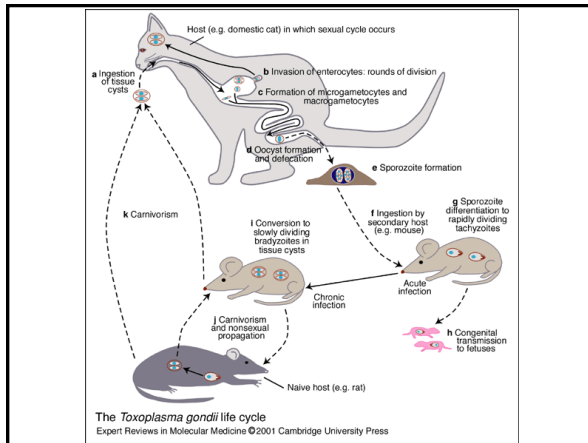
3. OOCISTA – mačka

• OOCISTA

- Okrugla s dvostrukom ovojnicom
- Izlučuje se u fecesu mačke – **neinfektivna**
- **Postaje infektivna nakon sporulacije u tlu**
- **OTPORNA** na sušenje, smrzavanje i dezinficijense
- Može preživjeti do godinu dana u vanjskoj sredini

MAČKA - jedini konačni nosilac

- Zarazi se najčešće nakon ingestije male životinje (miša ili ptice) u kojoj se nalaze tkivne ciste ili ingestijom infektivne oociste s tla
- Crijevo → oslobađanje bradizoita → ulaz u epitelne stanice → nekoliko ciklusa nespolne diobe (shizogonija) → diferenciranje u spolne stanice (mikro i makro gamete) – GAMETOGONIJA
- spajanjem spolnih stanica nastaje **NESPORULIRANA NEINFektivna OOCISTA** koja se izlučuje u stolici

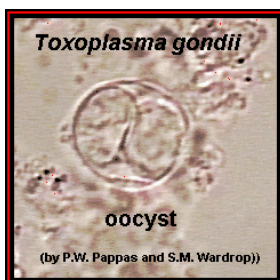


TLO - ZEMLJA

- Sporulacija oociste traje 1-5 dana

✓ Oocista postaje **infektivna**

Sporulirana infektivna oocista
s 2 sporociste s po 4 sporozoita



PRIJELAZNI NOSITELJI

✓ ČOVJEK

✓ SVE TOPLOKRVNE ŽIVOTINJE

TOKSOPLAZMOZA nastaje:

- ✓ Konzumiranjem nedovoljno termički obrađenog mesa zaraženih životinja s tkivnim cistama
- ✓ Gutanjem oocista zaraženom hranom ili vodom
 - kuhinjskim priborom (nož, daščica, suđe) koji dolazi u dodir sa sirovim mesom, nedovoljno se pere, a potom opet koristi
- ✓ Transplacentarno
- ✓ Transplantacijom organa
- ✓ Transfuzijom krvi



Prijelazni nositelji

- Ingestija zaraženog mesa → oslobađanje bradizoita iz tkivnih cista → prijelaz u tahizoite → ulaz u krvotok → širenje po organizmu → razmnožavanje
- Najčešći ciljni organi bez tkivnih oštećenja:
 - mišići, srce, jetra, slezena, limfni čvorovi, središnji živčani sustav
- Imuni odgovor nosioca → kontrola parazita → stvaranje **tkivne ciste koja ostaje doživotno**
- **LATENTNA INFEKCIJA**

Klinička slika

• INFEKCIJE ŽIVOTINJA

- Najčešće neopaženo, bez simptoma
- Mladunčad, fetus – pobačaj ovaca, koza
- Mačka asimptomatski, ali može kao smrtonosna upala pluća

Klinička slika

• INFEKCIJE LJUDI

1. **Stečene u imunokompetentnih osoba**
 - Najčešće asimptomatski
 - Kao gripa ili limfadenitis – povećanje limfnih čvorova traje nekoliko mjeseci i do godinu dana – prolazi spontano
2. **Stečene ili reaktivirane u imunokompromitiranih osoba**
 - Oportunistička infekcija
 - primarna infekcija
 - reaktivacija zbog pada staničnog imuniteta
 - oslobađanje bradizoita iz tkivnih cista; brzo razmnožavanje – nekroza tkiva – upala – MOZAK – apscesi

3. Konatalne infekcije

- Tijekom primarne infekcije u trudnoći
 - prijelaz toksoplazmi kroz placentu i infekcija ploda
- Posljedice i težina oštećenja ovise o gestacijskoj dobi:
 - u **kasnoj trudnoći** (posljednji mjeseci) - lakši prijenos
 - nema vidljivih oštećenja pri porodu; djeca izgledaju zdravo
 - posljedice intrauterine infekcije vidljive kasnije - čak do 10. i 20. godine - korioretinitis, oštećenje vida, sljepoća
 - u **ranog trudnoći** (prvi mjeseci) - teže posljedice za plod
 - smrt ploda s pobačajem, teška oštećenja mozga, jetre, oka

Transplacentarni prijenos u trudnoći

Gestacijska dob u vrijeme serokonverzije u majke (tjedni)	Transplacentarni prijenos (%)	Rizik razvoja kliničkih simptoma prije 3.godine u odnosu prema gestacijskoj dobi serokonverzije u majke (%)
12	6	75
16	15	55
20	18	40
24	30	33
28	45	21
32	60	18
36	70	15
40	80	12

*Dijagnoza fetalne infekcije temeljena na kordocentezi ili amniocentezi 4 tjedna nakon serokonverzije u majke – prema Dunn et al. Lancet 1999.

Prenatalni postupak u konatalnoj toksoplazmozi

- Otkriti akutnu toksoplazmozu u majke
- “Testirati” fetus na *T.gondii*
 - kultivacija / serologija / PCR
- Potvrditi zahvaćanje središnjeg živčanog sustava
 - UZV
- Ako se postavi dijagnoza - **terapijom** obavezno treba prevenirati razvoj bolesti u **novorođenčeta!**

Dijagnoza toksoplazmoze

- Morfološka**
 - Mikroskop – krv, likvor, tkiva
 - tahizoiti u cirkulirajućim leukocitima, koštanoj srži, plućima, jetri, mozgu (?); tkivne ciste
 - Histopatološki ili EM pretraga
 - UZV, CT
- Kultivacija** – iz tkiva i tjelesnih tekućina
 - stanična kultura ili inokulacija u pokusnu životinju
- PCR** – iz tjelesnih tekućina (plodne vode, likvora)
- SEROLOGIJA**

Serološka dijagnostika

- Osnovna i najpouzdanija uz pravilnu interpretaciju!
- Neizravna dijagnostika – detekcija protutijela
- IMUNI ODGOVOR

Toxoplasma gondii IgM

- Javljaju se rano - unutar jednog tjedna nakon početka infekcije
- Obično nestaju unutar 6-9 mjeseci nakon infekcije
- Mogu perzistirati više od 18 mjeseci
- Perzistiraju predugo (godinama) da bi bili dobar indikator recentne infekcije
- IgM u novorođenčadi **retestirati** nakon 7-10 dana
 - prijelaz od majke pri porodu !?
 - poluvrijeme života IgM = 3-5 dana

Toxoplasma gondii IgG

- Javljaju se kasnije, postepeno rastu
- Vrh oko 2-5 mjeseci nakon početka kliničkih simptoma
- Pokazatelj imunosti
- **Praćenje dinamike protutijela** pomaže u određivanju vremena infekcije
- **TESTOVI AVIDNOSTI IgG**
 - promjena niske avidnosti u visoku unutar 6 mjeseci!

Toxoplasma gondii IgA

- Pojava oko 5 dana nakon IgM
- Nestaju kad IgG počinje padati, nešto ranije nego IgM
- Obično nestaju nakon 6-12 mjeseci
- Perzistira mjesecima (do više od 1 godine)
 - kontroverze je li IgA pouzdaniji indikator konatalne infekcije nego IgM (?)

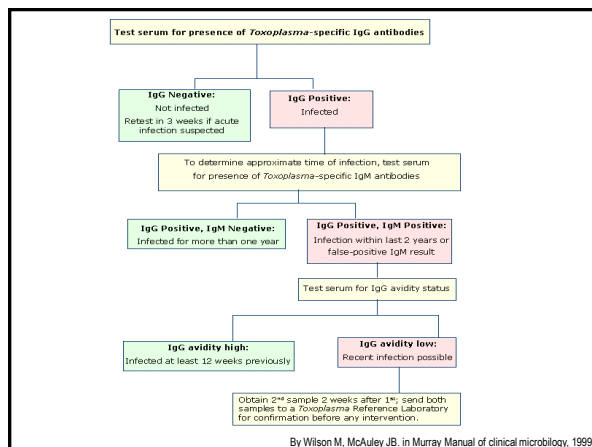
SEROLOŠKA DIJAGNOSTIKA - I

- Određivanje protutijela IgM, IgG, IgA, (IgE)
- **Metode:**
 - Enzimski imunotest (EIA, ELISA)
 - Imunosorbentni aglutinacijski test (ISAGA)
 - Imunofluorescencija (IFA)
- Izražavanje testova – jedinice:
 - titar, internacionalne jedinice, indeks, vrijednost optičke gustoće

TEST AVIDNOSTI PROTUTIJELA IgG

SEROLOŠKA DIJAGNOSTIKA - II

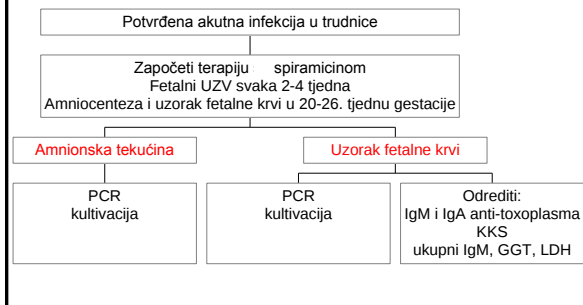
- Sabin – Feldmanov *dye* test
 - test bojanja tahizoita metilenom
 - Tahizoiti izgube afinitet za metilensko modrilo u prisutnosti protutijela IgG
- Indirektna hemaglutinacija (IHA)
- RVK



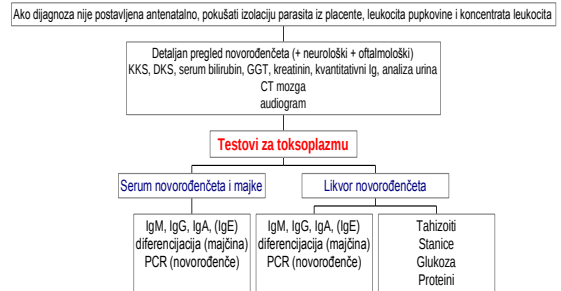
Serološka dijagnostika

- Negativan IgM i/ili IgG isključuje **akutnu** toksoplazmozu
 - U akutnoj infekciji oba moraju biti prisutna!
- Ako je screening IgG pozitivan treba napraviti IgM
- Kod sumnje na akutnu infekciju uzorke poslati u **referentni centar** za dijagnostiku toksoplazmoze
 - IgA (IgE), test avidnosti protutijela

PRENATALNA DIJAGNOSTIKA KONATALNE TOKSOPLAZMOZE



NEONATALNA DIJAGNOSTIKA KONATALNE TOKSOPLAZMOZE



DOKAZ KONATALNE INFEKCIJE

- IgM u fetalnoj krvi
 - Potvrditi nalaz u novom uzorku nakon 10 dana
- IgG prolaze transplacentarno!!!
 - IgM i IgA ne prolaze
- U 20-30% inficiranih fetusa **ne mogu** se dokazati IgM, ni IgA
- Kontrola UZV
 - rane promjene mozga (hidrocefalus, kalcifikati), jetre (povećanje, kalcifikati, ascites)

RAZLIKOVANJE AKUTNE OD LATENTNE TOKSOPLAZMOZE

- Nije moguće iz jednog uzorka seruma!**
- Praćenje dinamike titra protutijela
- Test avidnosti IgG
- Direktna dijagnostika – PCR, kultivacija uzročnika

