

Oküler Toksoplazmoziste Tanı Yöntemleri*

İlknur Tuğal Tutkun (*)

ÖZET

Oküler toksoplazmozisin tipik klinik bulguları görülen hastalarda herhangi bir titrede serum IgG pozitifliği ile tanı doğrulanır. Çok düşük düzeydeki serum IgG antikor titrelerinin saptanması için Sabin-Feldman boya testi kullanılır. Klinik bulguları atipik olan hastalarda, sadece pozitif serolojiye dayanarak oküler toksoplazmozis tanısı konulamaz. Bu grupta, lokal yapılan anti-toksoplazma antikorlarının ve/veya toksoplazma DNA'sının saptanması amacıyla intraoküler sıvı analizi gereklidir.

Anahtar Kelimeler: Oküler toksoplazmozis, tanı, seroloji, polimeraz zincir reaksiyonu

SUMMARY

Diagnostic Methods in Ocular Toxoplasmosis

In patients with typical clinical features of ocular toxoplasmosis, the diagnosis is confirmed by the positivity of serum IgG at any titer. Sabin-Feldman dye test is used to detect low titers of serum IgG antibodies. In patients with an atypical clinical presentation, diagnosis of ocular toxoplasmosis can not be made based on positive serology alone. In this group, analysis of intraocular fluids is required to detect locally produced anti-toxoplasma antibodies and/or toxoplasma DNA.

Key Words: Ocular toxoplasmosis, diagnosis, serology, polimerase chain reaction

GİRİŞ

Toksoplazma gondii infeksiyonunun kesin tanısı vücut sıvıları ve dokulardan T. gondii izolasyonu ve (fare inokülasyonu veya doku kültürü) ile veya dokularda kistlerin histopatolojik olarak görülmesi veya takizoitlerin immunohistokimyasal yöntemlerle gösterilmesi ile konur (1,2). Klinik pratikte ve özellikle oküler toksoplazmoziste bu tanı yöntemlerinden yararlanamıyoruz. Oküler toksoplazmozis tanısı genellikle seroloji ile desteklenen klinik bir tanı olmaktadır (3).

Toksoplazma gondii infeksiyonuna karşı ne hücre sel ne de hümmoral immunité tam bir koruyuculuk sağlamamaktadır. Vücutun başlıca savaş elemanları hücre

sel immunité elemanlarıdır: T lenfositler (özellikle CD8+), makrofajlar, NK (natural killer) hücreleri, LAK (lenfokinle aktive olan killer) hücreler, sitokinler (interferon gamma, TNF alfa, IL-2). Hümmoral mekanizmalar hücre içindeki canlı organizmalara etkili değildir. Ancak hücre dışındaki takizoitler antikor ve komplemanla bağlandığında lizis gerçekleşmektedir. Antikorla kaplanmış takizoitlerin hücreye penetrasyon yeteneği de kısıtlanmaktadır (1,4). Antikor cevabından asıl klinikte hastalığın tanısı ve takibinde yararlanmaktayız.

Sistemik akiz toksoplazma infeksiyonunu takiben serumda immunglobulin (Ig) M antikorunu bir hafta sonra pozitifleşir, birinci ayda en yüksek seviyeye çıkar ve

(*) Doç. Dr., İ.Ü. İst. Tıp Fak. Göz Hastalıkları A.D.

♦ 34. TOD Ulusal Kongresinde panel konuşması olarak sunulmuştur.

genellikle 9 aydan sonra kaybolur. Ancak bazı hastalarda 1 yıl, hatta daha uzun süre pozitif kalabilmektedir. Anti-Toksoplazma IgA antikorları 2-4 haftada pozitifleşir, ikinci veya üçüncü ayda pik yapar ve genellikle 7-9 aydan sonra kaybolur. IgG antikorları 1-2. haftada pozitifleşir, 1-2. ayda maksimum düzeye ulaşır ve çok düşük titrelere de olsa hayat boyu pozitif kalır. IgE ise ilk ortaya çıkan ve birkaç ay içinde kaybolan antikordur (1,5,6).

Serolojik Testler

Antikor düzeylerinin tayini için kullanılan çeşitli serolojik testler mevcuttur. Klinisyenin sonuçları doğru yorumlayabilmesi için laboratuvarın hangi metodla çalıştığını bilmesi gereklidir.

Sabin-Feldman Boya Testi

Diğer tüm serolojik testlerin güvenilirliğinin karşılaştırıldığı standart testtir. Ancak laboratuvarında canlı takizoit bulundurmaya gerektirmesinin yol açabileceği riskler nedeniyle tüm dünyada sadece referans niteliğindeki laboratuvarlarda uygulanabilmektedir. Hasta serumundaki IgG antikorları ile kaplanan takizoitlerin kompleman varlığında lizis olup metilen mavisiyle boyanmamasına dayalı hassas ve özgün bir testtir. Organizmaların sadece %50'sinde boyanma görülen serum dilüsyonu antikor titresi olarak verilir. (1,5,7,8).

İndirekt Flöresan Antikor Testi (IFA)

Boya testinden daha güvenli, uygulaması kolay ve daha ekonomik bir testtir. Üzerinde cansız takizoitler olan lamlara hasta serumu uygulanıp flöresin ile işaretli anti-human IgG veya IgM antikorları ile muamele ederek hasta serumundan takizoitlere bağlanan IgG ve IgM antikorları saptanır. Nonspesifik reaksiyona bağlı yalancı pozitiflikten kaçınmak için hasta serumunun 1:16 dilüsyonundan başlanarak test uygulanır. Bu durumda çok düşük antikor titrelerinde yalancı negatif sonuç alınabilmektedir. Serum IgG düzeyi çok yüksek olduğunda, kompetitif inhibisyon nedeniyle IgM yalancı negatif çıkarılmaktadır. Romatoid faktör pozitif olan hastalarda, romatoid faktörün anti-IgG niteliğinde bir IgM antikor olması nedeniyle yalancı pozitif IgM saptanabilir. Bu yalancı reaksiyonlar, testten önce jel filtrasyonu ile IgM antikorlarının IgG'den ayrılması ile veya serumun önceden stafilkok veya streptokok preparatına absorbe edilip tüm IgG antikorlarının ayıklanması ile önlenir. Ayrıca antinükleer antikor pozitif olan hastalarda da IgG ve IgM yalancı pozitiflik verebilmektedir. (1,7,9)

Direkt Aglutinasyon Testleri

Formalinle fikse edilmiş takizoitlere veya antijenle kaplı lateks partiküllerine bağlanıp aglutine eden IgG

antikorlarını saptamak için kullanılır. Bu test ile IgM antikor tayini yapılmaz (1)

İndirekt Hemaglutinasyon Testi

T. gondii antijeni ile kaplı eritrositleri aglutine eden antikolar saptanır. Bu testte boya testi veya IFA testinden daha sonra pozitif titre ortaya çıkar ve daha uzun sürer. Yalancı pozitiflik daha fazladır (1,10).

ELİSA Testleri

Ticari ELİSA kitlerinin güvenilirliği değişkendir. Farklı kitlerle çalışan laboratuvarlardan gelen titreler hastanın takibi amacıyla kıyaslanamaz. 1:100 dilüsyonda test yapılır. Sonuçlar hasta serumunun adsorbansının standardize kontrol adsorbansına oranı olarak verilir. Yalancı pozitiflikten kaçınmak için "double-sandwich ELİSA" ve "capture ELİSA" gibi metodlar mevcuttur. Ayrıca polarizasyona dayalı otomatize sistemlerin daha hassas olduğu bildirilmektedir (1, 6,8,9).

İmunosorban Aglutinasyon Test (ISAGA)

IgG, IgM, IgA ve IgE antikorlarını saptamak için kullanılan hassas ve özgün bir testtir. IgM için IFA'dan daha hassas bir testtir ve antinükleer antikor veya romatoid faktör pozitifliğinden etkilenmez (1)

AC/HS Test (Diferansiyel Aglutinasyon Testi)

IgM pozitif veya IgG çok yüksek titrelerde bulunarak akiz infeksiyon düşünülen hastalarda infeksiyonun zamanını tayin etmek için başvurulabilen bir testtir. Formalin ile fikse takizoitlerle (HS antijeni) aseton veya metanol ile fikse takizoitleri (AC antijeni) aglutine eden IgG titreleri kıyaslanır. İnfeksiyonun farklı evrelerinde antikor cevabının değişmesine dayanır. AC antijeni akut faz spesifik IgG'yi bağlar. Bu testten akut ve non-akut infeksiyon olarak iki tip cevap alınır (11, 12).

IgG Avidite Testi

Diferansiyel aglutinasyon testinde olduğu gibi akiz infeksiyonun zamanını araştırmak amacıyla uygulanır. Akut faz IgG antikorlarının antijene aviditesinin düşük olmasına dayalı bir testtir. Özellikle gebelerde infeksiyonun son birkaç ay içinde alındığını saptamak için uygulanır (13).

Akiz Sistemik İnfeksiyon Serolojik Tanı Kriterleri

1. Serumda IgG, IgA ve/veya IgE pozitifliği. IgM'nin bir yıldan daha uzun süre pozitif kala-

bildiği ve nadiren konjenital toksoplazmozisli çocukların rekürren retinitinde pozitifleşebildiği dikkate alınmalıdır.

2. Serokonversiyon
3. Serum IgG titresinde 4-6 hafta arayla alınan serum örneklerinde en az 4 kat artış.
4. Çok yüksek IgG titresi saptanması. (Farklı çalışmalarda bazal değer 1:256, 1:1024; 1:4096 olarak değişmektedir)
5. AC/HS test veya IgG avidite testinde akut patern saptanması.(1,5,14,15,16).

Konjenital İnfeksiyon Serolojik Tanı Kriterleri

1. Bir yaşına kadar bebeğin serumunda IgM, IgA ve/veya IgE pozitifliği. Bu antikorlar plasentadan geçmez. Yenidoğanların %30'unda IgM yapımının olmaması nedeniyle negatifliği infeksiyonu ekarte etmez.
2. IgG antikor titresinin stabil kalması, giderek yükselmesi ve bir yaşından sonrada hala pozitif olması. IgG antikor plasentadan geçebildiğinden erken dönemdeki pozitifliği anlam taşımaz.
3. Annede gebelik döneminde akiz infeksiyon lehine serolojik bulguların olması. (14, 17,18).

Oküler Toksoplazmoziste Serolojik Tanı

Serum antikor titreleri vücutta bütün olarak antijenik uyarıya bağlıdır. Göze sınırlı inflamasyonda bu boyutta uyarı yoktur veya çok düşük düzeydedir. Dolayısıyla serum IgG titresi ile oküler aktivite arasında korelasyon bulunmaz. Retinit rekürrensında serum IgM pozitifliği çok nadir olarak bildirilmiştir. Bu nedenlerle gözde tipik klinik bulguların varlığında herhangi bir titrede serum IgG pozitifliği tanı için yeterlidir. Serum IgG düzeyi çok düşük olduğunda ancak dilue edilmemiş serumda antikor saptanabilir. Klinik olarak oküler toksoplazmozis tanısı konulmuş ancak standart serolojik testlerde IgG negatif bulunmuş ise başvurulması gereken tanısal yaklaşım 1:4 veya 1:2 dilusyonda, hatta dilue edilmemiş serumda Sabin-Feldman boya testinin yapılmasıdır. Dilue edilmemiş serumda da boya testi negatif sonuç verirse tanıdan uzaklaşılır. Diğer tüm serolojik testlerde dilusyonun azaltılması ile nonspesifik yalancı pozitif reaksiyon görülmesi nedeniyle bu yaklaşım sadece boya testi için geçerlidir (1,7,8,9,17).

Diğer taraftan birçok toplumda anti-toksoplazma antikor prevalansının yüksek olması nedeniyle serolojik

tanımın değeri sınırlıdır. Serum IgG antikorunun pozitif olması hastanın her türlü göz lezyonunun toksoplazmadan kaynaklandığını ispatlamaz. Klinik bulgusu atipik olan ancak ayırıcı tanıda toksoplazmanın da yer aldığı olgularda ileri tanı yöntemlerine başvurmak gerekebilir. Bu olgularda, ancak gözde lokal antikor yapımının saptanması veya antijen varlığının gösterilmesi ile kesin tanı konabilir (1,4,5,7,17).

Lokal Antikor Yapımının Saptanması

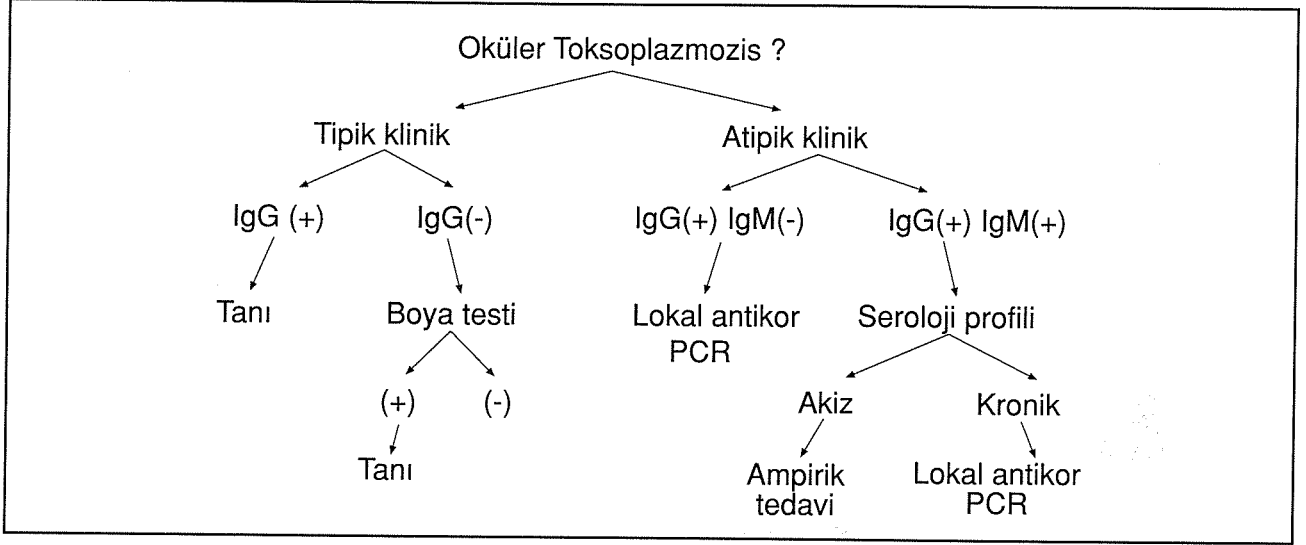
Hümor aköz veya vitreus örneğinde ölçülen spesifik antikor titresinin seruma göre daha yüksek bulunması lezyonun toksoplazma infeksiyonundan kaynaklandığını ispatlar (1,17,19-23). İnflame gözde serum antikorlarının intraoküler sıvılara pasif difüzyonundan ileri gelebilecek yüksek titrelerle bağlı yalancı pozitiflikten kaçınmak için total immunglobulin konsantrasyonu da dikkate alınmalıdır. Aynı şekilde intraoküler albumin konsantrasyonunun yüksek olması da kan-göz bariyerinin yıkıldığını gösterir. Goldmann-Witmer formülü uygulanarak intraoküler antikor titrelerinin gerçekten lokal infeksiyona bağlı olup olmadığı saptanır:

$$\frac{\text{Oküler antikor titresi}}{\text{Oküler total Ig}} : \frac{\text{Serum antikor titresi}}{\text{Serum total Ig}}$$

Antikor titreleri boya testi, İFA veya ELİSA ölçümlerine dayalı olabilir. Örneğin 1:256 olan antikor titresine formüle 256 olarak yerleştirilir. Total Ig titreleri radial immunodifüzyon tekniği ile ölçülebilir. Teorik olarak formüle edilen değerlerin sonucu 1'den yüksekse lokal antikor yapımı olduğu söylenebilir; ancak pratikte daha güvenilir olması amacıyla 3, hatta 8'den büyük katsayı bulunması gerekmektedir (1,17,19-22).

Poliklonal B lenfosit aktivasyonuna bağlı yalancı pozitif sonuçtan kaçınmak için birden fazla etkenin test edilmesi gerektiği bildirilmektedir (17,19). Konjenital infeksiyonda veya akiz sistemik infeksiyonda bu yöntem güvenilir değildir. Serum antikor titresi 1:1000'in üzerinde ise yalancı negatif sonuç alınır (1,17). Testin güvenilir olduğu hasta grubu rekürren retinitin ayırıcı tanısının yapılması gereken gruptur. Ancak inflamasyonun erken fazında (ilk 3 hafta) henüz yeterli antikor yapımı olmadığından yalancı negatif sonuç alınabilir (1, 17,19). Rezolusyondan sonra da test negatifleşir. Aktif inflamasyonu olmayıp sadece toksoplazma retinit skarı olan hastalarda katsayı normal bulunur (1,19). İmmün yetmezliği olmayan hastalarda bu yöntemin hassasiyetinin %74, özgünlüğünün %100 olduğu bildirilmektedir (19). İmmüsupresyonu olan hastalarda bu yöntem yalancı negatif sonuç vermektedir (20).

Şekil 1. Oküler toksoplazmoziste tanısal yaklaşım



Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Göz sıvılarında toksoplazma DNA'sının gösterilmesine dayanır. Optimal şartlarda test örneğinde 1 parazit, pratikte 5 parazitin varlığı saptanabilir. Özgünlüğü yüksek (optimal şartlarda %100), hassasiyeti düşük bir testtir. Vitreus örneğinde aköze göre daha hassas bir yöntem olduğu bildirilmektedir. Lokal antikor yapımından daha erken dönemde pozitif sonuç alınabilir ve hastanın tedavi altında olmasından etkilenmez. Özellikle AIDS gibi immunsupresyonu olan hastalarda tercih edilecek tanı yöntemidir (7,11,19,20,24,25).

Yukarda anlatılan tanı yöntemleri birlikte uygulandığında doğru tanı olasılığı artmaktadır. Runday ve ark. oküler toksoplazmozisli 88 hastanın intraoküler sıvı analizinde %27 oranında sadece intraoküler IgG, %15 oranında sadece intraoküler IgA, %37.5 oranında hem IgG hemde IgA pozitifliği saptadıklarını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada yazarlar, tek başına PCR pozitifliğinin hassasiyetinin %27 olduğunu; intraoküler IgG pozitifliği ile beraber PCR pozitifliğinin hassasiyetinin %77 olduğunu; buna intraoküler IgA pozitifliği de eklendiğinde hassasiyetin %91'e çıktığını saptamışlardır (6). Ongkosuwito ve ark. primer yani skarı olmayan oküler toksoplazmozisli 22 hasta ile rekürren toksoplazma retinitini olan 42 hastadan oluşan iki grubu karşılaştırdıkları çalışmada, primer retinit grubunda intraoküler IgG pozitifliğinin %41, PCR pozitifliğinin %37, intraoküler IgA pozitifliğinin %57 oranında saptandığını, rekürren retinit grubunda IgG'nin %84, PCR'in %4, IgA'nın %23 oranında pozitif olduğunu bildirmişlerdir. İstatistiksel analizde intraoküler IgG'nin rekürren retinitte, PCR pozitifliğinin primer infeksiyonda anlamlı derecede fazla olduğunu, intraoküler IgA açısından iki grup arasında anlam-

lı bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada yazarlar primer oküler toksoplazmozisli hastaların sadece %50'de akiz infeksiyon serolojisi saptamışlardır (14). Bu çalışma, daha önce tutulmamış bir gözde de kronik dönemde retinit ortaya çıkabildiğini göstermektedir. Aynı şekilde Montaya ve ark. atipik klinik bulguları olan ve vitreus PCR pozitifliği ile oküler toksoplazmozis tanısı alan 7 hastanın 5'inde kronik infeksiyon, 2'sinde akiz infeksiyon serolojisi saptamışlardır (11).

Yukarda anlatılan tanı yöntemlerinin klinikte kullanımını Şekil 1'de şematik olarak özetlenmiştir. Tipik klinik bulguları nedeniyle oküler toksoplazmozis düşünülen bir hastada herhangi bir titrede IgG pozitif bulunduğu ileri tetkike gerek olmadan tanı konulur. Böyle bir hastada IFA veya ELİSA testte IgG negatif ise düşük dilusyonda veya dilue edilmemiş serumda Sabin-Feldman boya testi istenmelidir. Ancak bu testte negatif sonuç verirse tanıdan uzaklaşılır. Klinik bulguları atipik olan, ancak ayırıcı tanıda toksoplazmanın da yer aldığı bir hastada IgG (+), IgM(-) ise intraoküler sıvı analizi ile tanıya gidilebilir. Böyle bir hastada IgM (+) ise gerçek bir akiz sistemik infeksiyon zemininde primer retinit olup olmadığını saptamak için seroloji profili tamamlanmalıdır. Akiz sistemik infeksiyon kanıtlanırsa anti-toksoplazma tedaviye başlanmalıdır. Seroloji kronik infeksiyon lehine sonuç verirse oküler toksoplazmozis tanısı ancak intraoküler sıvı analizi ile konabilir.

Klinikte en fazla karşılaştığımız hasta grubu, tipik skarı ve retinit rekürrensisi olan hastalardır. Kronik fazda serum IgG (+) olan bu hastalarda konjenital infeksiyon / postnatal infeksiyon ayırıcı tanısı yapılamaz (15). Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar ve klinik veriler, eskiden düşünüldüğünün aksine, oküler toksoplaz-

mozis olgularının 2/3'nin postnatal infeksiyondan kaynaklandığını düşündürmektedir (26).

KAYNAKLAR

- Holland GN, O'Connor GR, Belfort R, Remington JS: Toxoplasmosis. In *Ocular Infection & Immunity* Pepose JS, Holland GN, Wilhelmus KR. Eds. St Louis. Mosby. 1996; 1183-1223.
- Mai ELC, Green WR, O'Brien TP: Update on therapy of parasitic retinal infection. *Ophthalmol Clin North America* 1999;12:123-144.
- Atmaca L: Oküler toksoplazmozis. *T Oft Gaz* 1987; 17:399-406.
- Nussenblatt RB, Whitcup SM, Palestine AG: Ocular toxoplasmosis. In *Uveitis Fundamentals and Clinical Practice*. Second edition. St Louis. Mosby. 1996; 211-228.
- Holland GN: Ocular toxoplasmosis: new directions for clinical investigation. *Ocular Immunology and Inflammation* 2000; 8:1-7.
- Ronday MJH, Ongkosuwito JV, Rothova A, Kijlstra A: Intraocular anti-Toxoplasma gondii IgA antibody production in patients with ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol* 1999; 127:294-300.
- Rutzen AR, Smith RE, Rao N: Recent advances in the understanding of ocular toxoplasmosis. *Curr Opin Ophthalmol* 1994; 5:3-9.
- Rothova A, van Knapen F, Baarsma GS, Kruit PJ, et al: Serology in ocular toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol* 1986; 70:615-622.
- Weiss MJ, Velazquez N, Hofeldt AJ: Serologic tests in the diagnosis of presumed toxoplasmic retinochoroiditis. *Am J Ophthalmol* 1990; 109:407-411.
- Türker G, Urgancıoğlu M, Öngör E: Üveitlerde toksoplazmozis deri testi ile hemaglutinasyon testinin değeri. XIV. Ulusal Türk Oft. Kong Bült. İstanbul. Matbaa Tekn Basımevi. 1980. 207-211.
- Montoya JG, Parmley S, Liesenfeld O, Jaffe GJ, Remington JS: Use of polymerase chain reaction for diagnosis of ocular toxoplasmosis. *Ophthalmology* 1999; 106:1554-1563.
- Dannemann BR, Vaughan WC, Thulliez P, Remington JS: Differential agglutination test for diagnosis of recently acquired infection with *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 1990; 28:1928-1933.
- Hedman K, Lappalainen M, Seppala I, Makela O: Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Infect Dis* 1989; 159:736-739.
- Ongkosuwito JV, Bosch-Driessen EH, Kijlstra A, Rothova A: Serologic evaluation of patients with primary and recurrent ocular toxoplasmosis for evidence of recent infection. *Am J Ophthalmol* 1999; 128:407-412.
- Bosch-Driessen EH, Rothova A: Recurrent ocular disease in postnatally acquired toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol* 1999; 128:421-425.
- Holland GN, Muccioli C, Silveira C, Weisz JM, et al: Intraocular inflammatory reactions without focal necrotizing retinochoroiditis in patients with acquired systemic toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol* 1999; 128:413-420.
- Rothova A: Ocular involvement in toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol* 1993; 77:371-377.
- Mets MB, Holfels E, Boyer KM, Swisher CH, et al: Eye manifestations of congenital toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol* 1996; 122:309-324.
- De Boer JH, Luyendijk L, Rothova A, Kijlstra A: Analysis of ocular fluids for local antibody production in uveitis. *Br J Ophthalmol* 1995; 79:610-616.
- De Boer JH, Verhagen C, Bruinenberg M, Rothova A, et al: Serologic and polymerase chain reaction analysis of intraocular fluids in the diagnosis of infectious uveitis. *Am J Ophthalmol* 1996; 121:650-658.
- Baarsma GS, Luyendijk L, Kijlstra A, deVries J, et al: Analysis of local antibody production in the vitreous humor of patients with severe uveitis. *Am J Ophthalmol* 1991; 112:147-150.
- Klaren VNA, Van Doornik CEM, Ongkosuwito JV, Feron EJ, Kijlstra A: Differences between intraocular and serum antibody responses in patients with ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol* 1998; 126:698-706.
- Erçikan C: Ön kamara mayiindeki antikor titrajının serumdan yüksek bulunduğu bir vak'a ile gözyaşında toksoplazma antikorlarının mevcudiyetinin tespiti. XIV. Ulusal Türk Oft. Kong Bült. İstanbul. Matbaa Tekn Basımevi. 1980; 148-150.
- Aouizerate F, Cazenave J, Poirier L, Verin P, et al: Detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humour by the polymerase chain reaction. *Br J Ophthalmol* 1993; 77:107-109.
- Norose K, Tokushima T, Yano A: Quantitative polymerase chain reaction in diagnosing ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol* 1996; 121:141-142.
- Gilbert RE, Stanford MR: Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? *Br J Ophthalmol* 2000; 84:224-226.