

DIJAGNOSTIKA TOKSOPLAZMOZE I BARTONELOZE

OKTAVIJA ĐAKOVIĆ RODE*

U kliničkoj praksi dijagnoza bartoneloze i toksoplazmoze primarno se temelji na serološkim testovima za određivanje specifičnih protutijela. Problem serološke dijagnostike je perzistiranje protutijela dugo vrijeme. Općenito, serološka dijagnoza temelji se na rezultatima testiranja parnih uzoraka seruma koji su testirani istovremeno (ista metoda, isti reagensi) i određivanju dinamike protutijela. Dodatni serološki testovi (testovi avidnosti, diferencijalne aglutinacije) mogu pomoći u isključivanju recentne toksoplazmoze prije testiranja sljedećeg seruma. Ne postoji jedan izdvojeni test za potvrdu dijagnoze akutne ili kronične toksoplazmoze. Laboratorijska dijagnostika bartoneloze i toksoplazmoze obuhvaća također histopatološke metode i kultivaciju iz različitih kliničkih materijala, te umnožavanje DNA iz humanih uzoraka metodama PCR. Najvažnija je primjerena i pouzdana interpretacija rezultata laboratorijskih testiranja. Postavljanje dijagnoze ne smije se temeljiti na rezultatima samo jednog testa. Nalazi različitih dijagnostičkih postupaka trebaju što bolje definirati vrijeme nastanka infekcije i dokazati moguću akutnu i/ili konatalnu infekciju.

Deskriptori: TOKSOPLAZMOZA, BARTONELOZA, SEROLOŠKA DIJAGNOSTIKA, LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Toksoplazmoza i bartoneloza su infekcije koje u imunokompetentnih osoba najčešće prolaze inaparentno, a povezuje ih isti izvor, tj. mačka. Tokso-plazmozu uzrokuje parazit *Toxoplasma gondii*, a bartoneloze uzrokuju bakterije roda *Bartonellaceae*. Zajedničko im je također da se rutinska dijagnostika temelji na određivanju specifičnih protutijela u serumu.

TOKSOPLAZMOZA

Toxoplasma gondii, uzročnik toksoplazmoze, unutarstanični je parazit endemski raširen po čitavom svijetu. Infekcija se najčešće stječe ingestijom nedovoljno termički obrađenog mesa različitih zaraženih životinja s tkivnim cistama ili gutanjem oocista kontaminiranom hranom ili vodom (1, 2). Konačni domaćin u kojem se odvija spolni razvoj toksoplazmi je mačka. Mačke proizvode oociste koje se fecesom izlučuju u okolinu i kontaminiraju zemlju i vodu. Neposredno

izlučene oociste nisu infektivne. Da bi postale infektivne moraju proći fazu sporulacije u tlu. Vrijeme sporulacije ovisi o temperaturi okoliša i prosječno traje 1-5 dana. Na temperaturi od 24°C sporulacija traje 2-3 dana, a na 11°C može trajati 2-3 tjedna. Oociste su otporne na vanjske utjecaje i u vlažnom tlu mogu preživjeti 18 mjeseci. Nakon ingestije toksoplazmi, u crijevu dolazi do lize oocista ili tkivnih cista, oslobađanja parazita, prodiranja u krvotok i diseminacije po organizmu. Paraziti (zoiti) mogu napasti različite stanice s jezgrom unutar kojih se brzo umnožavaju (tahizoiti). Kad se umnože u velikom broju dolazi do pucanja stanice i do ponovne diseminacije parazita. Ciljni organi mogu biti mišići, srce, jetra, slezina, limfni čvorovi i središnji živčani sustav. Imuni odgovor nosioca dovodi do kontrole parazita i zaustavljanja ubrzanog umnožavanja, te stvaranja tkivnih cista ispunjenih bradizoitima, tj. parazitima koji se sporo dijele. Tkivne ciste ostaju doživotno prisutne i izvor su latentne infekcije koja se u određenim okolnostima oštećenja imuniteta može reaktivirati (2). Reaktivacija toksoplazmoze odnosno nastanak oportunističke infekcije kao rezultat primarne infekcije ili reaktivacije

poseban je problem u imunokompromitiranih osoba zbog pada staničnog imuniteta (3). Nadalje, u trudnoći toksoplazme u akutnoj bolesti prolaze placentu, oštećuju plod i mogu uzrokovati konatalne infekcije. Posljedice za plod ovise o gestacijskoj dobi u kojoj je došlo do serokonverzije u majke. U populaciji zdravih osoba, toksoplazmoza općenito ima blagi tijek i većinom prolazi asimptomatski. Procjenjuje se da samo oko 10-20% pacijenata s akutnom infekcijom razvije cervikalnu limfadenopatiju i/ili febrilnu bolest. Bolest najčešće prolazi bez terapije. Iznimno, mogu se javiti komplikacije poput miokarditisa, hepatitisa, pneumonije, meningoencefalitisa ili retinokorioiditisa. Imunodeficientne osobe mogu razviti bolest središnjeg živčanog sustava, korioretinitis ili pneumonitis. Procjenjuje se da je manje od 1% osoba s dokazanim protutijelima za toksoplazmu imalo simptome infekcije i klinički postavljenu dijagnozu (4). Kliničke manifestacije koje uzrokuje *T. gondii* nisu specifične, pa se u diferencijalno dijagnostičke postupke različitih kliničkih slika mora uključiti i dijagnostika tokoplazmoze (4, 5). Dijagnoza toksoplazmoze postavlja se na temelju laboratorijskih testova.

*Klinika za infektivne bolesti
"Dr. Fran Mihaljević", Zagreb

Adresa za dopisivanje:
Mr. sc. Oktavija Đaković Rode, dr. med.
Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević"
10000 Zagreb, Mirogojska 8

Laboratorijska dijagnostika toksoplazmoze

Za postavljanje dijagnoze koriste se različite metode laboratorijske dijagnostike koje ovise o kliničkoj slici i statusu pacijenta. Posebno je važna pravilna interpretacija laboratorijskih nalaza (6). Akutnu toksoplazmozu najsigurnije je potvrditi dokazom uzročnika. Međutim, izravno dokazivanje uzročnika mikroskopiranjem obojanih kliničkih materijala složena je i jako zahtjevna metoda niske osjetljivosti. T. gondii rijetko se može dokazati mikroskopiranjem kliničkih uzoraka (krv, sputum, koštana srž, likvor, bioptati limfnog čvora, tonzila, mišića, ventrikularna tekućina) obojanih po May-Grunwald-Giemsai ili metodom izravne imunofluorescencije pomoću monoklonskih protutijela. Detekcija parazita, posebno iz krvi, zbog niske osjetljivosti nije pogodna za rutinsku dijagnostiku. Toksoplazme se mogu detektirati i iz obojanih histoloških preparata ili imunohistokemijskim metodama s obilježenim monoklonskim protutijelima (imunoperoksidaza) (2). Češće se za dokazivanje uzročnika koriste neizravne metode dokazivanja parazita inokulacijom kliničkih materijala u pokusne životinje (miš) ili stanične kulture, što se radi samo u referentnim centrima. Određivanje T. gondii ili genskog materijala izvodi se iz različitih uzoraka kao što su: amnionska tekućina, fetalna krv, krv iz pupkovine ili placenta za dokaz konatalne toksoplazmoze, krv (rijetko pozitivna), koštana srž, likvor, bronhoalveolarni lavat i biopat mozga u imunokompromitiranih pacijenata s teškom toksoplazmozom i očna vodica ako se radi o okularnoj toksoplazmozi. Za prenatalnu dijagnostiku konatalne infekcije s T. gondii preporuča se odrediti genski materijal parazita iz amnionske tekućine metodama molekularne dijagnostike (PCR). Metoda je 100% specifična i u usporedbi s klasičnom izolacijom uzročnika veće je osjetljivosti (7). No, za određivanje cirkulirajućih antigena T. gondii iz krvi PCR je slabo osjetljiva metoda i ne preporuča se. PCR ima ograničenja u dijagnostici teških oblika toksoplazmoze u imunokompromitiranih pacijenata, jer ne razlikuje radi li se o aktivnoj toksoplazmozi (trofozoiti) ili

o latentnim oblicima (bradizoiti u tkivnoj cisti) ako se T. gondii detektira u solidnim tkivima (srce, mišići, mozak). U fokalnoj cerebralnoj toksoplazmozi osjetljivost PCR iz periferne krvi ili likvora je prema studijama između 11% i 77% (8). Negativan nalaz PCR stoga ne isključuje dijagnozu toksoplazmoze. Nalaz treba interpretirati zajedno s rezultatima ostalih dijagnostičkih postupaka. Međutim, pozitivan nalaz iz bilo kojeg fetalnog uzorka potvrđuje konatalnu infekciju. Općenito, pozitivan nalaz PCR iz tekućih uzoraka upućuje na aktivnu infekciju. Određivanje T. gondii ili genskog materijala preporuča se koristiti u slučajevima oštećenja imuniteta i neadekvatnog stvaranja protutijela, odnosno za dokaz konatalne i okularne infekcije. Dokaz toksoplazmi iz amnionske tekućine metodom PCR zamjenjuje dijagnostiku iz fetalne krvi (7).

Serološka dijagnostika toksoplazmoze

Primarna dijagnostička metoda za postavljanje dijagnoze toksoplazmoze je određivanje specifičnih protutijela za T. gondii. Serološka dijagnostika prati imuni odgovor. Uz pravilnu interpretaciju rezultata osnovna je i najpouzdanija metoda, posebno kad se radi o populaciji visoke prevalencije toksoplazmoze. Rutinski se mogu određivati specifična protutijela razreda IgM i IgG, a dodatno i protutijela IgA i IgE (1, 2, 9, 10). Protutijela IgM javljaju se rano, unutar jednog tjedna nakon početka infekcije. Obično nestaju unutar 6-9 mjeseci nakon infekcije, no češće mogu dugo perzistirati. Iako se protutijela IgM javljaju u akutnoj infekciji, perzistiraju predugo (ponekad 18 mjeseci, pa i godinama) da bi bili dobar indikator za recentnu infekciju. Protutijela IgM ne prolaze placentu, ali pri oštećenju placente može doći do prijelaza IgM i IgA od majke na dijete. Za sigurnu potvrdu nalaza protutijela IgM i IgA u novorođenčeta treba nakon nekoliko dana testirati još jedan uzorak seruma djeteta da se isključi mogući prijelaz protutijela IgM odnosno IgA pri porodu. Poluvrijeme života protutijela IgM iznosi 3 do 5 dana. U konatalnoj infekciji prisutna su aktivno proizvedena protutijela u djeteta (10, 11). Razlikovanje majčinih protutijela od protutijela novorođenčeta

može se procijeniti određivanjem odnosa protutijela, tzv. *antibody index* ili *immune load*, tako da se usporede razine specifičnih IgG majke i djeteta s ukupnim IgG koji su istovremeno određeni iz istih uzoraka seruma istom metodom u istom laboratoriju. Antibody index koristi se i za procjenu intratekalne sinteze odnosno proizvodnje protutijela u očnoj vodici u okularnoj toksoplazmozi. Indeks ili odnos protutijela veći od 3 za ispitivanu tekućinu u usporedbi s referentnim serumom upućuje na lokalnu proizvodnju protutijela. Dakle, indeks ili odnos protutijela može se određivati za protutijela u likvoru ili očnoj vodici prema protutijelima u serumu, za protutijela iz seruma novorođenčeta prema protutijelima iz seruma majke pri porodu ili za protutijela seruma novorođenčeta koji se uzimaju u mjesečnim razmacima kod konatalne toksoplazmoze (2). Specifična protutijela IgG javljaju se kasnije i postepeno rastu. Vrh dostižu oko 2 do 5 mjeseci nakon početka kliničkih simptoma. Općenito, predstavljaju pokazatelje imunosti. Za određivanje vremena infekcije neophodno je praćenje dinamike titra protutijela. Potrebno je odrediti titar protutijela IgG u najmanje dva uzorka seruma koji su oduzeti u razmaku od 2 do 3 tjedna i testirani istovremeno istom metodom na jednom mjestu. Za određivanje stabilnog titra IgG protutijela serumi se uzimaju u razmaku od 3 tjedna. Porast titra protutijela na početku akutne infekcije je brži i može se determinirati u serumima uzetim u razmaku od 1 do 2 tjedna. Protutijela IgG mogu se određivati različitim metodama kao što su Sabin-Feldmanov "dye test", enzimski imunotestovi (EIA, ELISA = *enzyme-linked immunosorbent assay*), neizravna imunofluorescencija i aglutinacijski testovi (2, 12, 13). Sabin-Feldmanov test postavljen 1948. godine, još se uvijek smatra postupkom prema kojem se evaluiraju ostale metode. To je osjetljiv i specifičan test u kojem paraziti u prisutnosti protutijela i komplemenata ne mogu primiti boju metilensko modri. Test postaje pozitivan u trećem tjednu bolesti i ostaje pozitivan godinama. Titar protutijela ne korelira s težinom bolesti. Neki pacijenti mogu godinama zadržavati jako visoke razine protutijela. Test se može izvoditi samo u referentnim centrima u kojim se para-

ziti mogu izolirati(2). Testovi neizravne imunofluorescencije (IFA) su usporedivi s rezultatima Sabin-Feldmanovog testa. Nedostatak IFA je mogućnost pojave lažno pozitivnih rezultata zbog antinuklearnih protutijela, kao i lažno negativnih nalaza u pacijenata s niskim titrom protutijela IgG ili u pacijenata s visokom razinom IgG, ako se prije određivanja IgM ne napravi apsorpcija, tj. uklanjanje IgG (2). U aglutinacijskim testovima koristi se vezanje cijelih tahizoita obrađenih različitim kemikalijama sa specifičnim protutijelima. Visoko osjetljiva metoda ISAGA (*immunosorbent agglutination assay*) pouzdana je za ispitivanje protutijela IgM u trudnica, ali se ne preporuča za duže praćenje protutijela IgM, jer može ostati jako pozitivna dulje od godinu dana nakon primarne infekcije (2). Diferencijalni aglutinacijski test (AC/HS) prema literaturnim podacima može razlikovati akutnu od kronične bolesti na temelju vezanja protutijela na tahizoite koji su obrađeni različitim reagensima, tj. acetonom i formalinom. Test nije komercijalno dostupan (14). Enzimski imunotestovi (EIA, ELISA) najčešće su korištena metoda za određivanje protutijela u toksoplazmozi. Važno je naglasiti da se na temelju jednog rezultata određivanja protutijela, bez obzira koliki je titar, ne može zaključivati o vremenu nastanka infekcije. Za provjeru kontakta s toksoplazmom najčešće se određuju protutijela IgM i IgG. Prisutnost samo protutijela IgG govori za raniju infekciju u prošlosti. Rezultat testiranja protutijela IgM treba pravilno interpretirati budući da IgM mogu perzistirati predugo da bi bila siguran dokaz akutne infekcije. Negativan nalaz IgM isključuje akutnu infekciju. Za potvrdu akutne toksoplazmoze posebno u trudnoći potrebno je uključivanje različitih potvrdnih testova i njihova pravilna interpretacija (13-15). Akutna infekcija u trudnoći može se dijagnosticirati dokazom serokonverzije u majke koja je imala negativan nalaz neposredno prije trudnoće ili dokazom značajnog porasta titra protutijela u parnim uzorcima seruma. Za potvrdu akutne infekcije u testu ELISA potrebno je dokazati dvostruki ili veći porast titra protutijela. Najmanje četverostruki porast titra protutijela dokaz je akutne infekcije u testu IFA. Na recentnu toksoplazmozu upućuje nalaz najma-

nje dvostrukog porasta titra protutijela IgG uz istovremenu prisutnost protutijela IgM iz parnih uzoraka seruma koja su određivana ELISA metodom.

Avidnost protutijela IgG za *Toxoplasma gondii*

Recentna infekcija može se isključiti određivanjem avidnosti protutijela IgG. Avidnost je jačina vezanja protutijela za antigen (2, 13). Avidnost protutijela IgG raste kako se razvija imuni odgovor. U početku infekcije, tijekom akutne bolesti, protutijela IgG se vežu slabo za antigen, tj. imaju nisku avidnost, dok je u kroničnoj infekciji avidnost visoka. Promjena niske u visoku avidnost događa se u većine pacijenata unutar 6 mjeseci. Visoka avidnost dokaz je ranije infekcije koja traje dulje od 3 do 5 mjeseci. Protutijela niske avidnosti perzistiraju 3 do 5 mjeseci, što onemogućava sigurnu potvrdu recentne infekcije. Metoda se temelji na određivanju odnosa titra protutijela koja su određena klasičnim postupkom ELISA i titra protutijela istog ELISA postupka u kojem se na vezanje antigena i protutijela djelovalo reagensom koji raskida tu vezu. Kad je avidnost visoka, reakcije u oba testiranja su približno jednake, dok je odnos vezanih i nevezanih protutijela u ranoj infekciji nizak. Visoka avidnost smatra se pokazateljem infekcije u dalekoj prošlosti, dok niska avidnost ne potvrđuje uvijek recentnu infekciju, budući da je u nekih osoba porast avidnosti jako spor. Glavna indikacija za određivanje avidnosti protutijela za toksoplazmu je nalaz stabilnog titra protutijela u trudnica uz pozitivan nalaz IgM. Ako je prvi serum uzet prekasno, tj. nakon više od 2 mjeseca gestacije, vjerojatnost infekcije nakon početka trudnoće ne može se sigurno isključiti. Visoka avidnost IgG u prvom serumu utvrđuje da se infekcija dogodila prije trudnoće. Određivanje avidnosti protutijela u trudnica u kojih su prisutna protutijela IgM i IgG najkorisnije je ipak u ranoj trudnoći. Nadalje, nalaz visoke avidnosti u kasnoj trudnoći ne može sa sigurnošću isključiti akutnu infekciju tijekom prvih gestacijskih mjeseci. Danas su komercijalno dostupni mnogobrojni različiti testovi, pa se preporuča određivanje protutijela IgG testovima koji izražavaju rezultate u internacio-

nalnim jedinicama (*international units* - IU). Razina protutijela, odnosno titar, uspoređuje se sa standardnom krivuljom preporučenom od Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), nacionalnog ureda za kontrolu kvalitete i proizvođača testa. Iako korištenje IU olakšava usporedbu rezultata, točna usporedba dva titra protutijela iz parnih uzoraka seruma moguća je jedino usporednim istovremenim testiranjem parnih seruma istom metodom i jednom laboratoriju (15).

Protutijela IgG za *Toxoplasma gondii* u novorođenčadi

Protutijela IgG u novorođenčadi mogu biti pasivno prenesena od majke ili aktivno proizvedena u konatalnoj infekciji. Protutijela IgM ne moraju uvijek biti prisutna. Može se odrediti specifična protutijela IgA koja su osjetljivi indikator konatalne infekcije (16). Ako u majke tijekom trudnoće nisu determinirana protutijela IgM konatalna infekcija može se isključiti, ali ako majčini serumi pokazuju pozitivan nalaz protutijela IgM, novorođenče treba pratiti u dvomjesečnim intervalima da se dokaže gubitak pasivno prenesenih protutijela. Prisutnost specifičnih protutijela IgG u novorođenčadi dulje od godinu dana smatra se potvrdom konatalne infekcije. U novorođenčadi s konatalnom toksoplazmozom javljaju se specifična protutijela IgM i IgA i titar IgG raste nekoliko tjedana ili mjeseci nakon rođenja (11, 17).

Protutijela IgA i IgE za *Toxoplasma gondii*

Protutijela IgA javljaju se oko 5 dana nakon pojave IgM. Obično nestaju nakon 6 do 12 mjeseci, tj. nešto ranije nego IgM, kad IgG počinje padati. Mogu perzistirati mjesecima, pa i više od godinu dana. Prema nekim radovima pouzdaniji su indikator konatalne infekcije nego IgM, jer su specifičniji u akutnoj infekciji. U rijetkim slučajevima moguća je primarna toksoplazmoza bez detektabilnih protutijela IgA (17, 18). Produkcija IgE tijekom primarne toksoplazmoze je kratkotrajna, no nije konstantna (19).

Protutijela za *Toxoplasma gondii* u bolesnika zaraženih HIV-om

Serološko testiranje ima značenje u otkrivanju rizika za tešku toksoplazmozu. U osoba zaraženih HIV-om koji imaju negativan serološki nalaz rizik toksoplazmoze je nizak. Preporuča se praćenje njihovog statusa u intervalima od 6-12 mjeseci, radi moguće zaraze ili uvođenja pravovremene profilakse za sprječavanje primarne infekcije (1). Osobe koje imaju pozitivna protutijela za toksoplazmu imaju rizik i za reaktivaciju toksoplazmoze. Iako postoje različita mišljenja, pretpostavlja se da je u osoba zaraženih HIV-om rizik reaktivacije toksoplazmoze veći ako je broj limfocita CD4⁺ manji od 200/mm³. U nekim je radovima uočeno da se rizik također povećava ako je titar protutijela IgG jako visok (20). Stoga je korisno odrediti titar protutijela za toksoplazmu pri postavljanju dijagnoze HIV-a, a zatim pratiti razinu protutijela kad broj limfocita CD4⁺ padne ispod 200/mm³, kao prediktivnu vrijednost za nastanak toksoplazmoznog encefalitisa. Određivanje titra IgG kad je broj CD4⁺ manji od 200/mm³ može pomoći u odlučivanju o uvođenju profilakse (3, 20).

Zaključno, dijagnoza akutne toksoplazmoze ne može se postaviti na temelju jednog nalaza, već je potrebno sagledati rezultate različitih testiranja i pravilno interpretirati rezultate. Kad su u trudnica u prvoj serologiji prisutna protutijela IgM i IgG, dijagnostiku treba nadopuniti testovima avidnosti i drugim potvrdnim testovima (npr. određivanje protutijela IgA, diferencijalna aglutinacija, WB). Interpretacija serološkog nalaza temelji se na rezultatima testiranja parnih uzoraka seruma testiranih istom metodom u jednom laboratoriju. Nijedan od dostupnih testova nije 100% osjetljiv, pa je za dokaz konatalne infekcije potrebno kombinirati različite metode. Paraziti se mogu dokazati u amnijskoj tekućini, placenti, krvi pupkovine ili perifernoj krvi novorođenčeta metodom PCR ili inokulacijom u miša ili staničnu kulturu. Za prevenciju konatalne toksoplazmoze u područjima s visokom prevalencijom potrebno je serološko praćenje neimunih trudnica visoko osjetljivim testovima tijekom trudnoće, kako bi se što ranije otkrila primarna toksoplazmoza.

BARTONELOZE

Rod *Bartonella* obuhvaća patogene uzročnike ljudi i životinja koji u ljudi uzrokuju široki spektar kliničkih manifestacija, npr. bolest mačjeg ogreba (BMO), Parinaudov okulglandularni sindrom, infektivni endokarditis, urbanu rovovsku groznicu, Oroya groznicu, diseminirane infekcije u imunokompromitiranih, bakterijemije (21). *Bartonella bacilliformis*, uzročnik Oroya groznice, poznata je još od 1909. godine i dugo je bila jedini član roda *Bartonella*, koji je pripadao porodici *Rickettsiaceae*. 1990-ih godina došlo je do značajnih taksonomskih promjena i bartonele su klasificirane u porodicu *Bartonellaceae* koja je izdvojena iz reda *Rickettsiales*. Bartonele spadaju u subgrupu $\alpha 2$ razreda *Proteobacteria*. Rod *Bartonella* obuhvaća 16 vrsta. Većina ih je reklasificirana iz roda *Rochalimaea* (*B. quintana*, *B. henselae*, *B. elizabethae*, *B. vinsonii*) i iz roda *Grahamella* (*B. talpae*, *B. peromysci*, *B. grahamii*, *B. taylorii* i *B. doshiae*), tako da rodovi *Rochalimaea* i *Grahamella* više ne postoje. Kasnije su izolirane i nove vrste bartonela u životinja i ljudi, npr. *Bartonella washoensis* u pacijenta s kardijalnom bolesti (21-24). Bartonele su jedinstvene po specifičnoj povezanosti sa svojim rezervoarima, tj. sisavcima u kojih uzrokuju kroničnu bakterijemiju bez ili s minimalnim simptomima. Ljudi se obično inficiraju slučajno, budući da se bartonele prirodno nalaze u životinja, mačaka i pasa, koji žive u čovjekovoj blizini. Prenose se vektorima i parazitiraju u eritrocitima svojih prirodnih domaćina. Ta pojava bakterija u eritrocitima, u suprotnosti je s premissom da krv zdravih osoba treba biti sterilna (25). *Bartonella* spp. općenito uzrokuju perzistentne infekcije u osjetljivih domaćina. Potvrđeno je da se *B. bacilliformis* može prenijeti transfuzijom krvi, a *B. quintana* je bila opetovano izolirana u ljudi bez simptoma bolesti tijekom dugog perioda. Vrste *Bartonella* spp. za koje su ljudi prirodni domaćini i koje su opisane kao uzročnici perzistentnih bakterijemija su *B. bacilliformis* i *B. quintana*. Vrste *B. henselae*, *B. elizabethae*, *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* i *B. washoensis* spadaju u zoonoze. Prema razlikama u 16S rRNA genskim sekven-

cama razlikuju se 2 tipa (tip I i tip II) ili 4 varijante (varijante I-IV) izolata *B. henselae*. Iako se isti subtipovi *B. henselae* mogu naći u pacijenata s BMO i u njihovih mačaka, definitivna povezanost između serotipova i specifičnih manifestacija nije još potvrđena (25). Bakterije roda *Bartonella* su fakultativno intracelularni kratki, pleomorfni gram-negativni štapići ili kokobacili. *B. bacilliformis* i *B. clarridgeiae* imaju flagele, koje *B. bacilliformis* olakšavaju invaziju eritrocita. In vitro bartonele su osjetljive na beta-laktamske antibiotike (osim na oksacilin i cefalotin), aminoglikozide, makrolide (ali ne na klindamicin), tetracikline i rifampin. Postoji značajna varijabilnost u osjetljivosti izolata prema fluorokinolonima. Jedino aminoglikozidi (gentamicin, tobramicin, amikacin) pokazuju baktericidnu aktivnost (22).

Laboratorijska dijagnostika bartoneloza

Dijagnostika bartoneloza obuhvaća izravne i neizravne metode, tj. dokazivanje uzročnika iz kliničkih materijala i određivanje specifičnih protutijela (26). Izravne dijagnostičke metode obuhvaćaju detekciju bartonela u obojanim preparatima razmaza periferne krvi. U bakterijemijama uzrokovanim vrstama bartonela osim *B. bacilliformis* razina bakterija je premala da bi metoda imala zadovoljavajuću osjetljivost. Bartonele se mogu naći i u tkivnim preparatima obojanim srebrom po Warthin-Starryu ili se mogu dokazati imunohistokemijskim metodama. No, u tkivnim preparatima se vide samo u ranoj fazi limfadenopatije, dok kasnije prevladava granulomatozna upala (22, 26). *Bartonella* spp. su aerobne bakterije vrlo zahtjevne za kultivaciju. Detekcija bartonela u konvencionalnim automatiziranim sistemima za hemokulture nije pouzdana, jer organizmi produciraju samo male količine CO₂ koje nisu dovoljne za poticanje sistema za detekciju. Hemokulture koje su negativne nakon 3 tjedna kultivacije treba sistemski provjeravati bojanjem krvnih preparata akridin-orangeom ili Gimenez bojanjem. Bolji uspjeh izolacije iz krvi postiže se ako se krvne stanice liziraju. To se može postići posebnim sistemima hemokultura za izolaciju nakon lize eritrocita (*Isolator blood lysis tubes*) ili

zaleđivanjem uzoraka krvi s EDTA na -70°C kroz 24 sata prije inokulacije na ploče s krvnim agarom. Primarna izolacija bartonela iz krvi ili uzoraka tkiva izvodi se na različitim hranilištima. Rast bartonela ovisan je o heminu, pa agar mora biti obogaćen zečjom ili konjskom krvi. Svi sojevi *Bartonella* spp. rastu sporo. Primarni izolat *B. henselae* ili *B. quintana* na krvnom agaru obično se vidi nakon 12-14 dana, iako je ponekad vrijeme inkubacije i 45 dana. Inkubacija se zato mora produljiti na 4-6 tjedana i provoditi na 35°C u niskoj koncentraciji CO₂ (5-10%). Rast kolonija mora se provjeravati svaki tjedan. U subkulturama kolonije se obično pojavljuju nakon 3-5 dana, ali izmijenjene su morfologije. Značajke rasta mikroorganizama mogu pomoći u identifikaciji. Kolonije *B. henselae* su tipično hrapave i duboko uvučene u agar, dok su *B. quintana* glatke, ravne i ne ulaze u agar. Nakon opetovanih presađivanja *B. henselae* postaje glatka i lakše se rasprši u suspenziji (22).

Izvor bartonela, tj. inokuluma, može u osnovi utjecati na rezultat infekcije. Kad se kao inokulum upotrijebi kultura *B. henselae* dobivena iz laboratorija subkultivacijom, izostaju kliničke manifestacije, trajanje bakterijemije je skraćeno (<3 mjeseca), nakon serokonverzije slijedi brzi pad protutijela IgG i nisu dokazani relapsi bakterijemije. Kultivacija na umjetnim hranilištima rezultira slabljenjem sojeva *B. henselae*, vjerojatno zbog supresije gena koji utječe na virulenciju. S obzirom na posebne uvjete i duljinu inkubacije koje zahtijevaju, bartonele se ne mogu izolirati rutinskim bakteriološkim postupcima, već je potrebno obavijestiti mikrobiološki laboratorij da se radi o suspektnoj bartonelozi (22, 26). *B. bacilliformis*, uzročnik Oroya groznice na području Anda, treba slične uvjete uzgoja kao i ostale bartonele, ali raste na nižim temperaturama (28°C). Može se kultivirati iz krvi i limfnih čvorova. Hemokulture su često pozitivne u akutnoj bolesti. Porast kolonija može se očekivati u vremenu od 12-29 dana (prosječno 18 dana). *Bartonella* spp. mogu rasti in vitro u brojnim staničnim kulturama. Nakon inokulacije u staničnu kulturu "shell vials" inficirani monoslojevi mogu se detektirati pomoću akridin-orange i Gi-

menez bojanja. Identifikacija kultura na razini speciosa (vrste) može se izvoditi IFA metodom s poliklonskim antiserumom ili monoklonskim protutijelima.

Serološka dijagnostika bartoneloza

Specifična protutijela u bartonelozama u većine pojedinaca postaju detektabilna 1-2 tjedna nakon početka simptoma. Ponekad, u početku kliničkih simptoma, protutijela IgM mogu biti negativna. Neki pojedinci ostaju seronegativni tijekom cijele infekcije. Nakon početka infekcije razina IgM raste, dostiže vrhunac za 4 tjedna i zatim postepeno pada na nedetektabilnu razinu, obično 100 dana nakon početka simptoma. Specifična protutijela IgG mogu se detektirati kratko nakon pojave IgM i dostižu visoku razinu 7 do 8 tjedana nakon početka simptoma. Mogu perzistirati ili vremenom padaju. Čini se da postoje osobe koje imaju perzistentno pozitivna protutijela IgG na *B. henselae* i *B. quintana*. Obrnuto, postoje i osobe koje su inficirane i mogu ostati perzistentno u bakterijemiji s pozitivnim kulturama, a da nikad ne dosegnu detektabilnu razinu protutijela (26). Određivanje razine protutijela testom indirektno imunofluorescencije (IFA) najšire je korišteni test u dijagnostici infekcije s *B. henselae*. Vrijednost titra protutijela veća ili jednaka 64 smatra se pozitivnim nalazom. Pokazatelj je kontakta s bartonelama. Može upućivati na ranu fazu akutne infekcije, ali i na prošlu infekciju ili raniju ekspoziciju. Titar protutijela IgG u BMO obično je visok (jednak ili veći od 512). Titar protutijela između 64 i 256 ne nalazi se samo u BMO, već i u zdravih osoba i može označavati početak ili kraj BMO ili raniji kontakt s bakterijom. Za serološku potvrdu dijagnoze akutne infekcije *B. henselae* neophodno je dokazati jedan titar od 512 ili više, najmanje četverostruki porast tira protutijela ili serokonverziju (27-29).

Molekularna dijagnostika bartoneloza

Razvoj molekularnih metoda identifikacije i tipizacije značajno je unaprijedio dijagnostiku i epidemiološka istraživanja infektivnih bolesti. U upotrebi je nekoliko različitih metoda koje se koriste za identifikaciju i diferencijaciju

bartonela: *southern blot*, gel i kapilarna elektroforeza, PCR, DNA-hibridizacija, RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) i analiza genskih sekvenci (26, 30). Molekularne metode pružaju visoko osjetljive i specifične, brzo dostupne informacije i omogućavaju razlikovanje bartonela na najvišoj razini. U bacilarnoj angiomatozi i peliozi uzorak za PCR je biopat tkiva, a u endokarditisu se uzročnik može dokazati u promijenjenoj valvuli. Direktno detektiranje DNA bartonela u krvi pacijenata s diseminiranom bolesti također omogućuje postavljanje brze i konačne dijagnoze (30). Dijagnoza BMO postavlja se na temelju kliničke slike i serološkog nalaza. PCR tkiva u BMO treba se koristiti kao potvrdni test ili u slučajevima kad je dijagnoza jako suspektna, ali se ne može potvrditi drugim metodama. Zbog visoke cijene, niske osjetljivosti i upitnog kliničkog značenja, PCR analizu krvi ili seruma u BMO ne preporuča se raditi rutinski (28, 29). Iako se metode kultivacije stalno unapređuju i povećava im se osjetljivost, još uvijek je potrebno produljeno vrijeme za uzgoj bakterija. Pravilno rukovanje s uzorcima, odabir hranilišta za kultivaciju i uvjeti uzgoja mogu utjecati na rezultat. Uvjeti za oporavak mikroorganizama moraju se optimizirati. Ipak, treba pokušati uzgojiti čistu kulturu bakterija koja nije samo morfološka potvrda, već je neophodan materijal za daljnja istraživanja. Primjerice, rad s tekućim podlogama koje mogu osigurati bolje uvjete uzgoja i poboljšanje tehnika hemokultura bili su osnovni preduvjeti za otkrivanje endokarditisa uzrokovanih vrstama *Bartonella* (30). Serološka testiranja, tj. određivanje specifičnih protutijela u bartonelozama ključna su za postavljanje kliničke dijagnoze. U dijagnostici BMO u potpunosti su zamijenila kožni test koji je slabo standardiziran i ima potencijalni rizik za pacijenta. Za dokazivanje etioloških uzročnika kod suspektnih infektivnih endokarditisa bez dokazanih uzročnika iz hemokultura, preporuča se obavezno sistematsko definiranje specifične serologije za teško kultivabilne mikroorganizme (*Bartonella*, *C. burnetii*, *Chlamydia* spp.). Razina specifičnih protutijela u endokarditisa uzrokovanih bartonelama ekstremno je visoka. Samo ako su serološki testovi negativni treba se pokušati

daljnja dijagnostika novijim metodama kao što su PCR i kulture tkiva. Testovi IFA dobro su karakterizirani i validirani u kliničkim pokusima, no nisu jednostavni za izvođenje i zahtijevaju iskustvo da bi rezultati bili reproducibilni. Enzimski imunistestovi, koji su u osnovi jednostavniji za izvođenje, nisu u upotrebi jer još nije pronađen idealan antigen koji bi osigurao pravilnu interpretaciju i potvrdu dijagnoze (30). Bartonele su jedinstveni mikroorganizmi koji su naučili živjeti u cirkulirajućim stanicama domaćina asimptomatski ili uz minimalne simptome, uzrokujući kronične intraeritrocitne infekcije. Bakterijemije uzrokovane bartonelama pobijaju Kochov postulat da je krv ljudi i životinja sterilna, tj. "slobodna od bakterija" (24). Za postavljanje dijagnoze bartoneloza osnovna je serološka dijagnostika, tj. određivanje specifičnih protutijela. Ako se u prvom uzorku seruma determinira niska razina protutijela, za potvrdu akutne infekcije treba uzeti drugi, parni uzorak seruma nakon 2-3 tjedna, testirati ga istom metodom u istom laboratoriju i dokazati najmanje četverostruki porast titra protutijela.

LITERATURA

- Montoya J, Remington, JS. *Toxoplasma gondii*. In: Mandell G, Bennett, JE, Dolin, R., ed. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. USA: Churchill Livingstone, 2000; 2858-88.
- Wilson M, McAuley, JB. *Toxoplasma*. In: Murray P, Baron, EJ, Pfaller, MA, Tenoer, FC, Tenover, R.H., ed. Manual of clinical microbiology. Washington: ASM Press, 1999; 1374-81.
- Belanger F, Derouin F, Grangeot-Keros L, Meyer L. Incidence and risk factors of toxoplasmosis in a cohort of human immunodeficiency virus-infected patients: 1988-1995. HEMOCO and SEROCO Study Groups. Clin Infect Dis 1999; 28: 575-81.
- Durlach RA, Kaufer F, Carral L, Hirt J. Toxoplastic lymphadenitis-clinical and serologic profile. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 625-31.
- Jeren T, Vince, A, Črepinko, I, Kršnjavi, B. Toxoplasmosis - diferencijalno dijagnostički problem u nemalignim limfadenopatijama. Med Jad 1991; 21: 1-4.
- Roberts A, Hedman K, Luyasu V, et al. Multicenter evaluation of strategies for serodiagnosis of primary infection with *Toxoplasma gondii*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20: 467-74.
- Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. N Engl J Med 1994; 331: 695-9.
- Parmley SF, Goebel FD, Remington JS. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30: 3000-2.
- Li S, Maine G, Suzuki Y, et al. Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection with a recombinant antigen. J Clin Microbiol 2000; 38: 179-84.
- Gorgievski-Hrisoho M, Germann D, Matter L. Diagnostic implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*. J Clin Microbiol 1996; 34: 1506-11.
- Neto EC, Rubin R, Schulte J, Giugliani R. Newborn screening for congenital infectious diseases. Emerg Infect Dis 2004; 10: 1068-73.
- Jenum PA, Stray-Pedersen B. Development of specific immunoglobulins G, M, and A following primary *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. J Clin Microbiol 1998; 36: 2907-13.
- Jenum PA, Stray-Pedersen B, Gundersen AG. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. J Clin Microbiol 1997; 35: 1972-7.
- 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: 1928-33.
- Naessens A. Evaluation of seven commercially available inzyme immunoassays for immunoglobulin G and M antibody detection of *Toxoplasma gondii*. Immunology and Infectious Diseases 1993; 3: 258-62.
- Stepick-Biek P, Thulliez P, Araujo FG, Remington JS. IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. J Infect Dis 1990; 162: 270-3.
- Paul M, Petersen E, Szczapa J. Prevalence of congenital *Toxoplasma gondii* infection among newborns from the Poznan region of Poland: validation of a new combined enzyme immunoassay for *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin A and immunoglobulin M antibodies. J Clin Microbiol 2001; 39: 1912-6.
- Decoster A, Gontier P, Dehecq E, Demory JL, Duhamel M. Detection of anti-toxoplasma immunoglobulin A antibodies by Platelia-Toxo IgA directed against P30 and by IMx Toxo IgA for diagnosis of acquired and congenital toxoplasmosis. J Clin Microbiol 1995; 33: 2206-8.
- Foudrinier F, Villena I, Jaussaud R, et al. Clinical value of specific immunoglobulin E detection by enzyme-linked immunosorbent assay in cases of acquired and congenital toxoplasmosis. J Clin Microbiol 2003; 41: 1681-6.
- Derouin F, Leport C, Pueyo S, et al. Predictive value of *Toxoplasma gondii* antibody titres on the occurrence of toxoplasmic encephalitis in HIV-infected patients. ANRS 005/ACTG 154 Trial Group. Aids 1996; 10: 1521-7.
- Slater L, Welch, DF. Bartonella species, including cat-scratch disease. In: Mandell G, Bennett, JE, Dolin, R., ed. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. USA: Churchill Livingstone, 2000; 2444-56.
- Welch D, Slater LN. Bartonella and Afipia. In: Murray P, Baron, EJ, Pfaller, MA, Tenoer, FC, Tenover, R.H., ed. Manual of clinical microbiology. Washington: ASM Press, 1999; 638-46.
- Dehio C, Sander A. Emerging bartonellosis. Microbiology Today 2003; 30: 168-9.
- Jacomo V, Kelly PJ, Raoult D. Natural history of Bartonella infections (an exception to Koch's postulate). Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9: 8-18.
- Breitschwerdt EB, Kordick DL. Bartonella infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 428-38.
- Agan BK, Dolan MJ. Laboratory diagnosis of Bartonella infections. Clin Lab Med 2002; 22: 937-62.
- Sander A, Berner R, Ruess M. Serodiagnosis of cat scratch disease: response to Bartonella henselae in children and a review of diagnostic methods. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20: 392-401.
- Zbinden R, Michael N, Sekulovski M, von Graevenitz A, Nadal D. Evaluation of commercial slides for detection of immunoglobulin G against Bartonella henselae by indirect immunofluorescence. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997; 16: 648-52.
- Sander A, Posselt M, Oberle K, Bredt W. Seroprevalence of antibodies to Bartonella henselae in patients with cat scratch disease and in healthy controls: evaluation and comparison of two commercial serological tests. Clin Diagn Lab Immunol 1998; 5: 486-90.
- Houpikian P, Raoult D. Diagnostic methods. Current best practices and guidelines for identification of difficult-to-culture pathogens in infective endocarditis. Cardiol Clin 2003; 21: 207-17.

Summary

DIAGNOSIS OF TOXOPLASMOSIS AND BARTONELLOSIS

O. Đaković Rode

In clinical practice the diagnosis of bartonella and toxoplasma infection is primarily based on serological tests for the determination of specific antibodies. The problem with serological diagnosis is that antibodies can persist for a long time. In general, serological diagnosis of recent infection is based on the results of two samples tested in parallel (same method, same reagents), and determination of antibody dynamics. Additional serological methods (avidity, differential agglutination) could help in excluding a recent toxoplasma infection before the next sample is tested. There is no single test that can be solely used to support the diagnosis of acute or chronic toxoplasma infection. Laboratory diagnosis for toxoplasmosis and bartonellosis includes also histopathological investigation and microbiological cultivation of various clinical materials, and PCR amplification of DNA from human specimens. The most important is appropriate and reliable interpretation of laboratory testing results. The diagnosis should not rely on a single sample test. Different diagnostic methods should narrow the time of infection, and prove possible acute and/or conatal infection.

Descriptors: TOXOPLASMOSIS, BARTONELLOSIS, SEROLOGICAL DIAGNOSIS, LABORATORY DIAGNOSIS