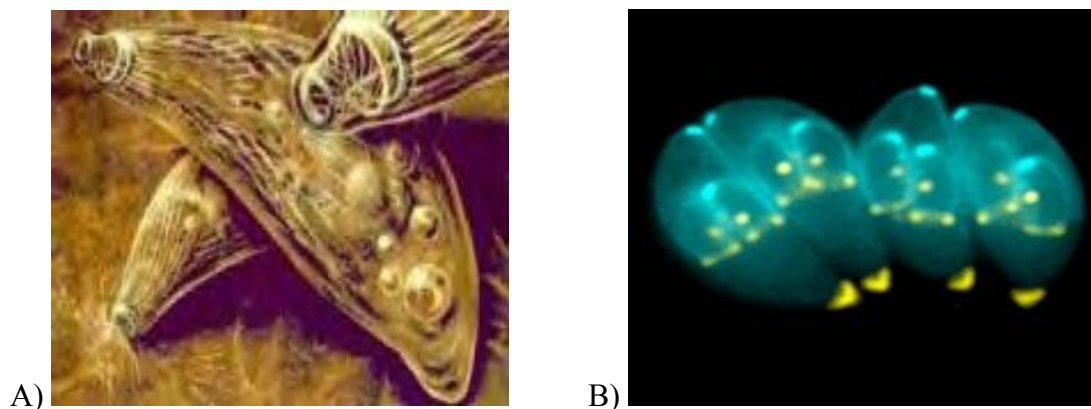


1. UVOD

1.1 *Toxoplasma gondii*

Toksoplazmoza je zelo razširjena zajedalska bolezen pri človeku in toplokrvni živalih (ptice in sesalci), ki se pojavlja tako pri nas v domačem okolju kot tudi po svetu. Povzroča jo enocelični parazit *Toxoplasma gondii* (slika 1). Glavni gostitelj *T. gondii* je mačka, ki ima pomembno vlogo pri širjenju okužbe.

Poznamo prirojeno toksoplazmozo, ki je izražena že ob rojstvu, in pridobljeno toksoplazmozo, ki se pojavi kadarkoli pozneje v življenju (1,2,3).



Slika 1: A in B polkrožni, znotrajcelični parazit *T. gondii* (mikroskopsko).

1.1.1 ZGODOVINA *T. gondii*

Nicolle in Manceaux sta leta 1908 v Tuniziji odkrila znotrajceličnega parazita v severnoafriškem glodalcu *Ctenodactylus gondii*, in ga poimenovala *Toxoplasma gondii*. Istega leta je Splendore odkril istega zajedalca tudi pri kuncu.

Prvi primer okužbe s *T. gondii* pri človeku sega v leto 1923, ko je Čeh Janku odkril parazita v mrežnici umrlega otroka. Šele leta 1939 so poročali o encefalitisu kot posledici prirojene toksoplazmoze. Istega leta so zanesljivo dokazali, da je povzročitelj, ki so ga poznali pri živalih, identičen kakor pri človeku (1,4).

V Sloveniji so prvi primer toksoplazmoze pri otroku ugotovili leta 1953 (5).

1.1.2 TAKSONOMSKE ZNAČILNOSTI

Toxoplasma gondii je obvezen znotrajcelični parazit, ki spada v red *Coccidia*, razred trosovcov ali *Sporozoa* in deblo *Apicomplexa*.

V razred *Sporozoa* spadajo poleg toksoplazme še *Sarcocystis* in *Pneumocystis*, ki parazitirajo v organih in tkivih, ter *Cryptosporidium* in *Isospora*, ki parazitirata v prebavilih.

Rodova *Plasmodium* in *Babesia* parazitirata v krvi.

Pri praživalih tega debela se v razvojnem krogu izmenjujeta nespolno razmnoževanje (shizogonija) in spolno razmnoževanje (gametogonija) (1).

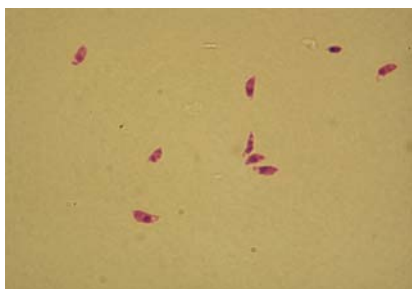
1.1.3 MORFOLOGIJA IN BIOLOGIJA

Toxoplasma gondii se pojavlja v treh morfološko značilnih oblikah, in sicer v vegetativni obliki ali trofozoitu, tkivni cisti in oocisti.

Vegetativna oblika ali trofozoit (slika 2), imenovan tahizoit (*tahos* = hiter) je najmanjša oblika in hitro deleči se polmesečni parazit, ki je dolg okoli 6 μm in širok 2 μm . V sprednjem apikalnem delu oziroma polu ima splet fibril za katere menijo, da imajo pomembno vlogo pri gibanju parazita in pri njegovem vstopu v različne gostiteljske celice. Razmnoževanje poteka nespolno z endodigenijo (preprosta delitev) pri vmesnem gostitelju (človeku, raznih drugih sesalcih in ptičih).

Najpogosteje se razmnožuje v bezgavkah, možganih, očeh, skeletnem mišičju, srcu in pljučih. Pri propadu gostiteljske celice, ki je povzročen z nepretrganim deljenjem trofozoita, se sprostijo številni novi trofozoiti, ki napadejo nove gostiteljske celice.

Trofozoit propade izven organizma pri 5 °C v 14 dneh, pri 37 °C v nekaj dneh, pri 50 °C v 15 minutah. Želodna kislina jih uniči (1,3,6).



Slika 2: Trofozoit v peritonealnem izpirku miši, Giemsa (6x2 μm).

Tkivna cista

Cista se pojavlja pri subakutnem ali kroničnem poteku, pojavi se tudi pri naravno odpornih vrstah živali, ker je posledica vstopa in razmnoževanja zajedalca v celici. Dejavniki, ki povzročajo tvorbo cist, niso znani. Pri njihovem nastanku pa ima verjetno pomembno vlogo imunski odziv gostitelja. Ciste so velike do 100 μm , navadno okoli 50 μm (slika 3), zato se lahko nahajajo kjer koli v telesu, najpogosteje v možganih, srcu in skeletnem mišičju. Ob zorenju endozoitov (v cistah se imenujejo bradizoiti) nastanejo ciste, le-te pa vsebujejo več

sto bradizoitov, ki so tanjši in manjši od tahizoitov in se v cisti tudi počasneje delijo. V takšnem stanju paraziti ne povzročajo škode, razen v primerih, ko cista počí. V tem primeru toksoplazme povzročajo ponoven izbruh bolezni. Ciste uniči zmrzovanje pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ali segrevanje na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ali več (1,3,6).



Slika 3: Tkivna cista *T. gondii*, v kateri so vidni bradizoiti.

Oocista

Oocista je najbolj odporna oblika zajedalca. Je skoraj okrogla, meri v premeru $30\text{ }\mu\text{m}$ in se razvije v črevesju domače ali divje mačke po spolnem razmnoževanju – gametogoniji (slika 4). V zunanjem okolju na primerni temperaturi in vlagi dozori oziroma sporulira povprečno v 3 - 5 dneh. Ne sporulira pod $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in nad $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Oocista vsebuje dve sporocisti, od katerih ima vsaka 4 sporozoite. Mačka, ki ni videti bolna, izloča veliko število oocist – tudi 10 milijonov dnevno – 1 do 3 tedne. Oociste preživijo v vodi in zemlji več mesecev in so zelo pomembne pri fekalno oralnem prenosu (1,3,6).



Slika 4: Oocista *T. gondii*.

1.1.4 PATOGENEZA

Po zaužitju ali prenosu tkivne ciste ali oociste v telo se v prebavilih človeka s pomočjo želodčne kisline in prebavnih encimov razgradi stena ciste. Iz nje se sprostijo brazidoiti, iz oociste pa sporozoiti, ki vdrejo v črevesne epitelijske celice, v katerih se razmnožujejo. Zajedene celice počijo, zajedalci pa se s krvjo in limfo razširijo po različnih organih in tkivih. V štirih urah do treh dneh po okužbi se zajedalec pojavi v krvi, kjer ostane tri tedne.

Oblikovanje tkivnih cist se začne teden dni po okužbi. Ciste so lahko prisotne v vseh organih, v možganih, kostnem mozgu, bezgavkah, jetrih, vranici, pljučih, srcu, skeletnih in gladkih mišicah in tovrstne ciste ne povzročajo vnetnega odgovora.

Vzrok ponovnega vdora zajedalca v kri je ostajanje le-tega v monocitu in makrofagu ter predrtje ciste.

Potek okužbe je odvisen od virulence seva in od humoralne ter celične odpornosti gostitelja (3,6).

1.1.5 KLINIČNA SLIKA

Okužba s parazitom *T. gondii* je lahko akutna ali kronična, s simptomi ali brez njih. Navadno so prizadete bezgavke (spremembe podobne limfadenitisu), možgani (kaže se kot žariščni ali difuzni meningoencefalitis) in oči (vnetje ali nekroza mrežnice, granulomatozne vnetne spremembe žilnice ...).

Klinične značilnosti toksoplazmoze razvrščamo v 4 skupine, in sicer:

- prirojeno,
- pridobljeno pri bolniku z normalnim imunskim odzivom,
- pridobljeno ali reaktivirano pri bolniku s sindromom imunske pomanjkljivosti in
- očesno toksoplazmozo (6).

Najpogosteje se človek okuži s toksoplazmozo po rojstvu (pridobljena toksoplazmoza). Pri večini okuženih ljudi ta oblika ne povzroča očitne akutne bolezni, ampak le blago bolezen, saj imunski sistem okužbo obvlada. Največkrat poteka pridobljena oblika bolezni brez bolezenskih znakov v latentni obliki. Le pri majhnem odstotku ljudi povzroča infekcijski mononukleozi podobno bolezen s povišano telesno temperaturo, hudo utrujenostjo, bolečinami v mišicah, povečanimi bezgavkami in glavobolom. Bolezenski znaki so lahko prisotni nekaj tednov in postopoma izzvenijo, zato zdravljenje z zdravili ni potrebno (7,8).

Pri ljudeh, ki imajo oslabiljen imunski sistem zaradi bolezni, kot so Hodgkinova bolezen, levkemija, limfosarkom ali aids, se lahko pojavi težja oblika toksoplazmoze največkrat zaradi reaktivacije latentne kronične okužbe. Pri približno 50 % vseh obolelih je prizadeto osrednje živčevje, pojavijo se lahko tudi poškodbe na očeh (npr. horioretinitis), pljučih ali srcu. V nekaterih primerih se lahko bolezen konča tudi s smrtjo.

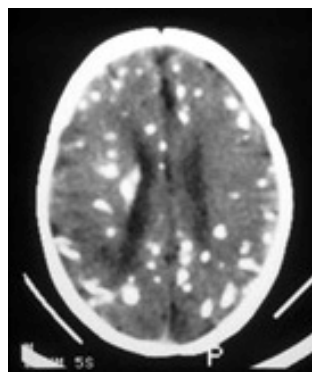
Manj pogosto, pa vendar hujšo obliko bolezni povzroča okužba ženske v času nosečnosti. Do nje pride, če se ženska prvič okuži med nosečnostjo (primarna okužba), izjemoma pa tudi pri otroku matere s kronično oziroma latentno toksoplazmozo. Tedaj toksoplazme potujejo po njenem krvnem obtoku do posteljice, preidejo skozi njo do ploda in ga okužijo. V tem primeru govorimo o prirojeni ali kongenitalni toksoplazmozi (4,7).

Teža kongenitalne toksoplazmoze je odvisna od tega kdaj v nosečnosti je prišlo do okužbe matere. Tako je v prvem trimesečju verjetnost prenosa približno 17 %, v drugem 24 %, v tretjem trimesečju pa kar 64 %, čemur sledi verjetnost za razvoj poškodb oči. Resnost okužbe je obratna; kar se tiče možganov je največja v kolikor do prenosa pride v prvem trimesečju nosečnosti (9).

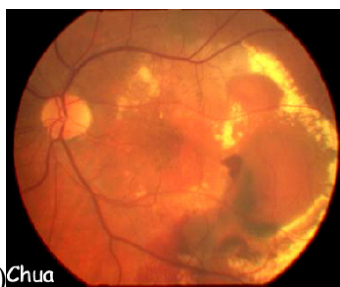
Okužba nosečnice je lahko popolnoma brez znakov bolezni, medtem ko okužba za plod predstavlja nevarnost, ki se kaže v obliki splava, prezgodnjega poroda in mrtvorojenosti. To je pogostejše, če pride do okužbe v prvem trimesečju nosečnosti. Lahko pa se rodi otrok z različnimi klinični znaki in simptomi okužbe: povišana telesna temperatura, vodenoglavost (hidrocefalus) (slika 5), mikrocefalija, povečana jetra in vranica, zlatenica, krči, okvara oči (horioretinitis) (slika 7), kalcifikacije v možganih (slika 6), slepota, izpuščaji, motnje sluha, vnetje srčne mišice in pljuč. V 12 % pride celo do smrti. Med trajne posledice spadajo duševna prizadetost, krči, spastičnost, okvara vida, mikrocefalija ter nižji IQ (6,9).



Slika 5: Vodenoglavost (hidrocefalus).

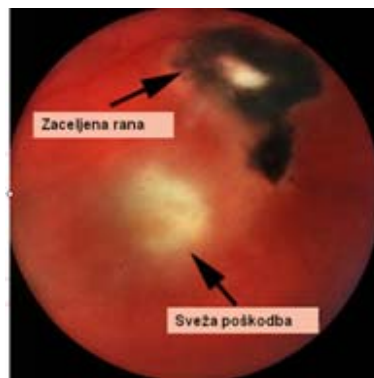


Slika 6: Kalcifikacija v možganih.



A) Chua

Slika 7: A) Okvara oči (horioretinitis).



B)

B) Poškodba oči.

V večini primerov, in sicer kar v 80 % otrok po porodu ne kaže znakov okužbe, le-ti pa se lahko pojavijo v nekaj mesecih ali letih po rojstvu (1 do 9 let) (6).

1.1.6 EPIDEMIOLOGIJA

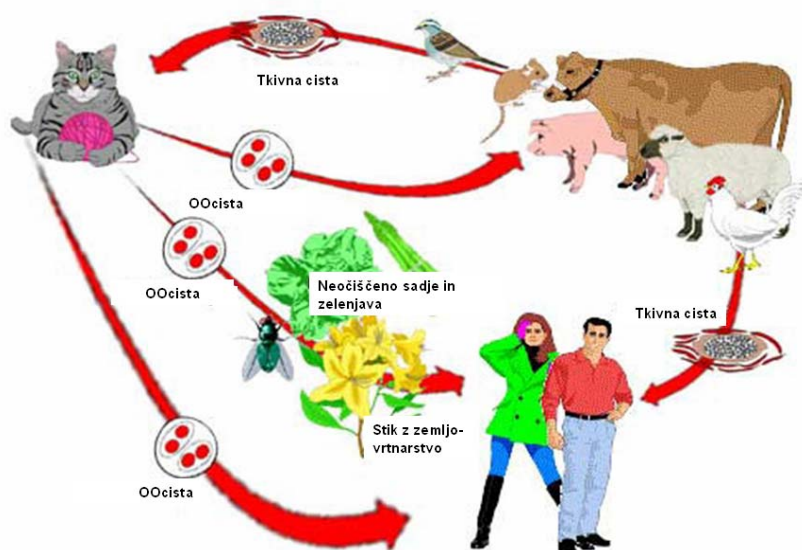
Za toksoplazmozo obolevajo tako rastlinojede in mesojede živali kot tudi človek. V srednji Evropi so s seroepidemiološkimi raziskavami našli protitelesa pri 50 do 60 % ljudi starih 30 do 40 let. V podobnih odstotkih so v srednji Evropi prekužene ženske v rodni dobi. Ugotovljeno je, da je večja prekuženost v Franciji in manjša v severnih državah Evrope, na primer na Norveškem, v Finski, Švedski in Angliji. S preiskavami žensk v rodni dobi so odkrili, da je prekuženost sredine osemdesetih padla z 52 % na 37 % v devedesetih letih. Nekateri menijo, da je do zmanjšanja prekuženosti prišlo zaradi večje osveščenosti žensk glede te bolezni in morda zaradi izboljšanja higienskih in življenjskih razmer. Zaradi vse

manjše prekuženosti pa vse bolj narašča nevarnost primarnih okužb v času nosečnosti (4,10,11).

Raziskave opravljene med letom 1999 in 2004 kažejo, da je okužba s toksoplazmozo odvisna tudi od letnega časa. Delež na novo okuženih nosečnic v zimskem obdobju znaša 0,48 %, medtem ko je delež le-teh v poletnem času 0,27 %. Vzrok je verjetno ta, da se mačke pozimi bolj zadržujejo znotraj bivališča (12).

Do okužbe najpogosteje prihaja z uživanjem hrane (zelenjave, mleka, jajc) in vode onesnažene z mačjimi iztrebki, ki vsebujejo oociste, z uživanjem mesa okužene živali, ki vsebuje tkivne ciste in ni dovolj kuhano, pečeno ali soljeno. Ciste so navadno v prašičjem, ovčjem in kozjem, redko pa v govejem mesu in perutnini (slika 8). Prenasjanje parazitov skozi poškodbo na koži je manj pomembno, razen pri laboratorijskem delu in avtopsijah. Do prenosa parazitov lahko pride tudi pri transplantaciji okuženih organov ali pri transfuziji krvi, plazme in levkocitov (v krvi s citratom preživi zajedalec pri 4 °C 50 dni). Nosečnica pa okuži plod zaradi prehoda parazita skozi posteljico (4,10,11).

Prenos okužbe s človeka na človeka ni dokazan (6).



Slika 8: Razvojni krog parazita *T. gondii*.

Na okuženost ljudi vplivajo predvsem prehranjevalne navade, higiena in klimatske razmere. V nekaterih deželah so za okužbo pomembnejše ciste v mesu (Francija, Avstrija, Nemčija), drugod pa oociste v mačjih iztrebkih (Kostarika).

Okužba je pogostejša v toplih krajih v nižinah, manj pogosta pa v mrzlih gorskih predelih. Pogostejša je tudi v vlažnih, manj pogosta pa v suhih področjih (7).

1.1.7 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE

Zdravljenje toksoplazmoze lahko traja več tednov (v nekaterih primer tudi šest mesecev). V ta namen se uporabljajo učinkovita zdravila, ki jih je treba jemati po določeni shemi. Odmerek zdravila za zdravljenje toksoplazmoze je odvisen od klinične slike, starosti in stanja imunskega sistema pacienta. Toksoplazmozo najuspešneje zdravimo s pirimetaminom (Daraprim), skupaj s sulfonamidi (na primer sulfadiazinom). Pirimetamin lahko škodljivo deluje na kostni mozeg, zato je potrebno med zdravljenjem kontrolirati krvno sliko pacienta in mu dajati preparate s folno kislino. S tem preprečimo negativno delovanje pirimetamina. Za zdravljenje priporočajo tudi antibiotika spiramicin ali rovamycin in klindamicin. Včasih predpisujejo tudi kortikosteroide zaradi njihovega protivnetnega delovanja (veliko stranskih učinkov) (4,6,9,13).

Poseben problem pri zdravljenju pa predstavljajo nosečnice, ki so okužene v prvem trimesečju nosečnosti (zmanjšan izbor zdravil, teratogeni učinki zdravila ...). Najpogosteje se nosečnice zdravi s klindamicinom in spiramicinom (9).

Omenjena zdravila delujejo samo na proste oblike parazitov, ne pa tudi na tkivne ciste.

Pri zdravljenju toksoplazmoze je potrebno upoštevati klinično sliko bolnika. Količina protiteles se pogosto ne zmanjša takoj, ampak lahko ostane dalj časa nespremenjena, zato to ne upoštevamo kot uspeha zdravljenja (7).

Pri osebah brez specifičnih protiteles in nosečnicah je potrebno okužbo s parazitom preprečevati, in sicer:

- s primerno toplotno obdelavo mesa (gretje na 60 °C ali zmrzovanje na -20 °C),
- z umivanjem sadja in zelenjave,
- ne dotikamo se sluznic ustne votline in očesnih sluznic z rokami, če prijemamo surovo meso in neoprano sadje,
- pri zelenjavi in sadju pazimo, da je zaščiteno pred muhami in mrčesom,
- nosimo rokavice, ko delamo z zemljo ali smo v stiku z mačjimi iztrebki in
- potrebno je redno razkuževanje mačjih zabojev (14).

1.1.8 DIAGNOZA

Okužbo s *T. gondii* je moč dokazati na več načinov. Neposredno oziroma direktno lahko parazita ugotovimo z mikroskopskim pregledom krvnega razmaza (znotrajcelični parazit), dandanes pa se rutinsko uporabljajo predvsem serološki testi, in sicer:

- Sabin-Feldmanov test ali »dye test« oziroma barvni test (SFT ali DT),
- Imuno-fluorescenčni testi,
- neposredni in posredni hemaglutinacijski test (IHA; IgM ISAGA) in
- encimsko-immunski testi (ELISA), ki temeljijo na dokazovanju prisotnosti specifičnih protiteles razreda IgM, IgG in IgA

Za potrditev okužbe sta potrebni dve serološki testiranji v obdobju dveh do treh tednov. Če pri drugem testiranju ugotovimo serokonverzijo (sprememba iz neg. v poz. izvid) ali pa povečane količine protiteles IgG, IgM in/ali IgA, lahko sklepamo, da gre za akutno (novonastalo) toksoplazmozo, ki pa jo je potrebno predvsem pri nosečnicah čimprej zdraviti.

Toksoplazmoza pri nosečnicah pogosto poteka asimptomatsko, to pomeni klinično neopazno. Prav zaradi tega je tudi večina kliničnih znakov pri novorojenčkih neopaznih. Ključnega pomena je, da se prirojena toksoplazmoza odkrije čimprej v času nosečnosti. Le tako je lahko prenatalno zdravljenje, kar najbolj uspešno (4,6,15).

V nekaterih evropskih državah (tudi v Sloveniji) je zakonsko predpisano (Navodilo za izvajanje preventivnega zdravstvenega varstva na primarni ravni – U.I.RS 19/98) trikratno testiranje nosečnic na toksoplazmo, ki poteka po shemi:

- prvo testiranje (10 – 20 teden nosečnosti),
- drugo testiranje (obdobje med prvim in tretjim testiranjem),
- tretje testiranje (4 – 6 teden pred rojstvom otroka) (16).

V ta namen se uporablja encimsko imunski test ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) za določanje specifičnih protiteles IgG in IgM.

Imunsko kompetentne ženske, ki imajo prisotna protitelesa IgG že pred nosečnostjo, obravnavamo kot »imune«, zato je tveganje (nevarnost) za prenos okužbe na plod zelo nizko in testiranje med nosečnostjo ni potrebno. Ženske, ki nimajo specifičnih protiteles, pa predstavljajo tveganje za kongenitalno okužbo, zato jih testiramo po že omenjeni shemi.

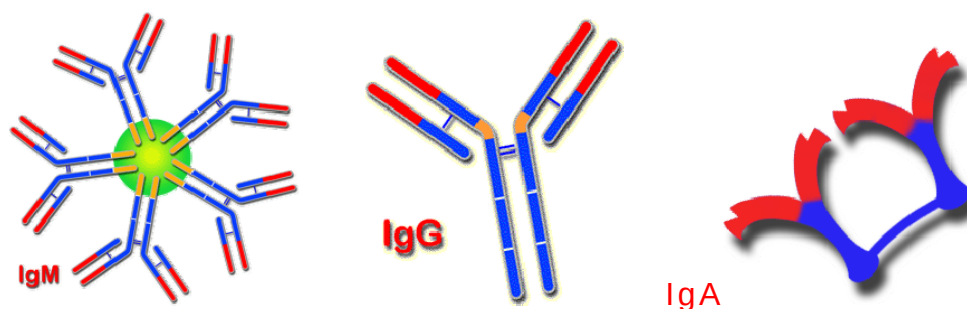
Serume nosečnic, pri katerih je bila z imuno-fluorescenčnim testom odkrita serokonverzija, visoka količina protiteles, je potrebno dodatno testirati z ELISA IgG, ELISA IgM, ELISA IgA in ELISA testom avidnosti (»zrelosti«) protiteles IgG (1,7).

Po okužbi je moč najprej zaznati protitelesa IgM (~ pet dni po okužbi), ki so označevalec za svežo/akutno okužbo in dosežejo najvišje vrednosti v enem mesecu od okužbe. Za protitelesi IgM se pojavljajo toksoplazemska protitelesa razreda IgG, ki dosežejo maksimalne koncentracije osem tednov po okužbi. V serumu jih lahko zaznamo več let ali celo življenje (latentna okužba) ali pa le nekaj dni (akutna okužba). Protitelesa IgA se pojavijo navadno dva do tri tedne za protitelesi IgM in izginejo do devet mesecev pred njimi (pri novorojenčkih so prisotna dlje kot protitelesa IgM). Če protiteles IgA z encimsko-imunskim testom (ELISA IgA) nismo zaznali, to ne izključuje sveže akutne okužbe. To je znak, da se protitelesa IgA še niso razvila v času, ko je bil odvzet serum pri osebi ali pa so že povsem upadla oziroma izginila po nedavni okužbi (5% vseh primerov) (1,7).

Protitelesa IgM in IgA zaradi svoje velikosti ne prehajajo skozi placento (slika 9), zato je njihova prisotnost v novorojenčkovi krvi pokazatelj prirojene okužbe (4,7,17).

Fetalna kri naj bi bila testirana z IgG, IgM ali IgA ELISA testom. Mogoča je tudi inokulacija krvi v poskusno žival (miš) ali pa tkivno celično kulturo za dokaz parazitarije in pa testiranje nespecifičnih označevalcev okužbe, kar zajema levkocite, eozinofilce, eritrocite, celokupne IgM, znižano encimsko aktivnost, predvsem gama-glutamyltransferaze (γ -GT) in laktatne dehidrogenaze (LDH).

V splošnem velja, da je dokaz specifičnih toksoplazemskih protiteles IgM v fetalnem serumu in izolacija parazita *T.gondii* iz levkocitov zanesljiv pokazatelj fetalne infekcije (1,7).



Slika 9 : Shematski prikaz protiteles razreda IgM, IgG in IgA.

Za testiranje na toksoplazmozo se uporablja tudi verižna reakcija s polimerazo – PCR metoda, za katero je značilno:

- 100% specifičnost in občutljivost za okužbo ploda,
- uporaba amnijske tekočine kot vzorca,
- testiranje na toksoplazma B1 gen toksoplazme (4).

1.2 VIRUS HEPATITISA B (HBV)

Virus hepatitisa B (HBV) povzroča vnetno bolezen jeter hepatitis B (slika 10). Prenaša se s krvjo in telesnimi izločki obolelih. Razen v krvi se virus nahaja tudi v slini, semenski tekočini, vaginalnih izločkih, urinu, znoju in mleku doječe matere. Inkubacijska doba znaša 45-120 dni. Okužba s HBV se prenaša s spolnim stikom, z okuženimi iglami za intravensko uživanje nedovoljenih drog in drugimi predmeti za prebadanje kože (tetoviranje, piearcing ...), pa tudi skozi sluznice in očesno veznico. Možen je tudi prenos okužbe z matere, ki je prenašalka (vironosec), na otroka (neonatalna okužba). Tovrstnih okužb je 5-10% .

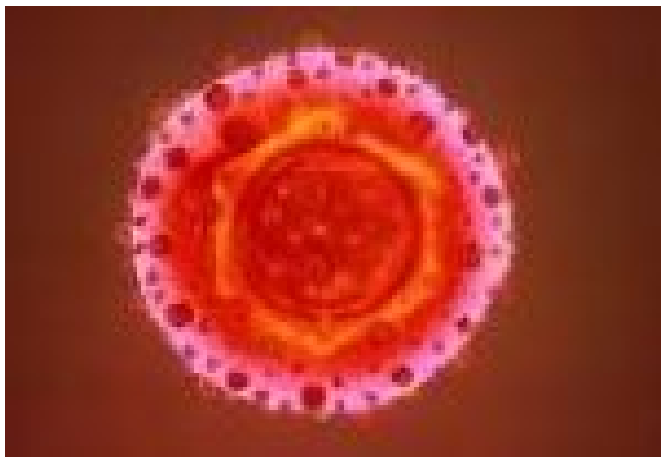
Neonatalna okužba je lahko:

- prenatalna (transplacentarno),
- vertikalna (pri prehodu skozi porodni kanal),
- obporodna (perinatalna),
- postnatalna ("horizontalna").

Novorojenčke vseh nosečnic, za katere se ugotovi, da so kužne, takoj po porodu cepijo.

Virusno breme (viral load) HBV je zelo visoko, zato je za okužbo potrebna le minimalna količina seruma. Virus povzroči vnetje jeter (inflamacija in razpadanje jetrnega tkiva). Jetrne celice (hepatociti) se lahko obnovijo ali pa popolnoma propadejo, ko gre za hujše in dolgotrajno vnetje. V tem primeru jih nadomesti vezivno tkivo. Tovrstno stanje lahko vodi do kroničnega vnetja, ki se konča z jetrno cirozo ali rakom jeter, katerega posledica je smrt (6,18,19).

Zoper virus HBV obstaja cepivo. Cepljenje se izvaja po shemi 0, 1, 6 mesecev in ob uspešnem cepljenju predstavlja doživljenjsko zaščito (20).



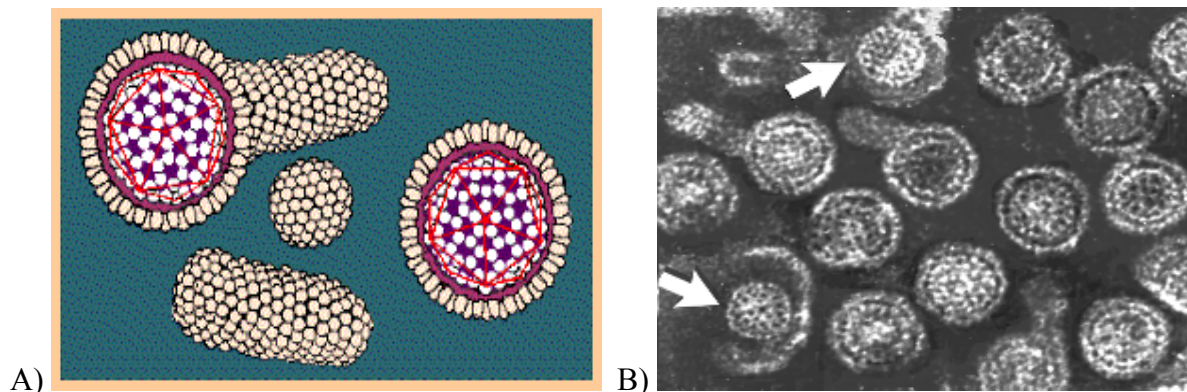
Slika 10: Virus hepatitisa B (HBV).

1.2.1 ZGODOVINA

- Leta 1963 pri iskanju novih (neobičajnih) antigenov, ki bi jih lahko uporabili za krvno/tkivno tipizacijo, odkrijejo protitelesa, ki prepoznajo antigen v serumu avstralskega aborigina (avstralski antigen → **Au**).
- Leta 1967 spoznajo, da je Au virusni antigen v bistvu površinski antigen **HBsAg**.
- Dane 1970 odkrije 42 nm delce (tako imenovane Danejeve delce) v krvi bolnikov s hepatitisom → **HBeAg** (jedrni antigen).
- Leta 1973 odkrijejo **HBeAg**, ki je endogeni antigen, del antigenske sredice HBcAg in pomemben označevalec kužnosti (19,21).

1.2.2 TAKSONOMSKE IN MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI

HBV sodi v družino *Hepadnaviridae* (hepadnavirusi) in rod *Orthohepadnavirus*. Velikost tovrstnih virusov znaša 40-48 nm. To so okrogli in pogosto pleomorfni virusi z ikozaedralno nukleokapsido (27 nm) in lipidno ovojnico (debelina 4 nm in občutljiva na detergente). Protein virionske ovojnice je tako imenovani površinski antigen oziroma HBsAg. Včasih se le-ta podaljša v tubularni rep na eni strani virusnega delca (slika 11A). Površinski antigen običajno nastaja v velikih presežkih in ga je zato moč najti v krvi okuženega posameznika v obliki okroglih (sferičnih) in filamentnih delcev. Njihov premer je okoli 22 nm. Včasih tvorijo pravilno oblikovane, prečne, diagonalne tvorbe. Genom, ki je eden najmanjših med vsemi virusi, predstavlja krožna molekula DNA, ki je deloma enovijačna in deloma dvovijačna, ovita v nukleokapsido ali HBc antigen in zajema še od RNA odvisno DNA polimerazo (reverzna transkriptaza) (6,9,19).

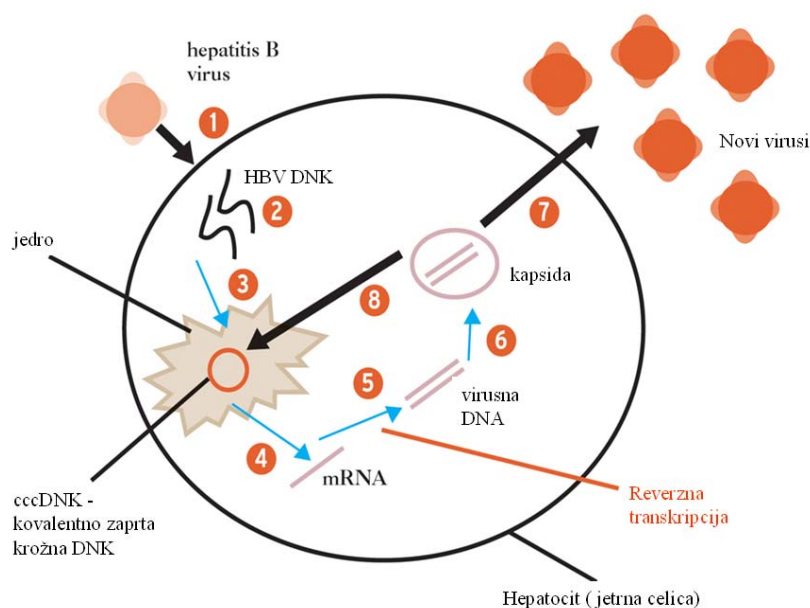


Slika 11: (A) Shematski prikaz virusnega delca (viriona) hepatitisa B in njegovih površinskih antigenih komponent. (B) Mikroskopski prikaz skupine virusnih delcev (virionov) HBV z razkritimi jedri (EM).

1.2.3 PATOGENEZA IN PATOMORFOLOŠKE SPREMEMBE

Virus vstopi v organizem skozi epitelij sluznic, prehaja v lokalne bezgavke in nato s krvjo v jetra. Prizadene lahko tudi trebušno slinovko, limfocite in ostale organe. HBV se v organizmu oz. celici razmnožuje v podobnih korakih kot ostali virusi (slika 12):

- pritrjevanje na celice,
- vstopanje v celice,
- sproščanje virusne nukleinske kisline,
- sinteza virusnih beljakovin in pomnoževanje virusne nukleinske kisline,
- sestavljanje novih virusnih delcev (virionov) in
- izstopanje iz celic.



Slika 12: Shematski prikaz replikacije HBV.

Hepadnavirusi imajo v svojem genomu molekulo DNA in prav zaradi tega je pomnoževanje genoma in sinteza beljakovin podobna kot pri gostiteljskih celicah. Pri HBV virusna polimeraza DNA najprej sintetizira manjkajoče fragmente genoma. Tako izpopolnjeni oziroma celovit genom nato v jedru celična od DNA odvisna polimeraza RNA prepíše v dve vrsti mRNA. Prva vrsta mRNA se prevede v virusne beljakovine, drugo vrsto mRNA pa prepíše v genomsko DNA virusna od RNA odvisna polimeraza DNA (RT) (6,19).

Ker HBV ni citopatogen za hepatocite, celični imunski odgovor organizma na okuženi hepatocit določa, kakšno bo patološko dogajanje. Tako lahko imunski odgovor, celični kot tudi humoralni, ne le odstrani virus iz telesa, temveč tudi pripomore k okvari organizma.

Kronični potek bolezni je posledica kontinuirane replikacije virusa v hepatocitih. Pri osebah, ki so se okužile intrauterino (preko placente ali prehodu preko porodnega kanala), lahko traja tako stanje dosmrtno. Pri večini bolnikov, ki se odzovejo z normalnim imunskim odzivom, pa pride do uničevanja okuženih hepatocitov in nastopi serokonverzija (HBeAg izgine, pojavijo pa se protitelesa proti HBeAg). Virusni genom se lahko integrira (vključi) v kromosomsko DNA hepatocita. V tem primeru pride do prekinitve replikacije virusa, hkrati pa se pojavijo protitelesa proti HBsAg, vendar pa je mnogo pogostejše možen scenarij, ko HBsAg ostaja in kar kaže na kronično okužbo jetrnih celic (6,19).

V času inkubacije se v serumu pojavi površinski antigen HBsAg, ki pa ga v času okrevanja ni moč zaslediti. Pomemben je tudi porast virusne DNA polimeraze v akutnem obdobju (pri

kronični obliki še mesece in leta), ki je v sorazmerju z okvaro hepatocitov. To se kaže tudi z višjimi vrednostmi transferaz v serumu. V obdobju dveh do desetih tednov po pojavu površinskega antigena HBsAg v serumu zasledimo protitelesa IgM proti HBcAg, ki so prisotna v serumu, dokler se virus replicira. Pri okužbi s HBV je v serumu moč zaslediti tudi protitelesa IgG proti HBcAg in ostanejo v organizmu več let po bolezni. Nazadnje se pojavijo še protitelesa proti HbsAg (6,19).

V času inkubacije in v akutnem obdobju lahko najdemo v serumu imunske komplekse, ki vsebujejo celoten virus ali HBsAg, protitelo proti HBs in komplement.

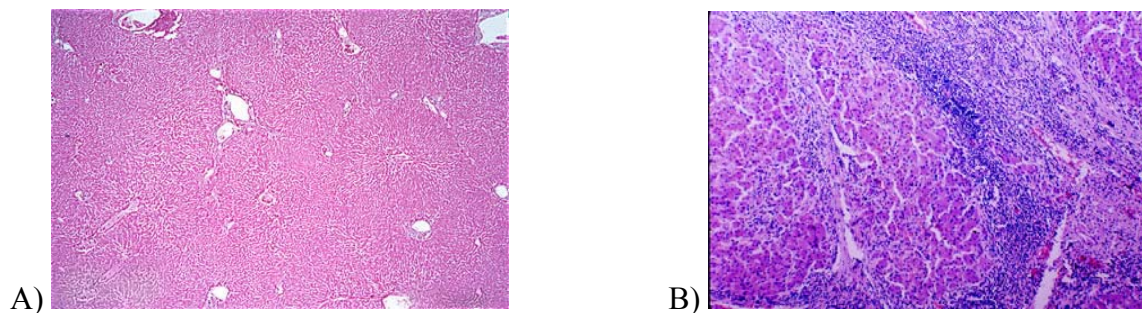
1.2.3.1 Patomorfološke spremembe:

Ločimo patomorfološke spremembe v akutnem obdobju in tiste pri kronični virusni okužbi. Pri akutnem hepatitisu HBV so spremembe v jetrih podobne kot v akutnem obdobju HAV hepatitisa, to je okvara (nekroza) jetrnih celic, predvsem v sredini režnjev. Z mikroskopskega aspekta je pomembna prisotnost eozinofilnih teles v citoplazmi hepatocitov in večje število Kupfferjevih celic, ki sovpada z različno stopnjo zastoja žolča. V portalnih predelih in v jetrnem parenhimu so infiltrati z mononuklearnimi celicami, ki jih včasih spremljajo tudi nevtrofilci in eozinofilci. Struktura jeter je pri akutni okužbi ohranjena in po nekaj mesecih je histološka slika jeter pri večini bolnikov normalna (slika 13A) (6,9).

Tudi pri kronični okužbi je moč zaznati normalno histološko sliko jeter (predvsem pri zdravih prenašalcih HBsAg). Za kronični persistentni hepatitis (do 70% bolnikov) so značilni limfo-monocitni infiltrati v periportalnih poljih. Nekroze hepatocitov so redke, struktura jetrnih režnjev je ohranjena in histološka slika se po nekaj letih normalizira. Pri kroničnem aktivnem hepatitisu (do 30 % bolnikov) pa lahko opazimo nekroze (obsežne) in vezivno tkivo. Za razliko od kronično presistentnega hepatitisa, so tu infiltrati z limfo-monociti prisotni tudi v režnjih. V nekrotično tkivo (slika 13B) prične vraščati vezivo, ki posledično spremeni ustroj oziroma arhitektura jeter, kar vodi do jetrne ciroze in kasneje tudi do primarnega raka jeter.

Pri fulminantni (hitri, bliskoviti) obliki hepatitisa pride do nekroze večine jetrnih celic, zaradi česar se jetra močno in hitro zmanjšajo. Spremenijo tudi barvo (rumena). Jetrne celice so v tem primeru tako zelo prizadete, da ne kažejo več znakov regeneracije. Z mikroskopskega aspekta je v režnjih in zunaj njih moč opaziti gosto infiltracijo z mononuklearnimi celicami.

Pri subakutni obliki okužbe se jetra polagoma zmanjšujejo (3-8 tednov), histološke spremembe kažejo na propadanje celic, obenem pa se kažejo tudi znaki regeneracije (6,9).



Slika 13: (A) Normalno jetrno tkivo. (B) Jetrno tkivo pri hepatitisu B (opazne so nekroze, ki prizadenejo tako režnje kot tudi intersticij).

1.2.4 KLINIČNA SLIKA

Najpogostejše poteka okužba s HBV v subklinični obliki, kar pomeni brez zlatenice in povečanih jeter. Zaznati je moč le povečane vrednosti transferaz v serumu. Okužba pogosto poteka brez kliničnih znakov, zato jo lahko dokažemo le s specifičnimi serološkimi označevalci. Pri 25-30 % okuženih pa poteka hepatitis B z značilno klinično sliko (koprivnica, bolečine in otekline sklepov), ki nastopi od 1 do 4 tedne pred pojavom zlatenice. Sam klinični potek pa je lahko povsem podoben tistemu, ki ga povzroča virus hepatitisa A. Utrujenost, slabost, slabši apetit, povišana telesna temperatura, glavobol, bolečine v trebuhu in bruhanje, temen seč, svetlo blato, diareja ali zaprtje so znaki, ki se pojavijo teden ali dva pred jasnimi kliničnimi znaki.

Naslednja stopnja je zlatenica. Pogoste so bolečine pod desnim rebrnim lokom, kjer se tipajo tudi povečana jetra. Pri 10-15% bolnikov je tipna tudi povečana vranica in vratne bezgavke. Zlatenica se stopnjuje približno teden dni, nato pa postopoma izginja. Bolezen traja 3 tedne pri otrocih in 4-6 tednov pri odraslih. Vsekakor pa bolezen traja dlje kot pri hepatitisu A (6,19,20,22).

Osebe, ki prebolijo hepatitis B so doživljenjsko imune na ponovno okužbo.

1.2.5 DIAGNOSTIKA

Potek virusne okužbe lahko pri hepatitisu B in tudi drugih virusnih hepatitisih spremljamo s spremljanjem ravni jetrnih encimov aspartat-aminotransferaze (AST), alanin-aminotransferaze (ALT), gama glutamil-transferaze (γ GT), alkalne fosfataze (AF) ter bilirubina. Posebnost pri okužbi z virusom hepatitisa B je v tem, da je v serumu v času okužbe prisotna izjemno velika količina virionov in njihovih gradnikov – različnih virusnih antigenov. Ob tem se v serumu pojavljajo tudi specifična protitelesa. Dokazovanje prisotnosti in nivoja različnih antigenov in protiteles virusa hepatitisa B z različnimi serološkimi testi lahko zato uporabimo kot dobre označevalce poteka in prognoze bolezni. HBV lahko dokažemo tudi z elektronskim mikroskopiranjem ali pa z različnimi pomnoževalnimi metodami (PCR), pri katerih kvalitativno ali kvantitativno določamo virusno DNA. Rutinsko se v diagnostiki zaradi svoje enostavnosti pogosteje uporabljajo serološki testi, predvsem taki, ki temeljijo na tehniki ELISA (**E**nzyme-**L**inked **I**mmuno-**S**orbent **A**ssay).

Pri opredelitvi prisotnosti in stadija okužbe se običajno opiramo na prisotnost naslednjih virusnih antigenov in protiteles:

- HBsAg (površinski antigen HBV) se med okužbo v serumu pojavi prvi in ostaja prisoten ves čas akutnega obdobja. Izgine še preden se v serumu pojavijo protitelesa proti HBs. Čas, v katerem ni moč dokazati HBsAg niti protiteles proti HBs, imenujemo "okno".
- Protitelesa IgM (proti HBcAg) se v serumu pojavijo v serumu v obdobju "okna", ko HBsAg ni več v serumu, protitelesa proti HBsAg pa še niso dokazljiva. Zato prisotnost IgM proti HBc potrjuje akutni hepatitis B.
- HBeAg je prav tako pomemben faktor pri diagnostiki hepatitisa B. V serumu se pojavlja skupaj s HBsAg in hkrati z njim tudi izgine. Prisotnost HBeAg v serumu je odsev virusne aktivnosti, zato nam ta parameter kaže na kužnost bolnika. Dolgotrajna prisotnost HBeAg v serumu v času bolezni nakazuje na večjo verjetnost prehoda v kronično obliko.
- Protitelesa Anti-HBs so znak prebolele okužbe ali uspešnega cepljenja proti HBV (6,9,19,22,23).

1.2.6 PREPREČEVANJE IN ZDRAVLJENJE

Preprečevanje okužbe s hepatitisom B zajema naslednje ukrepe:

- Varno in učinkovito cepljenje proti hepatitisu B (pasivna in aktivna imunizacija). Cepljenje poteka po shemi 0, 1, 6. Možna je tudi revakcinacija s poživitvenim odmerkom pri osebah, pri katerih se je koncentracija protiteles znižala pod 10 IE/mL oziroma vsakih 4-5 let. V Sloveniji je od leta 1998 obvezno cepljenje za predšolske otroke.
- Novorojenčke mater, ki so nosilke virusa, se takoj po porodu cepi.
- Izogibanje stiku s telesnimi tekočinami drugih ljudi.
- Uporaba sterilnih igel, brizg in drugih ostrih predmetov.
- Pred spolnim prenosom okužbe varuje tudi kondom.
- Uporabljamo svoj pribor za osebno nego (zobna ščetka, pribor za britje, brisače, perilo ...), jedilni pribor, kozarce ...
- Skrbimo za osebno higieno.

Cepljenje pa je lahko tudi neuspešno, kar pripisujejo visokemu virusnemu bremenu nosečnice, transplacentarni okužbi, slabemu imunskemu odzivu novorojenčka in razvoju mutacij HBs.

HBV se inaktivira pri 120 °C v 7-10 minutah (vrela voda), 160 °C v 2 urah (suha vročina), 0,5 – 1% natrijev hipoklorid v 30 minutah in 40% formalin ali 16% formaldehid v 12 urah; lahko se uporabi tudi etilenoksid (6,19,22,24).

1.2.6.1 Zdravljenje

Zdravila za zdravljenje akutnega virusnega hepatitisa B še ni. Bolniku ni potrebno napraviti kakšnih drastičnih ukrepov v svojem stilu življenja. Prepovedano je le uživanje alkoholnih pijač in seveda drog. Močno srbenje pa se omili s holestiraminom (6-15g dnevno v suspenziji ali kapsulah). Uporaba kortikosteroidov se počasi opušča, ker so lahko vzrok za večje število kroničnih potekov hepatitisa.

V bolnišnici se zdravijo le bolniki s hudim potekom bolezni. Zdravljenje persistentnega hepatitisa ni potrebno, medtem ko se za zdravljenje kroničnega aktivnega hepatitisa B uporablja:

- Rekombinantni interferon α (dolgotrajno in uspešno pri 37% bolnikov).
- Lamivudin, nukleozidni analog (dolgotrajno – nekajletno in uspešno pri 47% bolnikov). Uporablja se tudi za preprečevanje obporodne in bolnišnične okužbe pri visoko viremičnih nosečnicah s kroničnim hepatitisom B (6).

Nosečnice z negativnimi virološko-serološkimi izvidi na HBV, pri katerih obstaja velika nevarnost, da bodo prišle v stik s HBV, se zaščitijo aktivno (aktivna imunizacija). Pri parenteralnem stiku nosečnice s HBV, pa se le-te pasivno zaščitijo s specifičnimi imunoglobulini in nato še aktivno s cepivom proti hepatitisu B. Ponovna pasivna zaščita pa pride v poštev, ko nosečnica odkloni cepljenje s cepivom.

Možna je tudi hkratna okužba s HBV in HCV, ki pa je neobičajna, saj HCV zavira razmnoževanje HBV. Tvrstni bolniki so zato običajno HBeAg in HBV DNA negativni. V primerih, ko je nosečnica hkrati okužena s HBV in HCV, jo zdravimo z interferonom α brez ribavirina, ki je teratogen (25).

Med otroci imajo za uspešno zdravljenje tisti z nizko viremijo, visokimi vrednostmi aminotransferaz, pozitivnim HBeAg in kratkim trajanjem bolezni. Otroke z normalnimi aminotransferazami ob pozitivnem HBsAg, HBeAg in HBV DNA zaradi slabega učinka ne zdravijo, ampak jih ambulantno nadzorujejo enkrat do dvakrat na leto (6,25).

1.2.7 EPIDEMIOLOGIJA IN PREVALENCA

Bolezen je razširjena po vsem svetu. Nosilec je človek. Iz raziskave, ki je bila opravljena leta 2007 (ECDC-Evropski center za preprečevanje in nadzor bolezni, 2007) za evropske države (27 evropskih držav), je razvidno, da se je število zabeleženih primerov hepatitisa B v zadnjih desetih letih znižalo iz 6,7 primerov/100.000 prebivalcev (leta 1995) na 1,5 primerov/100.000 prebivalcev (leta 2005). Leta 2005 je bilo zabeleženih skupaj 6977 primerov okužbe s HBV. Najbolj prizadeta je bila starostna skupina 25-44 let, ki ji sledi starostna skupina 15-24 let. Moški so bili bolj pogosto prizadeti kot ženske. Najpogostejša genotipa HBV sta A in D. Genotip A prevladuje na področju Severne Evrope, genotip D pa je pogostejši na področju Mediterana in Vzhodne Evrope. Svetovno gledano pa sta genotipa B in C pogostejša v Aziji, genotip E v Zahodni Afriki, ter genotipa F in G v Južni in Srednji Ameriki (slika 14) (19,26).



Slika 14: Prikaz razširjenosti genotipov HBV.

Leta 2007 so v Sloveniji poročali o 15 primerih akutne okužbe in 21 primerih kronične okužbe, leta 2006 pa o 29 kroničnih in 26 akutnih primerih (27).

2. NAMEN DELA

Do sedaj za Dolenjsko regijo ni bilo podatkov, zato je namen diplomske naloge ugotoviti stopnjo prekuženosti s parazitom *T. gondii* in virusom hepatitisa B pri nosečnicah. V ta namen smo uporabili imunsko tehniko ELISA oziroma ELFA za določanje specifičnih protiteles razreda IgG in IgM proti parazitu *T. gondii* ter za določanje površinskega antigena virusa hepatitisa B. Ugotavljali smo tudi avidnost specifičnih protiteles IgG. Prekuženost nosečnic s *T. gondii* in HBV smo spremljali v obdobju od 1995 do 2008 na področju Dolenjske regije. Na podlagi rezultatov smo opredelili odstotek za okužbo ogroženih nosečnic. Rezultati in ugotovitve te diplomske naloge bodo predstavljali primerjavo s študijo, ki je bila opravljena leta 2008 za osrednjo Slovenijo.

3. METODE IN MATERIALI

3.1 KLINIČNI MATERIAL

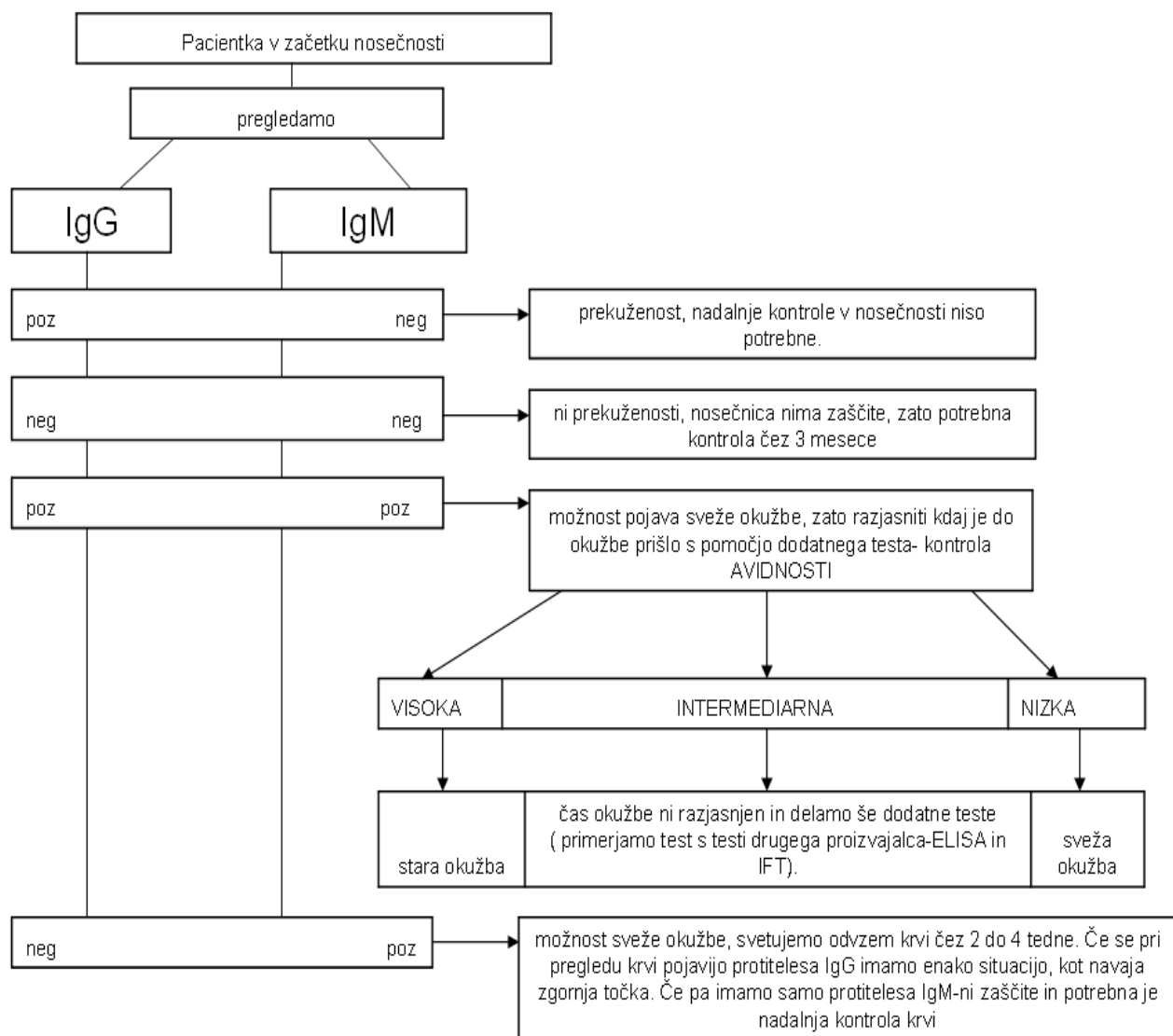
Iz računalniške baze podatkov smo za obdobje od leta 1995 do 2008 pridobili podatke o prekuženosti nosečnic s parazitom *T.gondii* in virusom hepatitisa B. V Mikrobiološkem laboratoriju Zavoda za zdravstveno varstvo Novo mesto je bilo tako za to obdobje testiranih 11.542 serumov nosečnic na toksoplazemska protitelesa IgG, IgM ter 7.474 serumov nosečnic na nosilstvo površinskega antigena virusa hepatitisa B (HbsAg). Pri serumih na toksoplazmozo je bila tudi ugotovljena avidnost specifičnih protiteles IgG.

V raziskavo smo vključili predvsem nosečnice iz jugo-vzhodne Slovenije. Rezultate o prekuženosti nosečnic smo primerjali z rezultati študije, ki je obravnavala prekuženost nosečnic s toksoplazmozo v obdobju od leta 2000 do 2007 na območju osrednje Slovenije ter z rezultati drugih evropskih držav.

3.2 METODE

Na zavodu za zdravstveno varstvo Novo Mesto izvajajo presejalno testiranje na okužbo s *T.gondii* in virusom hepatitisa B pri nosečnicah. Na dobljenih vzorcih krvi noseče pacientke izvedejo v laboratoriju testiranje na prisotnost specifičnih protiteles IgG in IgM za *T.gondii* ter na prisotnost površinskega antigena virusa hepatitisa B.

Alogoritem določanja za *T.gondii* je naslednji:



Slika 15: Shematski prikaz testiranja krvi nosečnic.

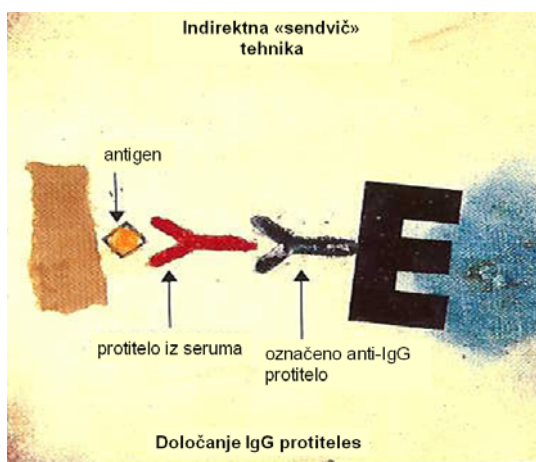
Presejalno testiranje nosečnic na površinski antigen virusa hepatitisa B na zavodu izvajajo v skladu s strokovnimi priporočili in sicer v zadnjem trimeslju ali malo pred porodom. Cilj testiranja je, ugotoviti nosilstvo in ob pozitivnem rezultatu takoj po porodu zaščititi novorojenčka pred zbolevanjem (z imunoglobulini in cepivom). Ker se lahko nosečnica okuži kadarkoli v času nosečnosti, se priporoča testiranje proti koncu nosečnosti.

Če je izvid pozitiven – ponovijo testiranje še enkrat z enakim testom, nato pa pošljejo v potrditev v zunanji laboratorij (na Medicinski fakulteti – Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo).

3.2.1 PRINCIP DOLOČANJA PROTITELES IgG PROTI PARAZITU *T. gondii*

Tako kot določanje protiteles IgM proti parazitu *T. gondii*, tudi določanje protiteles IgG proti istemu parazitu temelji na dvostopenjski ELISA sendvič tehniki (slika 15). Po predhodnem redčenju vzorca se anti-*T. gondii* protitelesa IgG vežejo z *T. gondii* antigenom, ki prekriva notranjo steno kivete v SPR kartuši. Nevezane komponente nato odstranimo v fazi spiranja z v ta namen pripravljenim pufrom TRIS. Monoklonska protitelesa (mišjega izvora) proti človeškim (anti-human) IgG, ki so konjugirana z alkalno fosfatazo, se vežejo s katerimikoli človeškimi protitelesi IgG vezanimi na steno SPR-ja. Med zadnjo fazo detekcije se doda še substrat, ki je tudi v tem primeru 4-MUP in encimska reakcija lahko poteče. Konjugiran encim lahko tako hidrolizira dodani substrat v fluorescenčni produkt kateremu izmerimo fluorescenco pri 450 nm (29).

Intenziteta izmerjene fluorescence je sorazmerna koncentraciji protiteles IgG v vzorcu.



Slika 16: Princip določanja protiteles IgG proti parazitu *T. gondii*.

3.2.1.1 Materiali:

- aparat mini VIDAS (Vitek ImmunoDiagnostic Assay System),
- preiskovan serum (100 µL),
- diagnostični set VIDAS TOXO IgG II (bioMerieux Marcy-l'Etoile, France) (slika 16):
 - set 60 kartuš (STR) s pripravljenimi reagenti,
 - 60 plastičnih pipet (SPR), katerih notranjost je prekrita z *T.gondii* antigenom (monoklonska protitelesa, mišjega izvora)
 - TXG standard S1 (1x1 mL),
 - TXG pozitivna kontrola C1 (1x2 mL),
 - TXG negativna kontrola C2 (1x3 mL),
 - MLE kartica (specifikacijska kartica s kodami).



SLIKA 17: Diagnostični set VIDAS TOXO IgG.

Preglednica 1: TXG kartuša za določanje protiteles IgG proti parazitu *T.gondii*.

Vdolbinica (mesto na kartuši)	Reagenti
1	Vzorec
2	Raztopina za redčitev vzorca: pufer TRIS (50 mmol/L; pH 7,4) + proteini in kemijski stabilizatorji + 0,9 g/L natrijevega azida (600 µL).
3	Raztopina za stopnjo predspiranja: pufer TRIS (50 mmol/L; pH=7,4) + proteini in

	kemijski stabilizatorji + 0,9 g/L natrijevega azida (600 µL).
4-5-7-8	Pufer za spiranje: pufer TRIS (50 mmol/L; pH 7,4) + proteini in kemijski stabilizatorji + 0,9 g/L natrijevega azida (600 µL).
6	Konjugat: imunski kompleks označen z alkalno fosfatazo + 0,9 g/L natrijevega azida (400 µL).
9	Raztopina za redčitev vzorca: pufer TRIS (50 mmol/L; pH 7,4) + proteini in kemijski stabilizatorji + 0,9 g/L natrijevega azida (400 µL).
10	Kiveta s substratom: 4-MUP (0,6 mmol/L) + dietanolamin (DEA*) (0,62 mol/L oz. 6,6%; pH 9,2) + 1 g/L natrijevega azida (300 µL).

3.2.1.2 Slikovni prikaz postopka dela (priloga I)

3.2.1.3 Vrednotenje rezultatov

Aparatura izmeri fluorescenco dvakrat. Prva meritev se nanaša na ozadje, ki ga daje kiveta pred dodatkom substrata. Druga meritev pa se izvede po inkubaciji substrata z encimom. Relativna fluorescenca se izračuna z odštetjem signala ozadja. Aparatura avtomatsko preračuna meritve v IU/mL (mednarodne enote oziroma IE).

Preglednica 2: Referenčne vrednosti za protitelesa IgG proti parazitu *T.gondii*.

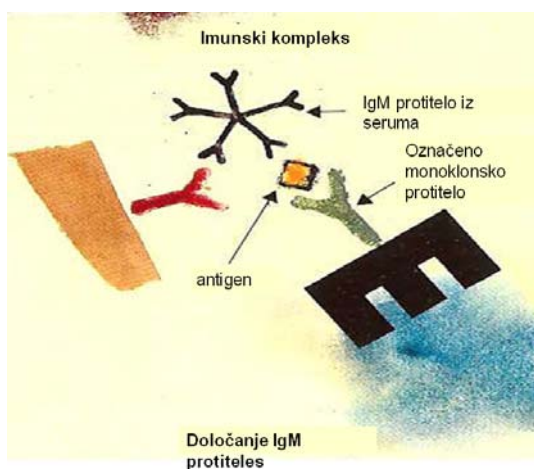
TITER (IU/mL)	VREDNOTENJE
< 4	Negativno
$4 \leq \text{titer} < 8$	Mejna vrednost
≥ 8	Pozitivno

3.2.2 PRINCIP DOLOČANJA PROTITELES IgM PROTI PARAZITU *T. gondii*

Za določanje protiteles IgM v serumu preiskovanca smo uporabili sendvič imunsko tehniko ELISA oz. ELFA (slika 17). Vse stopnje testa, razen nanos seruma, so avtomatizirane.

Po predhodnem redčenju vzorca se protitelesa IgM vežejo s poliklonskimi protitelesi, ki pa so že predhodno vezana na steno kivetk v kartuši (SPR). Anti-toksoplazme IgM so specifično prepoznane s strani inaktiviranega antigena *T. gondii*. Posledično nastane imunski kompleks Ag-Pt, ki ga detektiramo s konjugatom, ki je v tem primeru kozje protitelo proti človeškemu IgM konjugirano z encimom alkalna fosfataza. Med zadnjo stopnjo detekcije se doda še substrat (4-MUP), da lahko encimska reakcija poteče. Konjugiran encim lahko tako hidrolizira dodani substrat v fluorescenčni produkt kateremu izmerimo fluorescenco pri 450 nm (29).

Intenziteta izmerjene fluorescence je sorazmerna koncentraciji protiteles IgM v vzorcu.



Slika 18: Princip določanja protiteles IgM proti parazitu *T. gondii*.

3.2.2.1 Materiali:

- aparat mini VIDAS (Vitek ImmunoDiagnostic Assay System),
- preiskovan serum (100 µL),
- diagnostični set VIDAS TOXO IgM (bioMerieux Marcy-l'Etoile, France) (slika 18):
 - set 60 kartuš (STR) s pripravljenimi reagenti,
 - 60 plastičnih pipet (SPR), katerih notranjost je prekrita z poliklonskimi anti-*T. gondii* protitelesi IgM,
 - TXM standard S1 (1x1 mL),
 - TXM pozitivna kontrola C1 (1x2 mL),
 - TXM negativna kontrola C2 (1x2 mL),
 - MLE kartica (specifikacijska kartica s kodami).



Slika 19: Diagnostični set VIDAS TOXO IgM.

Preglednica 3: TXM kartuša za določanje protiteles IgM proti *T. gondii*.

Vdolbinica (mesto na kartuši)	Reagenti
1	Vzorec
2	Raztopina za redčitev vzorca: pufer TRIS (50 mmol/L; pH 7,4) + proteini in kemijski stabilizatorji + 0,9 g/L natrijevega azida (300 µL).
3	Raztopina za stopnjo predspiranja: pufer TRIS (50 mmol/L; pH= 7,4) + proteini in kemijski stabilizatorji + 0,9 g/L natrijevega

	azida (600 µL).
4-5-7-8	Pufer za spiranje: pufer TRIS (50 mmol/L; pH 7,4) + proteini in kemijski stabilizatorji + 0,9 g/L natrijevega azida (600 µL).
6	Konjugat: imunski kompleks označen z alkalno fosfatazo + 0,9 g/L natrijevega azida + 0,02 % gentamicina (400 µL).
9	Prazna vdolbinica .
10	Kiveta s substratom: 4-MUP (0,6 mmol/L) + dietanolamin (DEA*) (0,62 mol/L oz. 6,6%; pH 9,2) + 1 g/L natrijevega azida (300 µL).

3.2.2.2 Slikovni prikaz postopka dela (priloga I)

3.2.2.3 Vrednotenje rezultatov

Aparatura izmeri fluorescenco dvakrat. Prva meritev se nanaša na ozadje, ki ga daje kiveta pred dodatkom substrata. Druga meritev pa se izvede po inkubaciji substrata z encimom. Relativna fluorescenca se izračuna z odštetjem signala ozadja. VIDAS sistem interpretira rezultate na osnovi relativne vrednosti fluorescence (RFV) $\rightarrow i = \text{RFV pacienta} / \text{RFV standarda}$.

i – vrednost testa

RFV- relativna fluorescenčna vrednost

Preglednica 4: Referenčne vrednosti za protitelesa IgM proti parazitu *T.gondii*.

INDEKS	VREDNOTENJE
$i < 0,55$	Negativno
$0,55 \leq i < 0,65$	Mejna vrednost
$i \geq 0,65$	Pozitivno

Pri serumih z indeksnimi vrednostmi IgM med $0,55 \leq i < 0,65$ je potrebno ponoviti testiranje.

3.2.3. PRINCIP DOLOČANJA AVIDNOSTI PROTITELES IgG PROTI PARAZITU *T. gondii*

Za določanje avidnosti protiteles IgG proti parazitu *T. gondii* smo v ta namen uporabili VIDAS TOXO IgG Avidity test (bioMerieux Marcy-l'Etoile, France). Metoda temelji na dvostopenjski ELISA sendvič tehniki, pri kateri v končni stopnji merimo fluorescenco. Za analizo posameznega vzorca, ki je v tem primeru serum, smo uporabili dvojni testni kartuši, ki sestoji iz prve testne kartuše in druge referenčne kartuše. Obe imata na steno kivetk vezan antigen *T. gondii*. Po dodatku seruma preiskovanca ostanejo v referenčni kartuši vezana vsa anti-toksoplazemska protitelesa IgG. Tako dobimo totalna protitelesa, ki služijo kot primerjava (referenca) vrednostim testne kartuše. Vezana protitelesa na stenah testne kartuše pa smo spirali z disociacijskim sredstvom oziroma agensom, ki je v tem primeru urea. Le-ta ima velik vpliv na šibko avidno vez med antigenom ter protitelesom in povzroči razpad imunskega kompleksa. Posledično ostanejo v testni kartuši samo vezana visoko avidna anti-toksoplazemska protitelesa IgG. Nizko afinitetna protitelesa se iz kivete izperejo (29).

3.2.3.1 Material:

- aparat mini VIDAS (Vitek ImmunoDiagnostic Assay System),
- preiskovan serum (100 µL),
- diagnostični set VIDAS Avidity IgG (bioMerieux Marcy-l'Etoile, France) (Slika 19):
 - set 60-ih kartuš s pripravljenimi reagenti,
 - 60 plastičnih pipet (SPR), katerih notranjost je senzibilizirana z membrano in citoplazmo toksoplazma atigenom,
 - TXGA razredčen vzorec (standardni vzorec; 1x13 mL),
 - pozitivna kontrola C1 (visoka avidnost TXGA; 1x2 mL),
 - negativna kontrola (nizka avidnost TXGA; 1x1.2 mL),
 - MLE kartica (specifikacijska kartica s kodami).



Slika 20: Diagnostični set VIDAS Avidity IgG.

Preglednica 5: TXG referenčna kartuša za določanje avidnosti protiteles IgG proti *T. gondii*.

Vdolbinica (mesto na kartuši)	Reagenti
1	Vzorec
2	Raztopina za redčitev vzorca: pufer TRIS (50 mmol/L; pH 7,4) + proteini in kemijski stabilizatorji + 1 g/L natrijevega azida (600 µL).
3	Raztopina za stopnjo predspiranja: pufer TRIS (50 mmol/L; pH=7,4) + proteini in kemijski stabilizatorji + 1 g/L natrijevega azida (600 µL).
4-5-7-8	Pufer za spiranje: pufer TRIS (50 mmol/L; pH 7,4) + proteini in kemijski stabilizatorji + 1 g/L natrijevega azida (600 µL).
6	Konjugat: imunski kompleks označen z alkalno fosfatazo + 1 g/L natrijevega azida (400 µL).
9	Raztopina za redčitev vzorca: pufer TRIS (50 mmol/L; pH 7,4) + proteini in kemijski stabilizatorji + 1 g/L natrijevega azida (400 µL).
10	Kiveta s substratom: 4-MUP (0,6 mmol/L) + dietanolamin (DEA*) (0,62 mol/L oz. 6,6%; pH 9,2) + 1 g/L natrijevega azida (300 µL).

Preglednica 6: TXG testna kartuša za določanje avidnosti protiteles IgG proti *T. gondii*.

Vdolbinica (mesto na kartuši)	Reagenti
1	Vzorec
2	Raztopina za redčitev vzorca: pufer TRIS (50 mmol/L; pH 7,4) + proteini in kemijski

	stabilizatorji + 1 g/L natrijevega azida (600 µL).
3	Raztopina za stopnjo predspiranja: pufer TRIS (50 mmol/L; pH=7,4) + proteini in kemijski stabilizatorji + 1 g/L natrijevega azida (600 µL).
4-5	Pufer za spiranje: pufer TRIS (50 mmol/L; pH 7,4) + <u>disociacijski agent (ureo)</u> + proteini in kemijski stabilizatorji + 1 g/L natrijevega azida (600 µL).
7-8	Pufer za spiranje: pufer TRIS (50 mmol/L; pH 7,4) + proteini in kemijski stabilizatorji + 1 g/L natrijevega azida (600 µL).
6	Konjugat: imunski kompleks označen z alkalno fosfatazo + 1 g/L natrijevega azida (400 µL).
9	Raztopina za redčitev vzorca: pufer TRIS (50 mmol/L; pH 7,4) + proteini in kemijski stabilizatorji + 1 g/L natrijevega azida (400 µL).
10	Kiveta s substratom: 4-MUP (0,6 mmol/L) + dietanolamin (DEA*) (0,62 mol/L oz. 6,6%; pH 9,2) + 1 g/L natrijevega azida (300 µL).

3.2.3.2 Slikovni prikaz postopka dela (priloga I)

3.2.3.3 Vrednotenje rezultatov:

Aparatura izmeri fluorescenco dvakrat, in sicer v referenčni in testni kartuši, zato je količina visoko avidnih protiteles IgG proti toksoplazmi v serumu preiskovanca sorazmerna intenziteti fluorescence hidroliziranega substrata. To imenujemo indeks avidnosti IgG*. Fluorescenca je odčitana avtomatsko pri 450nm v primerjavi z referenčno kartušo in rezultati natiskani v

nazorni kvalitativni obliki. Tako dobimo lahko **nizko** avidna anti-toksoplazma IgG, **srednje** avidna ali **visoko** avidna anti-toksoplazma IgG.

Indeks avidnosti $\text{IgG}^* = \text{RFV testne kartuše (spiranje z disociacijskim reagentom)} / \text{RFV referenčne kartuše (spiranje brez disociacijskega reagenta)}$

RFV – relativna fluorescenčna vrednost

Razpredelnica 7: Referenčne vrednosti za avidnost protiteles IgG proti parazitu *T.gondii*.

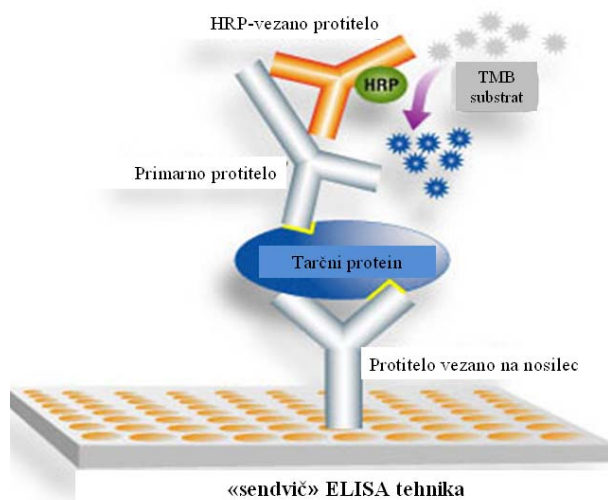
AVIDNOST	REZULTAT
Indeks < 0,200	Nizko avidna IgG
$0,200 \leq \text{indeks} < 0,300$	Srednja avidna IgG
Indeks $\geq 0,300$	Visoko avidna IgG

Na ta način izločimo možnost akutne okužbe v zadnjih štirih mesecih, če dobimo visoko avidna IgG.

3.2.4 PRINCIP DOLOČANJA POVRŠINSKEGA ANTIGENA HBV

Za določanje površinskega antigena HBV (HBs Ag) smo uporabili tehniko ELFA (slika 19). Gre za encimsko-fluorescentno imunsko tehniko, ki je povsem avtomatizirana. Vsi reagenti so že pripravljene v vsaki kartuši.

Po dodatku vzorca se antigeni iz le-tega simultano vežejo na monoklonska protitelesa, ki so vezana na notranje stene kivetk v kartuši. Prav tako se vežejo tudi s protitelesi, ki so vezana z biotinom. Nevezane komponente iz vzorca odstranimo v fazi spiranja. Antigeni vezani na trdno fazo pridejo v stik z streptavidinom. Na le-tega je vezana še alkalna fosfataza, ki je vezana še z biotinom. V naslednji stopnji spiranja ponovno odstranimo nevezane komponente. Med stopnjo detekcije se doda še substrat, ki omogoči potek encimske reakcije. Konjugiran encim katalizira hidrolizo tega substrata v fluorescentni produkt, katerega fluorescenco izmerimo pri valovni dolžino 450 nm. Intenziteta fluorescence je sorazmerna koncentraciji antigena v vzorcu (30).



Slika 21: Prikaz principa ELISA sendvič tehnike.

3.2.4.1 Materiali:

- mini VIDAS aparatura (Vitek ImmunoDiagnostic Assay System),
- preiskovan serum (150 µL),
- diagnostični testi VIDAS HBs Ag (bioMerieux Marcy-l'Etoile, France) (slika 20):
 - set 60 kartuš (STR) s pripravljenimi reagenti,
 - 60 plastičnih pipet (SPR), katerih notranjost je prekrita z monoklonskimi anti-HBs Ag protitelesi,
 - HBS standard S1 (lioofilizat 3x1mL),
 - HBS pozitivna kontrola C1 (1x1,5mL),
 - HBS negativna kontrola C2 (1x1,5mL),
 - MLE kartica (specifikacijska kartica s kodami).



Slika 22: Diagnostični testi VIDAS HBs Ag.

Razpredelnica 8: HBS kartuša za določanje površinskega antigena virusa hepatitisa B.

Vdolbinica (mesto na kartuši)	Reagenti
1	Vzorec
2	Konjugat: pufer, ki vsebuje kozji serum + poliklonska anti-HBs Ag protitelesa označena z biotinom + 1 g/L natrijevega azida (300 µL).
3-4-7-8-9	Pufer za spiranje z dietanolaminom (DEA*: 0,85 mol/L oz. 9,1%) + Tween 20 + 1 g/L natrijevega azida (600 µL).
5	Indikator: z alkalno fosfatazo označen streptavidin + 1 g/L natrijevega azida

	(400 μ L).
6	Raztopina za stopnjo predspiranja: pufer TRIS (50 mmol/L) (pH=7,4) + proteini in kemijski stabilizatorji + 1g/L natrijevega azida (600 μ L).
10	Kiveta s substratom: 4-MUP (0,6 mmol/L) + DEA* (0,62 mol/L oz. 6,6%; pH 9,2) + 1 g/L natrijevega azida (300 μ L).

3.2.4.2 Slikovni prikaz postopka dela (priloga I)

3.2.4.3 Vrednotenje rezultatov:

Aparatura izmeri fluorescenco dvakrat. Prva meritev se nanaša na ozadje, ki ga daje kiveta pred dodatkom substrata. Druga meritev pa se izvede po inkubaciji substrata z encimom. Relativna fluorescenca se izračuna z odštetjem signala ozadja. VIDAS sistem interpretira rezultate na osnovi relativne vrednosti fluorescence (RFV) $\rightarrow i = \text{RFV pacienta} / \text{RFV standarda}$ (29).

i – vrednost testa

RFV- relativna fluorescenčna vrednost

Razpredelnica 9: Referenčne vrednosti za površinski antigen virusa hepatitisa B.

Rezultat	Vrednotenje
$i < 0,13$	Negativno
$i \geq 0,13$	Pozitivno

4. REZULTATI IN DISKUSIJA

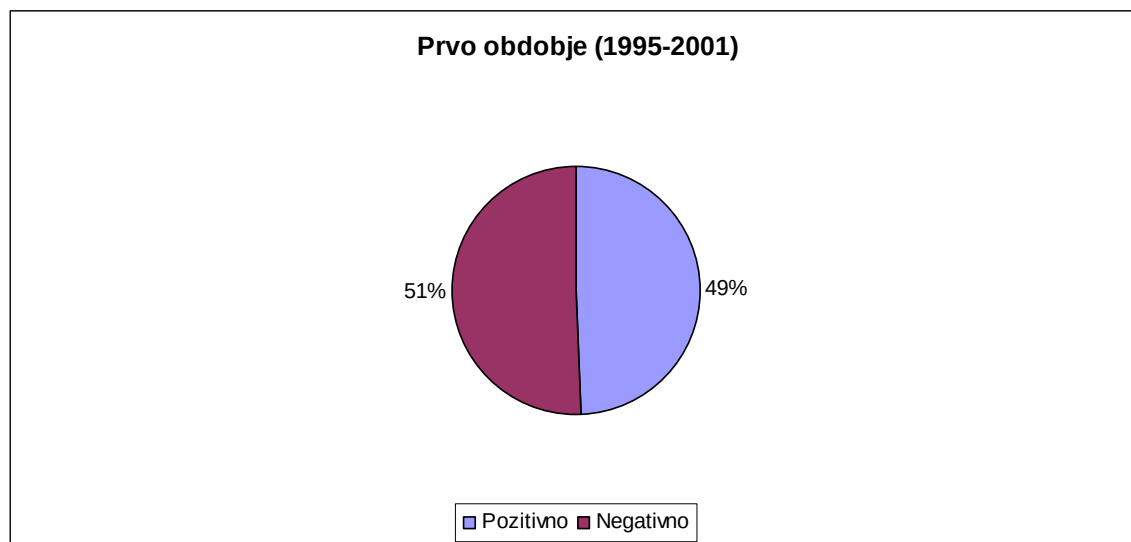
V preglednicah od 10 do 12 so predstavljeni rezultati prekuženosti za toksoplazmozo, medtem ko v preglednicah od 13 do 15 pa so predstavljeni rezultati prekuženosti za površinski antigen virusa hepatitisa B v letih od 1995 do 2008 za dolensko regijo.

4.1 REZULTATI

4.1.1 Prekuženost pacientk na toksoplazmozo v letih 1995-2001

Preglednica 10: Rezultati testiranja na toksoplazmozo za obdobje 1995-2001.

Število testiranih pacientk	Število pacientk s poz. IgG pt	% poz. IgG pt	Število pacientk s neg. IgG pt	% neg. IgG pt
5181	2557	49,35	2624	50,64

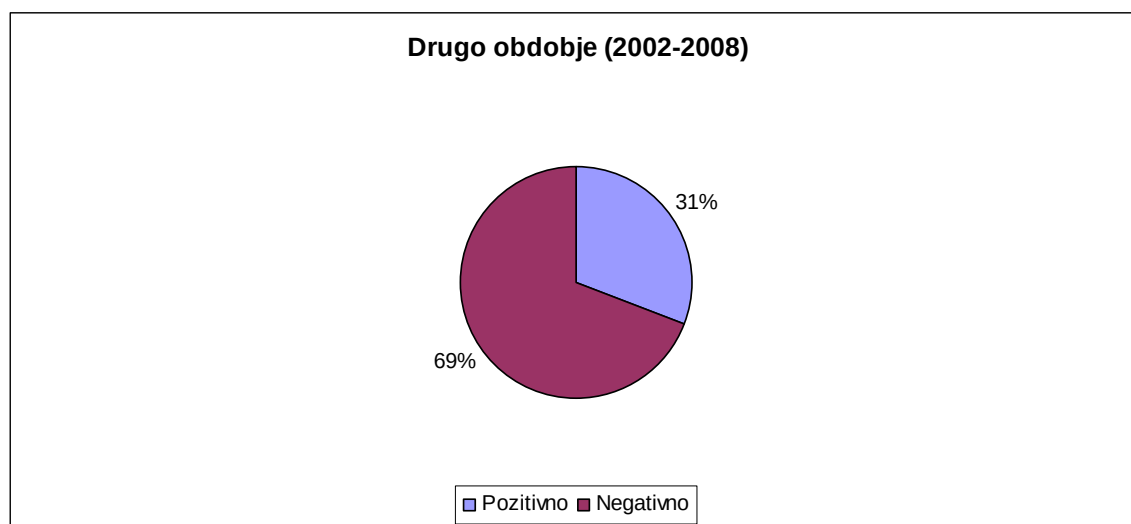


Graf 1: Prikaz rezultatov testiranja na toksoplazmozo za obdobje 1995-2001.

4.1.2 Prekuženost pacientk na toksoplazmozo v letih 2002-2008

Preglednica 11: Rezultati testiranja na toksoplazmozo za obdobje 2002-2008.

Število testiranih pacientk	Število pacientk s poz. IgG pt	% poz. IgG pt	Število pacientk s neg. IgG pt	% neg. IgG pt
6361	1961	30,82	4400	69,17

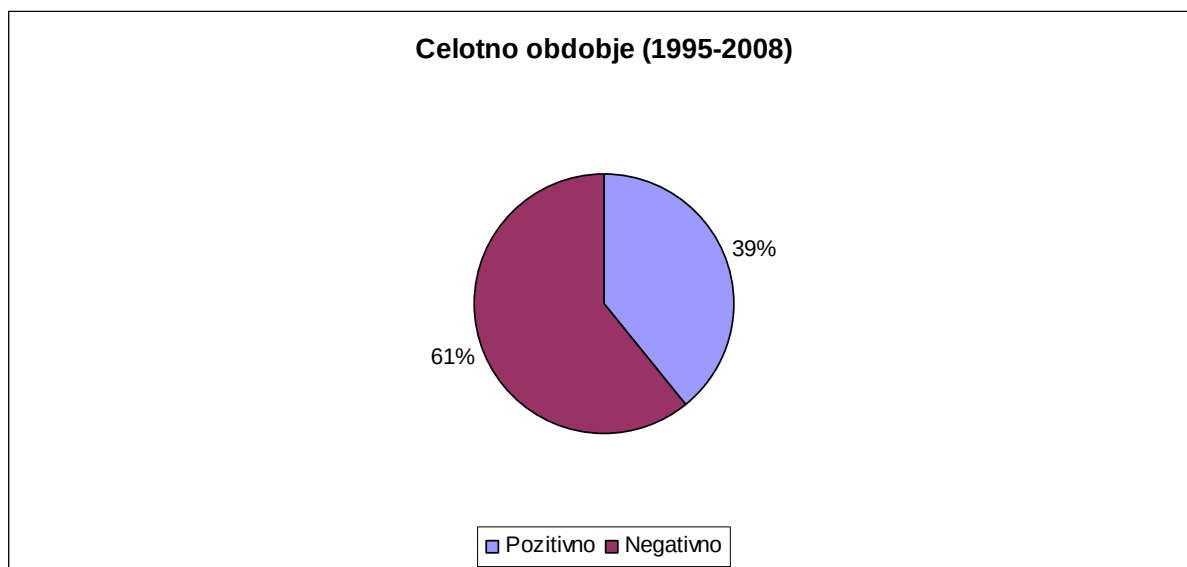


Graf 2: Prikaz rezultatov testiranja na toksoplazmozo za obdobje 2002-2008.

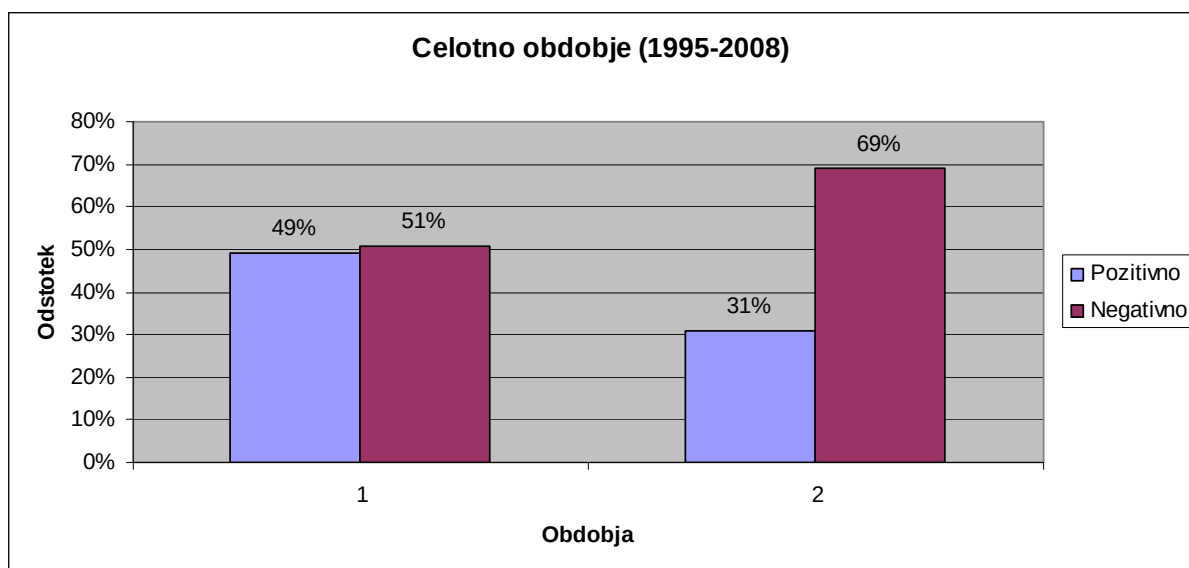
4.1.3 Prekuženost pacientk na toksoplazmozo v letih 1995 – 2008

Preglednica 12: Rezultati testiranja na toksoplazmozo za obe obdobji 1995-2008.

Obdobje	Število testiranih pacientk	Število poz. IgG	% poz.	Število neg. IgG	% neg.
1	5181	2557	49,35	2624	50,64
2	6361	1961	30,82	4400	69,17
Obdobje 1995-2008	11542	4518	39,14	7024	60,86



Graf 3: Prikaz rezultatov testiranja na toksoplazmozo za obe obdobji 1995-2008.



Graf 4: Prikaz rezultatov testiranja na toksoplazmozo za obe obdobji 1995-2008.

4.1.4 Prekuženost pacientk na HbsAg v obdobju 1995-2001

Preglednica 13: Rezultati testiranja na HbsAg za obdobje 1995-2001.

Št. testiranih pacientk	Št. pacientk s poz. Hbs Ag	% poz.Hbs Ag	Št. pacientk z neg. Hbs Ag	% neg.Hbs Ag
2745	7	0,26	2738	99,74

4.1.5 Prekuženost pacientk na HbsAg v obdobju 2002-2008

Preglednica 14: Rezultati testiranja na HbsAg za obdobje 2002-2008.

Št. testiranih pacientk	Št. pacientk s poz. Hbs Ag	% poz.Hbs Ag	Št. pacientk z neg. Hbs Ag	% neg.Hbs Ag
4729	8	0,17	4721	99,83

4.1.6 Prekuženost pacientk na HbsAg za celotno obdobje (1995-2008)

Preglednica 15: Rezultati testiranja na HbsAg za obe obdobji 1995-2008.

Obdobje	Št. testiranih pacientk	Št. poz. Hbs Ag	% poz.	Št. neg. Hbs Ag	% neg.
1	2745	7	0,26	2738	99,74
2	4729	8	0,17	4721	99,83
Obdobje 1995-2008	7474	15	0,20	7459	99,80

4.2 DISKUSIJA

Iz podatkov Mikrobiološkega laboratorija Zavoda za zdravstveno varstvo Novo mesto smo pridobili podatke o prekuženosti nosečnic s parazitom *Toxoplasma gondii* v obdobju od leta 1995 do 2008 na območju jugo-vzhodne Slovenije. To področje zajema Belo krajino, ožjo Dolenjsko do Trebnjega in na vzhodu do Krškega. V zadnjih desetih letih podatki o nosečnicah s področja Krškega niso zajeti, ker tamkajšnji ginekolog pošilja vzorce v drug laboratorij.

Rezultate smo uredili v dve obdobji, in sicer od leta 1995-2001 (prvo obdobje) in od leta 2002-2008 (drugo obdobje). V obeh obdobjih skupaj je bilo opravljenih 11.542 seroloških testiranj pri nosečnicah. Pri 39,14% smo dokazali prisotnost protiteles IgG proti *T. gondii*. Upoštevali smo rezultate testiranj v celotnem poteku nosečnosti. V času opazovanega obdobja (sedem let, štirinajst let) so bile nekatere pacientke večkrat noseče in testirane ter opazovali smo tudi serokonverzijo. Zajete so tiste pacientke, ki so prebolele okužbo precej pred nosečnostjo, kot tudi tiste, ki so bile zaradi tega posebej obravnavane.

V prvem obdobju, ko je bilo obravnavanih 5.181 nosečnic, smo pri 49,35% dokazali prisotnost specifičnih protiteles IgG proti *T. gondii*, medtem ko smo v drugem obdobju obravnavali 6.361 nosečnic in le pri 30,82% dokazali prisotnost specifičnih protiteles IgG proti *T. gondii*. Iz rezultatov lahko ugotovimo, da se prekuženost nosečnic s toksoplazmozo v drugem obdobju zniža.

Predvidevamo, da so na znižanje prekuženosti vplivali postopki večjega ozaveščanja nosečnic, boljši preventivni ukrepi in izboljšane higienske razmere v tem obdobju. Za večjo ozaveščenost in boljši nadzor nad nosečnicami imamo tudi posebne argumente – v drugem obdobju smo opazili večjo doslednost pri pošiljanju kontrolnih vzorcev krvi. V prvem obdobju je bilo več nosečnic testiranih samo enkrat, četudi so bile negativne in bi jo moral ginekolog testirati trikrat v poteku nosečnosti.

Naše rezultate lahko primerjamo z rezultati študije, ki je obravnavala prekuženost nosečnic s toksoplazmozo v obdobju od leta 2000 do 2007 na območju osrednje Slovenije, Ljubljana z okolico (7). Omenjeni vir navaja prekuženost za obdobje 2002 do 2007 v povprečju 23,9%. Te rezultate lahko primerjamo z rezultati drugega obdobja naše študije, kjer ugotavljamo, da je prekuženost nosečnic s toksoplazmozo v jugo-vzhodni regiji v primerljivem obdobju, občutno večja in sicer približno 31%. Vzrok temu pripisujemo predvsem zunaj mestnemu (ruralnem) okolju, ki posledično prinaša tudi drugačen način življenja (prehranjevalne navade

ljudi,...) in nenavsezadnje tudi drugačne higienske razmere. Predvsem ruralno okolje (številna vinogradniška področja) lahko povežemo tudi z večjim številom mačk v zunanem okolju in tradicionalnim pojmovanjem njihovega načina življenja (življenje na prostem, lovljenje miši).

Povsod po Evropi ugotavljajo trend padanja prekuženosti s *T.gondii*. V Franciji so ugotovili da je prekuženost padla iz 45% v letu 1995 na 34% v letu 2003 (31), kar ugotavljamo tudi v naši regiji. Hkrati pa ugotavljamo manjši upad, kot v osrednji Sloveniji, kar bi bil lahko povod za dodatna izobraževanja in seznanjanja mladih žensk glede higiene rok in prehrane, za celotno okolje pa vpeljava primernih metod urejanja okolja in zdravega sobivanja z živalmi.

V diplomski nalogi smo določali tudi specifična protitelesa razreda IgM, ki so nam služila kot dodatna informacija, ker v splošnem velja, da so protitelesa razreda IgG značilna za starejše okužbe, medtem ko so protitelesa razreda IgM proti *T.gondii* značilnost svežih okužb.

Iz baze podatkov smo za obdobje 1995 do 2008 pridobili tudi podatke o nosilstvu površinskega antigena virusa hepatitisa B (HBsAg). Tudi v tem primeru je prvo obdobje zajemalo leta od 1995 do 2001, drugo obdobje pa leta od 2002 do 2008.

V prvem obdobju je bilo tako testiranih skupno 2745 nosečnic na HBs antigen in pri 7 preiskovankah (0,26%) je bil ta test pozitiven, pri ostalih (99,74%) pa negativen. V drugem obdobju pa je bilo na HBs antigen testiranih občutno več preiskovank in sicer skupno 4729. V tem obdobju pa je bilo le 8 pozitivnih rezultatov (0,17%) in 4721 negativnih rezultatov (99,83%). Tako je bilo v obeh obdobjih skupaj odkritih le 15 preiskovank pozitivnih na HBs antigen, povprečno lahko povzamemo, da smo odkrili v naši regiji 1 nosečnico letno, ki je bila nosilka HBsAg. Ob porodu je novorojenček dobil ustrezno zaščito, prav tako že prej vsi člani družine, spolni partner pa je bil pred cepljenjem še posebej testiran.

Število testiranih nosečnic na *T.gondii* in hepatitis B se razlikuje. Ugotavljamo, da niso bile vse nosečnice testirane na nosilstvo HBsAg v našem laboratoriju. V preteklih letih so tovrstno diagnostiko opravljali tudi oddelki za transfuziologijo lokalnih bolnišnic in centralni Zavod za transfuzijo v Ljubljani.

Iz epidemioloških podatkov, objavljenih na strani IVZ RS (32) smo pridobili podatke, da so od leta 1997 do leta 2008 v Sloveniji registrirali od 45 (v letu 2007) do 98 (leto 1997) nosilcev HBsAg, povprečno 59 nosilcev letno.

Naših rezultatov nismo mogli primerjati z drugimi regijami, ker nam niso bili dosegljivi. V bazi prijavljenih nosilcev so zajeti moški in ženske, za zadnjih pet let so podatki ločeni po spolu, za bolj zgodnje pa ne, nanašajo pa se na vse prebivalce Slovenije.

Hepatitis B je bolezen, katere povzročitelj se prenaša s krvjo, krvnimi pripravki, s posegi v medicini in s spolnimi odnosi. Vertikalno se prenese tudi z matere na plod. Zatorej se s preiskovanjem nosečnice pravzaprav obravnava celotna družina, tako spolni partner nosečnice kot tudi njun bodoči član.

Odkrivanje nosilstva HBsAg pri nosečnicah je pomembno in ima velik pomen za zaščito novorojenca ob porodu. Z aplikacijo specifičnih imunoglobulinov in kasneje cepljenja se ustvari pasivna in aktivna zaščita in se prepreči hudo obolenje, katerega posledice so lahko dolgotrajne in tragične.

Z uvedbo cepljenja proti hepatitisu B pa bo sčasoma postalo ugotavljanje nepotrebno, ker bodo vsi državljani Slovenije zaščiteni s cepivom, pregledovali bomo samo priseljene in nadzorovali precepljenost.

5. SKLEPI

- V celotnem obdobju od leta 1995-2008 je bilo na območju dolenjske regije testiranih 11.542 nosečnic na toksoplazmozo in 4729 nosečnic na HBV.
- Prekuženost nosečnic s toksoplazmozo v celotnem obdobju znaša 39,0 %.
- V prvem obdobju od leta 1995-2001 je prekuženost nosečnic s toksoplazmozo 49,0 %, v drugem obdobju od leta 2002-2008 pa 31,0 %.
- Prekuženost nosečnic s HBV v celotnem obdobju znaša 0,2 %.
- V prvem obdobju od leta 1995-2001 je prekuženost nosečnic s HBV 0,26%, v drugem obdobju od leta 2002-2008 pa 0,17 %.
- Prekuženost nosečnic s toksoplazmo in HBV se je v drugem obdobju (2002-2008) zmanjšalo.
- Prekuženost nosečnic s toksoplazmozo je v dolenjski regiji večja (31,0 %), kot v osrednje slovenski regiji – Ljubljana z okolico (23,9 %); obdobje od leta 2002-2007.

6. LITERATURA:

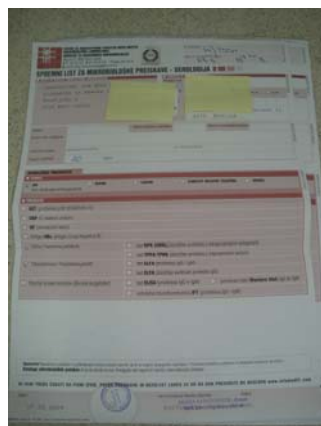
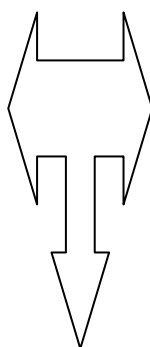
1. Logar J: Medicinska parazitologija. 1. natis, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1991: 45-63.
2. Logar J: Kongenitalna toksoplazmoza v Sloveniji. Zdravstveni vestnik, 1985; 54: 369-373.
3. http://en.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma_gondii (26.9.2009)
4. <http://en.wikipedia.org/wiki/Toxoplasmosis> (26.9.2009)
5. Stergar S, Kocjancic K, Šilc M: Primer toksoplazmoze pri nas. Zdravstveni vestnik, 1953; 22: 139-143.
6. Marolt-Gomišček M, Radšel-Medvešček A: Infekcijske bolezni. Založba Tangram, Ljubljana, 2002: 519-343.
7. Brdnik J: Pogostost akutne toksoplazmoze v Sloveniji. Diplomaska naloga, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana 2008.
8. Logar J, Marin J: Limfadenitis, pogosten pojav pri infekcijah s parazitom *Toxoplasma gondii* in virusom Epstein-Barr. Zdravstveni vestnik, 1987; 56: 95-97.
9. Uzunović-Kamberović S: Medicinska mikrobiologija. 1. natis, Sojnica-Štamparija, 2009; 909-1071.
10. Feldman H A: Epidemiology of toxoplasma infections. Epidemiology Rewiews, 1982; 4: 204-213.
11. Dubey J P, Beattie C P: Toxoplasmosis of animals and man. 1st ed. New York, CRC Press, 1988; 120-120.

23. <http://www.cdc.gov/hepatitis/B/bFAQ.htm#tests> (26.9.2009)
24. <http://www.cdc.gov/hepatitis/B/bFAQ.htm#prevention> (26.9.2009)
25. <http://www.cdc.gov/hepatitis/B/bFAQ.htm#pregnancy> (26.9.2009)
26. Alter MJ: »Epidemiology and prevention of hepatitis B«. Semin. Liver Dis. 23/1, 2003: 39–46. DOI:10.1055/s-2003-37583. PMID:12616449.
27. http://www.ivz.si/javne_datoteke/datoteke/1627-03_Nalezljive_bolezn_i_2007.pdf
(26.9.2009)
28. http://www.ivz.si/javne_datoteke/datoteke/1420-03_Nalezljive_bolezn_i_2006.pdf
(26.9.2009)
29. http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?doc=CNL_PRD_CPL_G_PRD_CLN_34
(26.9.2009)
30. http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?doc=CNL_PRD_CPL_G_PRD_CLN_32 (26.9.2009)
31. Villena I, King L, Ancelle T, Goulet V Thulliez P, Wallon M: Surveillance system of congenital toxoplasmosis in France. V: Toxoplasma centennial congress – from discovery to public health management, Rio de Janeiro, Brazil, 20-24 september 2008, Rio de Janeiro, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; 48-49.
32. http://www.ivz.si/javne_datoteke/datoteke/798-letnoporociloc2008.pdf

7. PRILOGE:

PRILOGA št. 1 : Slikovni prikaz postopka dela

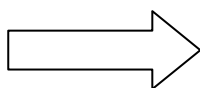
1. Serum preiskovanca ter ustrezna naročilnica.



2. Izbira ustreznega diagnostičnega seta in prenos kita iz seta na stojalo.



3. Pipetiranje 100 µL seruma preiskovanca iz epruvete v kit.



4. Prenos kitov in plastičnih pipet (nastavkov) na aparat ter izbira ustreznega testa oziroma programa in njihovo izvajanje na aparatu mini Vidas.



Cunk A.,

Prekuženost nosečnic s *T.gondii* in virusom hepatitisa B na področju Dolenjske v letih od 1995 do 2008

Dipl. delo., Fakulteta za farmacijo, Smer laboratorijska biomedicina, Ljubljana 2009

5. Po izvedbi testa nam računalnik avtomatsko natisne analizirane rezultate.

```
mini VIDAS Report
ZZV NOVU MESTO
Section: A
Completed: 06:26:55 22May09
Tech: AVSEC
T0X0 IgG II (TXG)
Ver: R5.3.0
Lot#: 091229-0
Standard used:
Completed: 11:41:12 14May09
RFV = 2287
Negative < 4 UI/ml
Equivocal >= 4 & < 8 UI/ml
Positive >= 8 UI/ml

Position: A1
Sample ID: 80-1269
Background: 87 RFV: 3306
Result: 189 UI/ml
Comment: Positive

Position: A2
Sample ID: 80-1271
Background: 89 RFV: 6
Result: 8 UI/ml
```