

Hematolojik Maligniteli Hastalarda Anti-*Toxoplasma* Antikorlarının Araştırılması

Ergün GÜLEŞÇİ¹, Müşerref TATMAN OTKUN²

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Bakteriyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı; ²Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne

ÖZET: Bu çalışmada lösemi ve lenfomalı 40'ar kişilik hasta ve kontrol grubunda İFA ve ELISA testi ile anti-*Toxoplasma* IgG ve IgM araştırıldı. Hastalarda İFA ve ELISA ile IgG seropozitiflikleri sırasıyla %67,5 ve %60, kontrol grubunda ise %60, %62,5 bulundu (hepsi için $p>0,05$). Her iki yöntemin uyumu yüksekti ($\kappa=0,89$). Her iki grupta da IgM pozitifliği saptanmadı. Hasta grubunda IgG pozitifliği bulunan 27 kişide reaktivasyon riski, IgG negatif bulunan 13 kişide ciddi seyirli olabilecek akut toxoplazmosis gelişme riski bulunmaktadır. Lösemi ve lenfomalı hastalarda tanı konulduğunda anti-toxoplasma antikorlarının araştırılması ve özellikle santral sinir sistemine ait patolojik bulguların varlığında direkt tanı yöntemlerine başvurulması uygundur.

Anahtar Sözcükler: *Toxoplasma gondii*, Hematolojik malignite, İFAT, ELISA

Investigation of Anti-*Toxoplasma* Antibodies in Patients with Hematological Malignancy

SUMMARY: Anti-*Toxoplasma* IgG and IgM antibodies were investigated using İFA and ELISA techniques in 40 patients with the diagnosis of leukemia or lymphoma and in a control group of 40 healthy persons. IgG seropositivity in the patient and control groups was found to be 67.5% and 60.0%, respectively, using İFA, and 60.0% and 62.5%, respectively, using ELISA ($p>0,05$ for all). The agreement of the methods was high ($\kappa=0,89$). Anti-*Toxoplasma* IgM antibody was not found in either of the groups. Twenty-seven individuals with IgG seropositivity in the patient group were under the risk of reactivation and 13 IgG seronegative individuals were under risk of acquiring severe primary toxoplazmosis. Anti-*Toxoplasma* antibodies should be screened in patients when leukemia or lymphoma is diagnosed, and direct detection methods should be applied especially in the patients who have signs indicating central nervous system involvement.

Key Words: *Toxoplasma gondii*, Hematological malignancy, İFAT, ELISA

GİRİŞ

Toxoplazmosis hayatın her döneminde ve hekimliğin her alanında karşılaşılan, günümüzde hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sağlık sorunu olan *Toxoplasma gondii*'nin oluşturduğu zoonotik bir hastalıktır. Genellikle asemptomatik veya hafif, özgül olmayan belirtilerle seyrettiğinden ve çoğunlukta kendiliğinden iyileştiğinden klinik tanısı zordur (6). Toxoplazmosis, enfeksiyonun bulaşma zamanı ve kişinin bağışıklık durumuna göre farklı klinik tablolar oluşturabilir. Bunlar akut enfeksiyon, konjenital enfeksiyon, oküler toxoplazmosis, latent enfeksiyon ve reaktivasyon şeklindedir (7).

Toxoplazmosis bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde, özellikle lösemi ve lenfomalı hastalarda yaygın ve şiddetli seyretmektedir (7). Bu hastalarda primer hastalıktan, uygulanan radyoterapi ve kemoterapi tedavilerinden dolayı bağışıklık sisteminin yetmezliğine bağlı olarak T lenfosit sayısında azalma ve fonksiyon bozukluğu, B lenfositlerinde haptene verilen cevapta zayıflama olur. Sonuçta bu hastalarda *T.gondii* enfeksiyonu reaktif olursa çoğunlukla santral sinir sistemine ait semptomlarla seyrederek (1).

Bu çalışmada lösemi ve lenfomalı hastalarda ELISA ve indirekt floresans antikor (İFA) testi ile IgG ve IgM antikorlarının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada İFA testi Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi (TÜTF) Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında, ELISA testi Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF) Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapıldı.

Geliş tarihi/Submission date: 24 Aralık/24 December 2004

Düzeltilme tarihi/Revision date: 03 Mart/03 March 2005

Kabul tarihi/Accepted date: 11 Mart/11 March 2005

Yazışma /Corresponding Author: Müşerref Tatman Otkun

Tel: (+90) (284) 236 16 54 Fax: (+90) (284) 236 16 54

E-mail: otkunm@trakya.edu.tr

Hasta grubu: TÜTF İç Hastalıkları Hematoloji Servisinde Aralık 2002 ile Ekim 2003 tarihleri arasında lösemi (akut lenfositik, akut miyeloid, kronik lenfositik, kronik miyeloid lösemi ve multipl miyeloma) veya lenfoma (Hodgkin veya non-Hodgkin) tanıları ile yatan ve bir kürden fazla kemoterapi ve/veya radyoterapi alan hastalardan oluşan 40 olguyu kapsamaktadır. Hastalara *T.gondii* bulaşına neden olabilecek tutum ve davranışlarını sorgulayan anket formu uygulandı.

Kontrol grubu: TÜTF hastanesinin çeşitli polikliniklerine başvuran toxoplazmosis, lösemi ve lenfoma şüphesi olmayan ve herhangi bir neden ile kemoterapi veya kortikosteroid tedavisi almayan 40 kişiyi kapsamaktadır. Kontrol grubundaki kişiler hasta grubu ile aynı cins ve yaş grubundan seçildi. Çalışma öncesi etik kuruldan çalışma onayı alındı.

IFA Testinin Uygulanması: Euroimmun Toxoplasma IgG ve IgM kitleri (Medizinische Labordiagnostika GmbH, Almanya) kullanıldı, testler firmanın önerilerine göre yapıldı. Teste 1/16 sulandırım ile başlandı ve pozitif serumların ileri sulandırımalarında negatif sonuç elde edilinceye kadar devam edildi.

ELISA için *T.gondii* eriyik antijeninin hazırlanması: Fare periton sıvısından elde edilen *T.gondii* takizoitleri PBS ile sulandırıldıktan sonra 2000 devirde 10 dk santrifüj edildi. Sediment üzerine 15 ml 0,15 M NaCl ilave edilerek tekrar santrifüjlendi. Bu sedimentteki takizoitler hemositometre ile sayıldıktan sonra, her bir milyon *T.gondii* için 0,5 ml %1'lik SDS'den ilave edildi ve 90 dk süre ile ara ara çalkalanarak takizoitlerin erimesi sağlandı. SDS'in uzaklaştırılması için +4°C'de, 10000 devirde 10 dk santrifüjden sonra eriyik antijen içeren üst sıvı alındı. Spektrofotometre ile 260 ve 280 nm dalga boylarında antijenin protein konsantrasyonu ölçüldü.

ELISA plaklarının antijen ile kaplanması: Hazırlanan eriyik antijeni PBS ile 1/100 oranında sulandırılarak ELISA plaklarının her çukuruna 100 µl konuldu. Plakların üzerleri parafilm ile kapatılıp bir gece +4°C'de bekletildi. Ertesi gün plaklardaki antijenin fazlası dökülerek, tekrar parafilm ile kapatıldı ve kullanılmaya kadar +4°C'de buzdolabında saklandı.

ELISA Testinin uygulanması: Mikroplağın çukurlarında antijen ile kaplanmamış bölgelerin de kaplanması için çukurlara 150 µl PBS-CB (0.01 M NaOH, %0.5 kazein, pH:7.4) konularak, bir saat oda ısısında bekletildi (bloking işlemi). Serumlar (negatif, pozitif kontrol ve test) sulandırma plaklarında IgG için 1/256, 1/512 ve 1/1024 titrelerde, IgM için 1/64, 1/128 ve 1/256 titrelerde PBS-CB ile sulandırıldı. Kazein buffer, bloking yapılan plaktan silkelenerek döküldükten sonra serum dilüsyonlarından 100 µl antijenli plaklara aktarıldı ve üzeri kapatılarak bir saat karıştırıcıda inkübe edildi. Sonra üç kez otomatik ELISA yıkayıcısında PBS-T (%0.05 tween 20 eklenmiş PBS) ile yıkayıp silkelendi. Her bir çukura IgM için 1/5000 ve IgG için 1/10000 oranlarında PBS ile sulandırılan alkalin fosfataz ile işaretli anti-insan IgG/IgM konjugeden 100 µl konuldu. Bir saat inkübasyondan sonra üç kez yıkama yapıldı. Diethanolamin buffer (0.1 M Diethanolamin, 1 mM

MgCl₂, pH:9.8) ve 1/10000 p-nitrophenyl phosphate ilavesi ile hazırlanan substrat, plakların her çukuruna 100 µl konularak oda ısısında 30–60 dk karanlıkta bekletildikten sonra oluşan renk değişikliği ELISA okuma cihazı (Bio-tek instruments, inc. ABD, Elx 808 Ultra Microplate Reader) ile değerlendirildi. Serumların çalışması negatif sonuç elde edilene kadar ileri sulandırımalarıyla tekrarlandı.

İstatistiksel değerlendirme: MINITAB release 13 (Trakya Üniversitesi, Lisans no wcp: 331,00197) programı kullanılarak yapıldı. ELISA ve IFA testlerinin uyumunun karşılaştırılmasında kappa testi, IFA testi ile IgG (+) hastalardaki semptom ve bulguların değerlendirilmesinde Fisher'in kesin ki-kare testi, IFA testi IgG titresi ile hastalardaki hepatomegali, splenomegali ve lenfadenopati varlığının değerlendirilmesi Mann-Whitney U testi ve hasta ile kontrol grubunun yaşlarının karşılaştırılmasında T testi kullanıldı.

BULGULAR

Hematolojik maligniteli hastaların yaş ortalaması 53,7±15,9 (min; 16, max; 76) ve kontrol grubundaki kişilerin yaş ortalaması 54,05 ±16,4 (min; 18, max; 76) idi. Her iki grup yaş ortalamaları açısından benzerdi (p>0.05).

Hasta ve kontrol grubundaki kişilerde toksoplazma ile karşılaşma oranı her iki grupta ve cinste farksızdı (p>0.05). Her iki grupta pozitif IgM saptanmadı. ELISA ile IFA yöntemleri arasındaki uyum yüksek bulundu (kappa= %89) (Tablo 1).

Lösemili 25 hastanın 16'sında, lenfomalı 15 hastanın 11'inde IFAT ile anti-toxo IgG (+) olarak saptandı. Lösemi ve lenfomalı olgularda *T. gondii* ile karşılaşma yönünden fark bulunmadı. Malignite süresiyle anti-toxo IgG (+)'lik oranı ve IgG titreleri ilişkisizdi (p>0,05).

Olguların kedi besleme, çiftçilikle uğraşma, çiğ et yeme gibi epidemiyolojik özelliklerindeki değişiklikler, semptom ve bulgularının varlığı ile *T.gondii* ile karşılaşma arasında ilişki bulunmadı (p>0,05). Araştırmamızdaki 40 olgunun 25'inde kan nakli anamnezi vardı ve kan nakli yapılan grup ile yapılmayanlar arasında *T.gondii* ile karşılaşma yönünden fark yoktu (p>0,05).

Hasta grubunda dört olguda 1/32768, bir olguda 1/16384, bir olguda 1/8192, dört olguda 1/2048 ve bir olguda 1/1024 titrelerde olmak üzere 11 olguda yüksek titrede IgG pozitifliği elde edildi. Kontrol grubunda 1/8192 titrede bir, 1/2048 titrede dört, 1/1024 titrede bir olmak üzere altı kişide yüksek titrede pozitiflik saptandı. Ancak her iki gruptaki kişilerde toxoplazmosis kliniği yoktu. Hasta ve kontrol grubunda yüksek titrede pozitiflik saptanması farksız bulundu (p>0.05).

Çalışma tamamlandığında 40 kişilik hasta grubundan 15 kişinin öldüğü tespit edildi, ileri tetkikleri yapılamadığı için reaktivasyon araştırılmadı. Bu 15 kişinin yedisinde IFA testi ile IgG titreleri 1/1024 ve üzerinde idi, ancak yüksek titredeki pozitiflik ile ölüm arasında ilişki bulunmadı (p>0,05).

Tablo 1. Hasta ve kontrol gruplarının test sonuçlarına göre dağılımı

	Hasta		Kontrol	
	Kadın n	Erkek n	Kadın n	Erkek n
ELISA IgG (+)	10	14	11	13
IgG (-)	6	10	5	11
Toplam	16	24	16	24
IFAT IgG (+)	12	15	11	14
IgG (-)	4	9	5	10
Toplam	16	24	16	24

TARTIŞMA

İnsan ve diğer memelileri infekte edebilen *T.gondii*'nin tanısı çoğunlukla serolojik tetkiklere dayanmaktadır. Çünkü klinik ve/veya histolojik tanısı zor olmakta ve sıklıkla yanlış fikir vermektedir (7, 15).

Toxoplasmosis açısından bağışıklık sistemi baskılanmış olgular, özellikle hematolojik malignitesi olanlar hem primer hastalıklarından dolayı hem de verilen kemoterapi ve/veya radyoterapiden dolayı belirgin risk altındadırlar. Bu olgularda kemoterapi ve/veya radyoterapi sırasında enfeksiyonun alınması latent seyir olasılığına fırsat vermeksizin hayati organların tutulumuna neden olabileceği gibi, daha önceden alınmış ve latent seyreden enfeksiyonun reaktivasyonuna da yol açabilmektedir (11).

T.gondii IgG seropozitifliğinin olguların yaşlarının artması ile paralellik gösterdiği bildirilmiştir (12, 16). ABD'de *T.gondii* ile karşılaşma oranları; 10–19 yaşlarında %5–30, 50 yaş üzerinde %10–67 olarak saptanmıştır (9). Bizim çalışmamızda yaş ortalaması 53,7 (\pm 15,9) ve *T.gondii* ile karşılaşma oranı IFA yöntemi ile %67,5 olarak bulunmuş olup literatürlerdeki oranlar yönünden benzerdir. Edirne'de daha önce doğurganlık çağındaki kadınlarda (yaş ortalaması 30,6 \pm 8,4 (min; 15, max; 45) yapılmış olan çalışmada seropozitiflik oranı %30,6 olarak bildirilmiştir (10). Kırığı'nın bu çalışmasına göre oranlarımızın yüksek çıkmasının nedeni, olgularımızın yaş ortalamasının yüksek olmasıdır.

Bizim çalışmamızdakine benzer şekilde yapılan diğer çalışmalarda *T.gondii* ile karşılaşma yönünden cinsiyetler arasında fark olmadığı bildirilmektedir (5, 8).

Toxoplasmosis serolojik tanısında ELISA ve IFA yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir (2,3). Çalışmamızda kullandığımız ELISA ve IFA testlerinin uyumunun yüksek olduğu görülmüştür.

Hökelek ve ark.'ı (8) lösemi ve lenfomalı olgularda yaptıkları çalışmada anti-toxo IgM seropozitifliği saptamamışlar, Bitirgen ve ark.'ı (4) lösemi ve lenfomalı olgularda yaptıkları çalışmada lösemili olgularda %4,3 ve lenfomalı olgularda %6 oranında anti-toxo IgM (+)'liği saptamışlardır. Bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde kullanılan yöntemin hassasiyeti-

ne bağlı olarak anti-toxo IgM pozitifliği yıllarca devam edebileceği için tanıda tek başına yeterli değildir (3).

T.gondii'nin bulaşma yollarından biri de kan naklidir (5, 13). Parazitin lökosit içinde yaşadığı bilindiğinden, tam kan naklinde latent fazdaki paraziteminin varlığının bir risk oluşturduğu ve bu durumun özellikle seronegatif immun yetmezlikli alıcılarda önemli bir sorun olduğu bildirilmektedir (5). Hematolojik maligniteli olgular hastalıkları süresince çoğu kez kan ve kan ürünleri nakline ihtiyaç duymaktadırlar. Hematoloji hastaları gibi bağışık yanıtı bozuk olgular için anti-*T.gondii* antikorlarının araştırılmasının yaşam kalitesi ve süreleri için faydalı olacağı kanısındayız.

Babür ve ark.'ı (2) toxoplasmosisin serolojik tanısında seçilecek yönteme karar verilirken, laboratuvar koşulları, hastanın klinik durumu ve enfeksiyonun süresinin de göz önünde bulundurulmasını ve akut enfeksiyon durumunda tek yöntem ile yetinilmemesini, özellikle hastalığın süresinin belirlenmesinde anti-toxo IgM ve/veya IgG avidite testlerinin sonuçlarının birlikte değerlendirilmesini önermektedirler. Bağışık sistemi baskılanmış hastalarda, antikor yanıtı da baskılandığından serolojik tanının zorluğu bilinmektedir (3). Bu hastalarda antikor düzeyleri çok yüksek veya negatif olabilir. Anti-*Toxoplasma* IgG pozitifliğinin ancak reaktivasyon riskini göstereceği ve tanıda direkt tanı yöntemlerinin tercih edilmesi önerilmektedir. Bu hastalarda BOS, göz sıvısı ve kan gibi vücut sıvılarında veya etkilenmiş dokularda PCR, histolojik yöntemler ve hücre kültürü ile doğrudan etkeni saptamanın daha hassas olduğunu bildirmişlerdir. İmmun sistemi baskılanmış hastalardaki reaktivasyonun özellikle santral sinir sistemini etkilediği ve santral sinir sisteminin etkilendiğini gösteren bulgular varlığında toxoplazmosisin ayırıcı tanıda düşünlmesi gerektiğini, ancak beyin dokusunun incelenmesinin latent enfeksiyon varlığı nedeni ile akut enfeksiyondan ayırımı sağlamayacağını belirtmişlerdir (14). Bu nedenle herhangi bir titredeki pozitiflik reaktivasyon riskinin varlığını ortaya koyma yönünden önemlidir.

Hasta grubunda IgG pozitifliği bulunan 27 kişide reaktivasyon riski, IgG negatif bulunan 13 kişide ciddi seyirli olabilecek akut toxoplazmosis gelişme riski bulunmaktadır. Lösemi ve lenfomalı hastalarda tanı konulduğunda anti-Toxoplasma antikorlarının araştırılması ve özellikle santral sinir sistemine ait patolojik bulguların varlığında direkt tanı yöntemlerine başvurulması uygundur.

KAYNAKLAR

1. Altıntaş K, 1983. Hodgkin ve Non-Hodgkin Lenfomalı vakalarda Toksoplazmosis insidansı. *Mikrobiyol Bül*, 17: 251–256.
2. Babür C, Kılıç S, Taylan ÖA, Esen B, 2002. Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığında 1995–2000 yılları arasında toxoplazmosis ön tanılı hastalarda Toxo-EIA IgG, IgM ile Sabın-Feldman Dye Test sonuçlarının karşılaştırılması. *T Parazit Derg*, 26(2): 129–133.
3. Badur S, 1990. Toksoplazmozun serolojik tanısı. *Klinik Derg*, 3(1): 3–6.

4. **Bitirgen M, Tuncer İ, Odabaşı D, Sardeş OS, Günaydın M, Çiftçi D, Şengil Z, Ecirli Ş**, 1989. Lösemi ve lenfomalı hastalarda Toksoplazma IgM ve IgG antikorları seropozitifliği. *S.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 5(2): 111–118.
5. **Dağı H, Aksoy Ü, Bayram DS, Ertabaklar H, Çakıroğlu TA, Gürüz Y**, 2000. Kan donörlerinde Toksoplazma gondii antikorlarının ELISA ve IFA yöntemi ile aranması. *T Parazitol Derg.*, 24(3): 222–224.
6. **Dubey JP**, 1998. Toxoplasmosis. Cox FEG, Kreier JP, Walkelin D. eds. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbiol Infection*, vol 5. 9th. ed. New York: Oxford University Pres. Inc. p. 303–316.
7. **Frenkel JK**, 1988. Toxoplasmosis. Strickland GT. ed. *Hunter's Tropical Medicine*. 7th. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. p. 658–669.
8. **Hökelek M, Uyar Y, Günaydın M, Tokuç MS, Eroğlu C**, 2001. Kemoterapi uygulanan kanser hastalarında Toksoplazma antikorlarının araştırılması. *T Parazitol Derg*, 25(3): 217–219.
9. **Kasper LH**, 2001. Toxoplasma Infection. Brounwald E, Hauser SL, Fauci AS, Longo DK, Casper DL, Jameson JL. eds. *Harison's Principles of Internal Medicine*. 15th. ed. New York: Mc Graw-Hill Medical Publishing Devison. p. 1222–1227.
10. **Kırağı D**, 1997. Doğurganlık çağı kadınlarda IFA yöntemi ile anti-Toksoplazma IgG ve IgM antikorlarının araştırılması. Doktora tezi. T.Ü. Tıp Fakültesi Aile Hekimliği Anabilim Dalı, Edirne.
11. **Kuman HA, Altıntaş N, Üstün Ş, Gürüz AY**, 1995. Toksoplazmoz. Özcel MA. ed. *İmmun yetmezlikte önemi artan parazit hastalıkları*. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi. p. 137–164.
12. **Kuman HA, Altıntaş N**, 1996. *Protozoon Hastalıkları*. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi. p. 112–142.
13. **Montoya JG, Remington JS**, 2000. *Toxoplasma gondii*. Mandell GL, Benette JE, Dolin R. (eds). *Principles and practice of infectious diseases*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. p. 2858–2882.
14. **Montoya JG, Liesenfeld O**, 2004. Toxoplasmosis. *Lancet*, 363(12): 1965–1976.
15. **Unat EK, Yücel A, Atlas K, Samastı M**, 1991. *Unat'ın Tıp Parazitolojisi*. 4. baskı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Cerrah Paşa Tıp Fakültesi Yayınevi. p. 601–620.
16. **Wilson M, Jones JL, Mc Auley JB**, 2003. *Toxoplasma*. Muray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenenbaum RH. eds. *Manuel of Clinical Microbiology*. 8th. ed. Washington: ASM Pres. p.1970–1980.