

Lucyna Holec-Gąsior,
Dorota Drapała

Katedra Mikrobiologii, Wydział Chemiczny,
Politechnika Gdańska

Awidność przeciwciał IgG jako ważny test diagnostyczny w rozpoznawaniu aktywnej toksoplazmozy — stan obecny i nowe możliwości

IgG avidity as important diagnostic test for recognition acute toxoplasmosis — current status and new possibilities

STRESZCZENIE

W artykule opisano problem diagnostyki toksoplazmozy ze szczególnym uwzględnieniem metody awidności przeciwciał klasy IgG. Test oznaczania awidności przeciwciał IgG swoistych dla *T. gondii* jest użytecznym wskaźnikiem serologicznym toksoplazmozy, który w wielu przypadkach na podstawie pojedynczego badania surowicy pacjenta pozwala potwierdzić lub wykluczyć aktywną postać choroby. W pierwotnej, aktywnej toksoplazmoziozie przeciwciała klasy G wskazują niską awidność, natomiast IgG o wysokiej awidności są wykrywane w przewlekłym zarażeniu *T. gondii*. W pracy ponadto przedstawiono istotne zagadnienia obejmujące aktualnie prowadzone badania naukowe, które dotyczą zastosowania w teście oznaczania awidności przeciwciał IgG antygenów rekombinantowych pasożyta.

Forum Medycyny Rodzinnej 2012, tom 6, nr 2, 74–81

słowa kluczowe: awidność przeciwciał, *Toxoplasma gondii*, serodiagnostyka toksoplazmozy, antygeny rekombinantowe

ABSTRACT

The article describes the problem of toxoplasmosis diagnosis with particular allowing an immunoglobulin G avidity test. An assay measuring the avidity of *T. gondii*-specific IgG is a useful serological indicator of toxoplasmosis which in many cases allows on the basis of single serum sample testing to confirm or exclude acute infection. IgG antibodies against *T. gondii* produced in the recent primary toxoplasmosis are of low-

Adres do korespondencji:

dr inż. Lucyna Holec-Gąsior
Katedra Mikrobiologii, Wydział Chemiczny,
Politechnika Gdańska
ul. Narutowicza 11/12, 80–233 Gdańsk
tel.: (58) 347 24 06
faks: (58) 347 18 22
e-mail: holec@pg.gda.pl

avidity while IgG antibodies with high-avidity are detected in the chronic infection. Moreover in this paper, important topics of current research which concern usage of parasite recombinant antigens for IgG avidity test were presented.

Forum Medycyny Rodzinnej 2012, vol 6, no 2, 74–81

key words: avidity of antibodies, *Toxoplasma gondii*, serodiagnosis of toxoplasmosis, recombinant antigens

WSTĘP

Toxoplasma gondii jest obligatoryjnym, wewnątrzkomórkowym pasożytem zwierząt endotermicznych i człowieka, należącym do typu Apicomplexa. Zdolność *T. gondii* do zasiedlania wszystkich komórek jądrzastych, kosmopolityzm oraz wysoki odsetek zarażeń żywicieli sprawiły, że pierwotniak ten odniósł bardzo duży sukces ekologiczny, który jest wynikiem jego szczególnych cech biologicznych. Do cech tych należy zaliczyć przede wszystkim zdolność pasożyta do aktywnej penetracji i zasiedlania komórek żywiciela z wytworzeniem bezpiecznej niszy (wakuoli pasożytniczej), manipulowanie procesem apoptozy oraz indukowanie zmian reaktywności immunologicznej żywiciela [1]. Cykl życiowy pasożyta obejmuje proces rozmnażania płciowego, który zachodzi u żywicieli ostatecznych (zwierzęta z rodziny kotowatych *Felidae*, w tym koty domowe), oraz bezpłciowego, występującego u żywicieli pośrednich (ptaki i ssaki, w tym ludzie). Rozwój płciowy *T. gondii* prowadzi do powstania oocyt, które są wydalane wraz z kałem zarażonego zwierzęcia do środowiska zewnętrznego, a następnie przekształcane w sporocysty. Z kolei u żywiciela pośredniego dochodzi do namnożenia tachyzoitów (tzw. „agresywnych”, szybko dzielących się form pasożyta), które atakują i niszczą komórki gospodarza, rozprzestrzeniają się do odległych narządów i tkanek, a następnie (u osób z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym) ulegają konwersji w formy spoczynkowe — bradyzoity, zam-

knięte w cystach tkankowych, zlokalizowanych głównie w ośrodkowym układzie nerwowym i mięśniach gospodarza [2]. Przemiana „aktywnych” tachyzoitów w „uśpione” bradyzoity odgrywa kluczową rolę w przejściu fazy wczesnej choroby w przewlekłą oraz odpowiada za jej nawrót (tzw. reinwazję toksoplazmozy), podczas której bradyzoity wydostają się z cyst tkankowych i ulegają konwersji w tachyzoity.

Szacuje się, że zarażonych pasożytem jest około 5×10^8 ludzi na świecie. W populacji ludzkiej częstość zarażenia (monitorowana częstością występowania specyficznych przeciwciał antytoksoplazmowych) jest uzależniona od bardzo wielu czynników (klimatu, sposobu odżywiania oraz warunków sanitarno-epidemiologicznych) i wzrasta wraz z wiekiem. Człowiek najczęściej zaraża się pasożytem na drodze pokarmowej poprzez spożycie zanieczyszczonych pokarmów zarówno pochodzenia zwierzęcego (surowego lub niedogotowanego mięsa zawierającego cysty tkankowe *T. gondii*), jak i roślinnego (warzywa i owoce zanieczyszczone kałem kota). Możliwe jest także zarażenie przez uszkodzoną skórę oraz przez spójówki. Bardzo istotną drogą zarażenia jest droga przezłożyskowa, gdyż prowadzi ona do groźnej postaci choroby — toksoplazmozy wrodzonej, która rozwija się u płodu [2]. Toksoplazmoza nabyta u ludzi z prawidłowo funkcjonującym układem immunologicznym przebiega w ponad 80% bezobjawowo. Łagodne objawy kliniczne przypominające grypę występują jedynie u niewielkiego od-



Szacuje się, że zarażonych pasożytem jest około 5×10^8 ludzi na świecie



Obecności pasożyta w organizmie nie towarzyszą typowe, charakterystyczne objawy pozwalające ustalić rozpoznanie toksoplazmozy wyłącznie na podstawie klinicznego obrazu choroby

setka pacjentów. Ponadto inwazja *T. gondii* może być szczególnie groźna dla osób z obniżoną odpornością (tj. chorych na AIDS, osób z nowotworami lub pacjentów po przeszczepach przyjmujących leki immunosupresyjne). U osób z tych grup toksoplazmoza może doprowadzić do poważnych zmian układowych, a nawet do zgonu. Toksoplazmoza wrodzona, będąca następstwem pierwotnej inwazji *T. gondii* u kobiet w czasie ciąży lub w okresie krótko poprzedzającym zapłodnienie, jest najcięższą postacią choroby, która w zależności od okresu zarażenia płodu może ujawnić się w szerokim spektrum objawów klinicznych. Im w późniejszym okresie ciąży choruje matka, tym krótszy czas jest potrzebny do zarażenia płodu, ale stopień powikłań jest odwrotnie proporcjonalny do okresu ciąży, w którym nastąpiło zarażenie u matki. Jeżeli do zarażenia doszło do 12. tygodnia ciąży, może to skutkować opóźnieniem wzrostu wewnątrzmacicznego, a nawet obumarciem płodu i poronieniem. Po wniknięciu komórek *T. gondii* do płodu najpierw następuje inwazja uogólniona, którą stopniowo zaczynają ograniczać przeciwciała przenikające przez łożysko od immunokompetentnej matki. Pasożyt osiedla się następnie w narządach i tkankach nabywających najpóźniej swoistą odporność, tj. w mózgu i siatkówce, gdzie powstaje stan przewlekłej inwazji aktywnej. U takich noworodków stwierdza się klasyczną triadę objawów Sabina-Pinkertona obejmującą: zwapnienie siatkówki i naczyńówki, wodogłowie i małogłowie oraz zwapnienie śródczaszkowe. Ponadto aż 75–90% noworodków zarażonych pasożytem w późniejszym okresie ciąży rodzi się pozornie zdrowa. W takich przypadkach choroba może ujawnić się później (nawet w wieku młodzieńczym lub dojrzałym) jako zaburzenia psychiczno-ruchowe i/lub zaburzenia wzroku. Ze względu na fakt, że ryzyko zarażenia płodu jest duże, a skutki poważne, każdą kobietę ciężarną powinno się kierować na bada-

nia diagnostyczne pozwalające potwierdzić lub wykluczyć aktywną toksoplazmozę.

LABORATORYJNE METODY ROZPOZNAWANIA TOKSOPLAZMOZY

Obecności pasożyta w organizmie nie towarzyszą typowe, charakterystyczne objawy pozwalające ustalić rozpoznanie toksoplazmozy wyłącznie na podstawie klinicznego obrazu choroby. Z tego względu w rozpoznawaniu zarażenia *T. gondii* bardzo ważnym elementem jest odpowiednio prowadzona diagnostyka laboratoryjna. Ponadto prawidłowe rozpoznanie toksoplazmozy jest nieodzownym warunkiem odpowiednich decyzji dotyczących leczenia i zapobiegania tej chorobie. Ogólnie metody służące do rozpoznania zarażenia *T. gondii* można podzielić na bezpośrednie i pośrednie. Pierwsze z nich dotyczą wykrycia i izolacji całego pasożyta lub jego antygeny, podczas gdy drugie polegają na badaniu reakcji odpornościowej organizmu (zarówno humoralnej, jak i komórkowej).

Obecność w organizmie pacjenta *T. gondii* można wykryć, stosując badania mikroskopowe, wykorzystujące preparaty barwne np. metodą May-Grünwalda lub Giemzy, które charakteryzują się ograniczoną czułością. Z tego względu wykrywanie pasożyta z użyciem tej metody ma niewielkie znaczenie diagnostyczne. Zdecydowanie skuteczniejsze jest stosowanie metody bezpośredniej immunofluorescencji z wykorzystaniem znakowanych przeciwciał monoklonalnych. Ponadto w diagnostyce (np. toksoplazmozy wrodzonej) coraz powszechniej stosuje się metodę łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*) [3]. Interpretacja wyników uzyskanych z wykorzystaniem tej techniki napotyka niekiedy trudności, ponieważ w niektórych przypadkach nie można jednoznacznie ocenić, czy dodatni wynik badania jest odzwierciedleniem czynnego procesu choroby, czy np. efektem eliminowania z leczonego organizmu unie-

czynionych pasożytów. Metody bezpośrednie pozwalają wykryć obecność pasożyta w takich materiałach, jak: płyn owodniowy, krew płodu, łożysko, krew pępowinowa. Z tego powodu badanie to głównie dotyczy osób hospitalizowanych w klinice położniczej i ma na celu potwierdzenie lub wykluczenie toksoplazmozy wrodzonej.

Badania serologiczne, będące podstawą współczesnej diagnostyki toksoplazmozy, polegają na wykryciu w surowicy lub płynach ustrojowych osób zarażonych pasożytem specyficznych przeciwciał anti-*T. gondii* [4]. Duże znaczenie diagnostyczne mają immunoglobuliny klasy G, które są syntetyzowane w organizmie żywiciela w największej ilości, oraz przeciwciała klasy IgM i IgA uznawane za wskaźniki tzw. ostrej fazy choroby, szczególnie istotne w przypadku serodiagnostyki toksoplazmozy wrodzonej. Dynamika przeciwciał klasy IgM jest zróżnicowana i zależy od układu immunologicznego danego pacjenta, z tego względu immunoglobuliny te niekiedy mogą być wykrywane w surowicach osób z przewlekłą fazą choroby [5]. W tabeli 1 przedstawiono rodzaje testów serologicznych powszechnie wykorzystywanych w diagnostyce toksoplazmozy. W testach tych do wykrywania specyficznych przeciwciał anti-*T. gondii* stosuje się różne preparaty antygenowe. Antygeny pasożyta uzyskiwane są z tachyzoitów otrzymanych z płynu otrzewnowego zarażonych myszy lub z kultur tkankowych *in vitro*. Jest to, przygotowana w odpowiednich proporcjach, mieszanina antygenów cytoplazmatycznych i błonowych. Preparat taki powszechnie nazywa się tzw. poliwalentnym antygenem natywnym (TLA, *Toxoplasma lysate antigen*).

Analizując dostępne metody stosowane w diagnostyce toksoplazmozy, można stwierdzić, że brak dotychczas techniki idealnej o uniwersalnym charakterze. Każda z opracowanych metod posiada zarówno zalety, jak i wady. Z tego względu bardzo ważna jest umiejętność odpowiedniego wyboru

metody adekwatnej do postaci klinicznej toksoplazmozy i stanu odporności badanej osoby.

AWIDNOŚCI PRZECIWCIAŁ IGG W SERODIAGNOSTYCE TOKSOPLAZMOZY

W latach 90. XX wieku do serodiagnostyki toksoplazmozy wprowadzono test oznaczania awidności przeciwciał klasy G swoistych dla *T. gondii*. Test ten pozwala na ustalenie fazy zarażenia na podstawie oznaczenia siły wiązania przeciwciał IgG z antygenami pasożyta [6–8].

Termin awidność oznacza wypadkową sił oddziałujących pomiędzy całym cząsteczkami przeciwciał i antygenem pasożyta, uwzględniając przede wszystkim ich wartościowość oraz inne czynniki (np. wielkość i kształt) [9, 10]. We wczesnej fazie inwazji przeciwciała swoiste dla *T. gondii* charakteryzują się słabą siłą wiązania antygenów. Powstające kompleksy antygen–przeciwciała są utrzymywane głównie dzięki wiązaniom wodorowym, które łatwo ulegają rozerwowaniu pod wpływem mocznika występującego w buforze stosowanym w teście do odpłukiwania nadmiaru reagentów [8, 11]. Trwające zarażenie stymuluje układ immunologiczny gospodarza. Wytwarzane w dużych ilościach przeciwciała IgG cechują się coraz większą siłą wiązania z antygenem (tzw. wysoką awidnością). Powstałe kompleksy stają się stabilne w obecności mocznika dzięki siłom elektrostatycznym, oddziaływaniom hydrofobowym, siłom Van der Waalsa i wiązaniom wodorowym. Czas potrzebny na przejście z niskiej do wysokiej awidności wynosi około 12–16 tygodni, zatem przeciwciała o wysokiej awidności występują w fazie przewlekłej zarażenia, gdy pasożytów nie ma już w układzie sercowo-naczyniowym, a znajdują się w tkankach gospodarza w postaci cyst [8, 11].

Test oznaczenia awidności IgG swoistych dla *T. gondii*, po przeprowadzeniu innych oznaczeń (np. określeniu miana IgG oraz



Badania serologiczne, będące podstawą współczesnej diagnostyki toksoplazmozy, polegają na wykryciu w surowicy lub płynach ustrojowych osób zarażonych pasożytem specyficznych przeciwciał anti-*T. gondii*

”
Wysoka awidność IgG
oraz brak wczesnych
markerów aktywnego
zarażenia (przeciwciała
klasy M i/lub A)
przemawiają za
przewlekłą
toksoplazmozę

”
Niska awidność dużych
stężeń IgG oraz
równoczesna obecność
przeciwciała klasy M i A
pozwalają podejrzewać
aktywną toksoplazmozę

Tabela 1

Charakterystyka testów serologicznych stosowanych w diagnostyce toksoplazmozę

Metoda	Zalety	Wady
SFDT (Sabin-Feldman Dye Test)	Wysoka czułość i swoistość Metoda referencyjna (badanie odwoławcze) Wykrywanie wczesnych przeciwciał Powtarzalność wyników	Brak różnicowania klas przeciwciał Konieczność pracy z żywym pasożytem Konieczność stosowania świeżego dopełniacza
Aglutynacja bezpośrednia	Łatwość odczytu Duża powtarzalność w przypadku świeżego zarażenia pasożytem	Niska czułość wykrywania przeciwciał śladowych Wysokie miano IgG może maskować obecność IgM
ISAGA (Immuno-sorbent Agglutination Assay)	Wykorzystanie metody adsorpcji przeciwciał eliminuje interferencję czynnika reumatoidalnego	Odczyt wizualny Metoda półilościowa
Test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	Wysoka czułość i swoistość Możliwość automatyzacji Obiektywność odczytu Oznaczanie miana przeciwciał każdej klasy Przeliczanie miana przeciwciał na jm./ml	Konieczna aparatura (czytnik mikroplitek) Jakość testu zależy od przygotowania antygeny
IFA (Immuno-Fluorescent Assay)	Wysoka czułość i swoistość Oznaczenie miana przeciwciał każdej klasy Niska cena badania Przeliczanie miana przeciwciał na jm./ml	Konieczna aparatura (mikroskop) Możliwość uzyskania wyników fałszywie dodatnich Odczyt wizualny
ELFA (Enzyme-Linked Fluorescent Assay)	Wysoka czułość i swoistość Oznaczenie miana przeciwciał każdej klasy Możliwość automatyzacji Metoda przydatna przy porównaniu surowicy matki i surowicy z krwi pępowinowej	Konieczna aparatura

IgM), w wielu przypadkach pozwala potwierdzić lub wykluczyć aktywną toksoplazmozę. Badanie to powinno się więc stosować w diagnostyce choroby jako uzupełnienie innych metod badawczych [5, 6, 12]. Wysoka awidność IgG oraz brak wczesnych markerów aktywnego zarażenia (przeciwciała klasy M i/lub A) przemawiają za przewlekłą toksoplazmozę, a więc pozwalają na zrezygnowanie z badania kolejnych prób surowicy. Niska awidność dużych stężeń IgG oraz równoczesna obecność przeciwciała

klasy M i A pozwalają podejrzewać aktywną toksoplazmozę. Natomiast przypadki średnich stężeń IgG o niskiej awidności, wątpliwa obecność IgM i obecność lub brak IgA wymagają badania serologicznego dalszych próbek surowicy i obserwacji dynamiki przeciwciał [12]. Powodem tego jest fakt, że przeciwciała w niektórych przypadkach mogą dojrzewać długo, dlatego niska awidność nie zawsze świadczy o wczesnej fazie choroby, a jedynie o jej podejrzeniu, natomiast wysoka awidność jest potwierdzeniem przewle-

kłej toksoplazmozy [13–15]. Ponadto oznaczenie awidności przeciwciał IgG ma pewne ograniczenia. Test ten jest bezużyteczny w przypadku reinwazji choroby, związanej z reaktywacją pasożyta z formy „uśpionych” bradyzoitów w „aktywne” tachyzoity, która może pojawić się m.in. u chorych na AIDS [16]. W organizmie zarażonej osoby występują już bowiem komórki pamięci charakteryzujące się wysoką awidnością. Ponadto przydatność tego testu jest ograniczona również w przypadku badania wrodzonej postaci toksoplazmozy u nowo narodzonych dzieci, ponieważ mierzona awidność może pochodzić od matczynych przeciwciał IgG, które są przekazywane przez łożysko.

NOWE MOŻLIWOŚCI W OZNACZANIU AWIDNOŚCI PRZECIWCIAŁ

Obecnie wiele firm na całym świecie oferuje różne zestawy do oznaczenia awidności przeciwciał IgG swoistych dla *T. gondii*. Dostępnych jest również kilka zautomatyzowanych systemów, które w szybki i prosty sposób pozwalają określić tzw. stopień (podawany w procentach) lub indeks awidności (inaczej zwany współczynnikiem awidności). Zarówno testy manualne, jak i automatyczne w reakcji ze specyficznymi przeciwciałami antytoksoplazmozowymi wykorzystują zazwyczaj antygen natywny *T. gondii* (TLA). Alternatywą dla takiego preparatu antygenowego jest zastosowanie antygenów „nowej generacji”, tj. rekombinantowych białek antygenowych pasożyta otrzymywanych z wykorzystaniem nowoczesnych metod biologii molekularnej i inżynierii genetycznej. Preparaty takie stanowią nową grupę odczynników immunodiagnostycznych, które charakteryzuje wiele zalet w porównaniu ze stosowanym obecnie TLA. W ciągu ostatnich kilkunastu lat, a w szczególności w ostatniej dekadzie, różne antygeny rekombinantowe były głównie testowane pod kątem wykrywania specyficznego przeciwciał

antytoksoplazmozowych w surowicach pacjentów z wczesną i przewlekłą fazą choroby [17]. Badania te miały na celu identyfikację białek o dużym potencjale diagnostycznym, a także wyselekcjonowanie tzw. markerów molekularnych toksoplazmozy, specyficznie reagujących z przeciwciałami wczesnymi lub pochodzącymi z surowic pacjentów w chronicznej fazie choroby [18, 19]. Zastosowanie takich specyficznych markerów w teście serodiagnostycznym daje możliwość rozpoznania fazy choroby na podstawie pojedynczego badania próby surowicy. Do tego celu wykorzystuje się głównie metody immunoenzymatyczne (tj. test ELISA — *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Innym podejściem, dającym zupełnie nowe możliwości, jest zastosowanie do badań diagnostycznych testu oznaczania awidności specyficznych przeciwciał IgG z wykorzystaniem rekombinantowych antygenów. Niska awidność przeciwciał (oznaczana obecnie z użyciem poliwalentnego antygenu natywnego) pozwala stwierdzić u pacjenta zarażenie *T. gondii*, do którego najprawdopodobniej doszło w ciągu 4 ostatnich miesięcy, natomiast wysoka awidność wskazuje na chorobę przewlekłą. W wielu przypadkach otrzymuje się graniczną wartość awidności, co powoduje trudności w określeniu fazy choroby. Zastosowanie w takim teście białek rekombinantowych pasożyta jest nowym podejściem diagnostycznym, ponieważ dojrzewanie awidności immunoglobulin G jest zróżnicowane dla poszczególnych antygenów. Wynika to z odmiennych funkcji, jaką pełnią poszczególne antygeny w cyklu życiowym *T. gondii*, przez co białka są produkowane przez pasożyta w innym czasie przebiegu inwazji w organizmie gospodarza. Z tego względu możliwe jest wyselekcjonowanie poszczególnych białek rekombinantowych precyzyjnie różnicujących fazy choroby i określających moment zarażenia (tab. 2).



Zarówno testy manualne, jak i automatyczne w reakcji ze specyficznymi przeciwciałami antytoksoplazmozowymi wykorzystują zazwyczaj antygen natywny *T. gondii* (TLA)

Tabela 2

Antygeny rekombinantowe *T. gondii* testowane w teście oznaczania awidności przeciwciał IgG

Antygen	Test	Czynnik denaturujący	Wyniki	Piśmiennictwo
p10, p16, p19, p23, p30, p32 (GRA6), p38, p40, p43, p54(ROP2), p57, p60 (ROP1), p66, p70, p75, p83 oraz p97	Western blotting	6 M mocznik 8 M mocznik	Antygeny p38 oraz p60 — potencjalne markery wczesnej fazy toksoplazmozy	[20]
GRA3, GRA7, MIC3 i SAG1	ELISA	6 M mocznik	Antygen MIC3 — marker wczesnej fazy toksoplazmozy Niski indeks awidności dla osób zarażonych w ciągu ostatnich 2 miesięcy	[21]
ROP1, GRA8, MAG1, SAG1, GRA7	Paski nitrocelulozowe	6 M mocznik	Badania stały się podstawą do opracowania zestawu diagnostycznego recomLine <i>Toxoplasma</i> IgG Avidity, w którym wykorzystano 3 antygeny (MAG1, GRA7, SAG1)	[22]
GRA1, GRA7, SAG1	ELISA	6 M mocznik	Mieszanka 3 antygenów pozwala na otrzymanie wyników zbliżonych do tych, w których zastosowano TLA	[23]
ROP1	ELISA	6 M mocznik	Antygeny ROP1 — potencjalny marker wczesnej fazy toksoplazmozy	[24]

TLA (*Toxoplasma lysate antigen*) — poliwalentny antygen natywny

PIŚMIENNICTWO

- Długońska H. Inwazyjność i wewnątrzkomórkowe pasożytnictwo *Toxoplasma gondii*. *Wiad. Parazytol.* 2005; 51: 213–217.
- Tenter A.M., Anja R., Heckerth R.A., Weiss L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 2000; 30: 1217–1258.
- Cazenave J., Forestier F., Bessieres M.H., Broussin B., Begueret J. Contribution of a new PCR assay to the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenat. Diagn.* 1992; 2: 119–127.
- Pinon J.M., Dumon H., Chemla C. i wsp. Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M, and A antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 2267–2271.
- Liesenfeld O., Montoya J.G., Tathineni N.J. i wsp. Confirmatory serologic testing for acute toxoplasmosis and rate of induced abortions among women reported to have positive *Toxoplasma* immunoglobulin M antibody titers. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2001; 184: 140–145.
- Hedman K., Lappalainen M., Seppä I., Makela O. Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J. Infect. Dis.* 1989; 159: 736–740.
- Sensini A., Pascoli S., Marchetti D. i wsp. IgG avidity in the serodiagnosis of acute *Toxoplasma gondii* infection, a multicenter study. *Clin. Microbiol. Infect.* 1996; 2: 25–29.
- Cozon G.J., Ferrandiz J., Nebhi H., Wallon M., Peyron F. Estimation of the avidity of immunoglobulin G for routine diagnosis of chronic *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1998; 17: 32–36.
- Steward M.W., Lew A.M. The importance of antibody affinity in the performance of immunoassays for antibody. *J. Immunol. Methods.* 1985; 78: 173–190.
- Inouye S., Hasegawa A., Matsuno S., Katow S. Changes in antibody avidity after virus infections: detection by an immunosorbent assay in which a mild protein-denaturing agent is employed. *J. Clin. Microbiol.* 1984; 20: 525–529.
- Suzuki L.A., Rocha R.J., Rossi C.L. Evaluation of serological markers for the immunodiagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50: 62–70.

12. Sobieszkańska B.M. Ocena przydatności badania awidności przeciwciał klasy G w serodiagnostyce toksoplazmozy. *Pol. Merk. Lek.* 2002; XIII, 111–115.
13. Ashburn D., Joss A.W.L., Pennington T.H., Ho-Yen D.O. Do IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of toxoplasma infection in pregnancy? *J. Clin. Pathol.* 1998; 51: 312–315.
14. Pelloux H., Brun E., Vernet G. i wsp. Determination of anti-Toxoplasma gondii immunoglobulin G avidity: Adaptation to the Vidas system (bioMérieux). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1998; 32: 69–73.
15. Lappalainen M., Hedman K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. *Ann. 1st Super Sanita* 2004; 40: 81–88.
16. Mechain B., Garin Y.J., Robert-Gangneux F., Dupouy-Camet J., Derouin F. Lack of utility of specific immunoglobulin G antibody avidity for serodiagnosis of reactivated toxoplasmosis in immunocompromised patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000; 7: 703–705.
17. Kotresha D., Noordin R. Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. *APMIS* 2010; 118: 529–542.
18. Holec L., Hiszczyńska-Sawicka E., Gąsior A., Brilowska-Dąbrowska A., Kur J. Use of MAG1 recombinant antigen for detection of Toxoplasma gondii infection in humans. *Clin. Vac. Immunol.* 2007; 14: 220–225.
19. Holec-Gąsior L., Kur J., Hiszczyńska-Sawicka E. GRA2 and ROP1 recombinant antigens as potential markers for detection of Toxoplasma gondii — specific immunoglobulin G in human with acute toxoplasmosis. *Clin. Vac. Immunol.* 2009; 16: 510–514.
20. Marcelino P.T., Silva D.A.O., Leser P.G., Camargo M.E., Mineo J.R. Molecular markers in acute and chronic phases of human toxoplasmosis: Determination of immunoglobulin G avidity by Western Blotting. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000; 7: 384–389.
21. Beghetto E., Buffolano W., Spadoni A. i wsp. Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary Toxoplasma gondii infection during pregnancy. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 5414–5418.
22. Pfrepper K.I., Anders G., Gohl M. i wsp. Seroreactivity to and avidity for recombinant antigens in toxoplasmosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005; 12: 977–982.
23. Pietkiewicz H., Hiszczyńska-Sawicka E., Kur J. i wsp. Usefulness of Toxoplasma gondii recombinant antigens (GRA1, GRA7, SAG1) in an immunoglobulin G avidity test for serodiagnosis of toxoplasmosis. *Parasitol. Res.* 2007; 100: 333–337.
24. Holec-Gąsior L., Drapała D., Lautenbach D., Kur J. Toxoplasma gondii: usefulness of ROP1 recombinant antigen in an immunoglobulin G avidity assay for diagnosis of acute toxoplasmosis in humans. *Pol. J. Microbiol.* 2010; 59: 307–310.