

Toksoplazmoz Tanısında ACIF Testin Değeri, IFA ve ELISA ile Karşılaştırılması

Özden Büyükbaba, Nilgün Dinçer, Y. Ali Öner, Ergene Büget

Özet: IgM antikorlarının kaybolduğu dönemde akut *Toxoplasma* infeksiyonunun geç dönemini belirlemede önem taşıyan, geç pozitifleşen ve çabuk negatifleşen kompleman birleşmesi deneyi modifiye edilerek, antikompleman immüno fluoresan (ACIF) test şeklinde uygulanmıştır. ACIF test ile IFA ve ELISA (IgG, IgM) yöntemlerini karşılaştırmak üzere, toksoplazmoz ön tanılı 100 hasta serumu incelenmiştir. Hastaların 28'inde ACIF, IFA-IgG ve ELISA-IgG ile antikor belirlenmiş, serumların hiçbirinde yalnız ACIF ile pozitif sonuç alınmamıştır. Anti-*Toxoplasma* IgM antikorları belirlenen beş hastada ise, ACIF negatif sonuç vermiştir. Bu ön çalışmanın bulguları, ACIF testin akut *Toxoplasma* infeksiyonunun geç döneminin saptanmasında yararlanılabilecek bir yöntem olduğu izlenimini vermiştir.

Anahtar Sözcükler: *Toxoplasma gondii*, ACIF test, serolojik tanı.

Summary: The value of ACIF test in the laboratory diagnosis of toxoplasmosis and its comparison with IFA and ELISA. Anticomplement immunofluorescence (ACIF) test which is a modification of complement fixation test, that becomes positive lately but becomes negative rapidly and is important for detecting the late period of acute *Toxoplasma* infection when IgM antibodies disappear, was applied in this study. ACIF, IFA and ELISA (IgG, IgM) were compared in investigation of 100 clinically suspected toxoplasmosis patients. Although IFA-IgG and IFA-IgM antibodies were detected with ACIF in 28 patients, none of the sera were reactive with ACIF alone. In five of the patients with anti-*Toxoplasma* IgM antibodies, ACIF was negative. The results of this preliminary study suggested that ACIF may be a reliable test in detecting the late period of acute *Toxoplasma* infection.

Key Words: *Toxoplasma gondii*, ACIF, serodiagnosis.

Giriş

Toksoplazmoz halen tüm dünyada olduğu gibi yurdumuzda da oldukça önemli, sık rastlanan bir hastalıktır. Hastalığın etkeni olan *Toxoplasma gondii* insana, doku kisti içeren az pişmiş ya da çiğ etlerin yenmesi, infekte kedi dışkılarındaki oookistlerle kontamine yiyecek ve içeceklerin sindirim yolundan alınması ile bulaşır. *T.gondii* gebe anneden fetusa plasenta yolu ile de geçebilmektedir. Ayrıca kan transfüzyonu ve organ transplantasyonu ile bulaşabileceği bildirilmektedir (1-5). Bugün doğan her bin çocukta % 0.1-0.7'sinin belirgin veya gizli toksoplazmozlu doğduğu bilinmektedir (6).

Tanı tanı etkenin görülmesi, izole edilmesi veya meydana gelen antikorların saptanması ile konur. Ancak güvenilir yöntemler uygulanmadıkça elde edilen yanlış sonuçlar, hem hastaya hem de gereksiz ilaç kullanma nedeniyle yurdumuz ekonomisine zarar vermektedir. Pratikte daha çok antikor tespitine dayanan serolojik deneylerle tanı konur. En çok kullanılan deneyler Sabin-Feldman boya deneyi (SFBD), kompleman birleşmesi deneyi (KBD), indirekt fluoresan antikor (IFA) deneyi, enzimle-linked immunosorbent assay (ELISA) ve direkt aglütinasyondur (2).

SFBD duyarlı ve güvenilir bir deney olmakla birlikte zor ve pahalı bir yöntemdir. IFA deneyinde pozitif sonuca yol açan antikorlar SFBD'dekilerle aynıdır ve sonuçları paralellik gösterir. IgG ve IgM antikorlarını ayrı ayrı göstermesi, ölü antijenle çalışılması ve aktivatör maddeye ihtiyacı göstermemesi deneyin üstün olmasına yol açar (7). ELISA da IgG ve IgM cinsi antikorları ayrı ayrı saptar. IgM, infeksiyonun ilk günlerinde belirir ve 1-2 ayda azalarak kaybolur. IgM-ELISA deneyinde, IgM-IFA deneyindeki yalancı pozitiflik görülmemektedir (8,9). IHA, SFBD ve IFA deneylerinden daha geç pozitifleşmekte ve uzun süre pozitif kalmaktadır (10).

Toxoplasma infeksiyonunun tanısında tek yöntem ve tek serum örneği ile alınan sonuçlar güvenilir değildir. Her zaman (örneğin

medikal abortus gerektirebilecek durumlarda) ikinci bir serum almak için olanak ve zaman olmayabilir. Bu durumda tek serum örneğinde birden fazla yöntemle çalışarak güvenilir sonuca varmak gerekmektedir. Örneğin KBD, SFBD ve IFA deneylerinden daha geç pozitif olmakta ve daha erken negatifleşmektedir. IgG pozitif, KBD negatif bulunmuşsa, ya çok yeni başlayan ya da eskiden geçirilmiş bir infeksiyonu gösterir. IgG ile birlikte KBD'nin pozitif olması ise yeni bir infeksiyonu göstermesi bakımından değerlidir (4).

Bununla birlikte IFA ve KBD birbirinden farklı iki laboratuvar disiplini gerektirmektedir. Özellikle KBD, yapılışı oldukça zor bir yöntemdir. ACIF yöntemi ise IFA yöntemi ile birlikte, hatta aynı lam üzerinde uygulanabilir bir yöntemdir. Bu çalışmada ACIF ve IFA-IgG ve IFA-IgM yöntemleri aynı lam üzerinde çalışılarak toksoplazmoz tanısındaki değeri araştırılmış ve diğer yöntemlerle karşılaştırılmıştır.

Yöntemler

Bu çalışmada İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan *Toxoplasma* infeksiyonu ön tanısı ile gönderilen 100 hastanın serumu incelenmiştir.

T.gondii antikorlarının aranmasında ACIF, IFA ve ELISA yöntemleri uygulanmıştır. *T.gondii* antikorlarının aranmasında uygulanan ACIF ve IFA yöntemlerinde antijen olarak Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda fare pasajları ile yaşıttan *T.gondii* ile infekte edilen fundikfarelerinin periton eksüdasından alınan takizoitler kullanılmıştır.

ACIF ve IFA yöntemlerinde konjugat serum olarak insan anti-C3 (sheep) "anti-human C3/FITC" (Wellcome), insan anti-IgG globülini "anti human IgG/FITC" (Wellcome), insan anti-IgM globülini "anti human IgM/FITC" (Wellcome) kullanılmıştır.

ACIF Deneyinin Yapılışı: Kompleman bağlayan antikorların aranacağı hasta serumları deneye alınmadan önce 56°C'de 30 dakika inaktive edilmiştir. Kompleman olarak kullanılan taze kobay serumu eşit miktarlarda inaktive edilmiş olan serum ile karıştırılmıştır. Serumlar fosfat tamponlu su ile 1/4 oranında sulandırılıp özel lamlardaki antijen kaplı oyuklara 25 µl damlatılmıştır. Lamlar rutubet tankı içinde 37°C'de 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonun-

Tablo 1. 100 Hasta Serumunda ACIF ile Alınan Sonuçlar

Pozitif Serum Sulandırılmaları						Negatif
1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
28	25	20	16	7	1	72

da lamlar fosfat tamponlu su ile 10 dakika yıkanmıştır. Daha sonra FITC ile işaretli anti-human C3, oyuklara 25 µl damlatılmış ve yine aynı ortamda aynı sürede inkübe edilmiş, süre sonunda aynı yıkama işlemi uygulanmıştır. Kurumaya yakın pH 7.6 olan tamponlanmış gliserin damlatılarak lamelle kapatılmış ve floresan mikroskopta sonuçlar okunmuştur.

1/4 sulandırmada pozitif bulunan serumlar, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 ve 1/256 oranlarında sulandırılarak antikorlar aranmıştır. Deneylerde her lama bir pozitif ve bir negatif kontrol serum konmuştur.

Deneye başlamadan önce FITC ile işaretli anti-human C3'ünün gerçekten kompleman varlığında çalıştığını göstermek için bir kontrol çalışma yapılmıştır. Bunun için deney iki aşamada yürütülmüştür. Birinci aşamada pozitif kontrol serumu ve negatif kontrol serumu (Behring firmasından temin edilen) eşit miktarlarda kompleman ile karıştırılmış ikinci aşamada ise aynı serumlar komplemansız olarak çalışılmıştır.

IFA Deneyinin Yapılışı: Lamlardaki antijen üzerine 1/16 sulandırılmış inaktif hasta serumları 25 ml damlatılmış ve rutubet tankı içinde 37°C'de 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra fosfat tamponlu su ile 10 dakika yıkanan lamlar kurutulmuş ve üzerine FITC ile işaretli anti-human IgG damlatılarak rutubet tankında 37°C'de 30 dakika bekletilmiştir. Buradan alınan lamlar fosfat tamponlu su ile yıkanmış, havada kurutulmuş ve gliserin ile kapatılarak floresan mikroskopta incelenmiştir.

Pozitif bulunan serumlar 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 ve 1/1024 oranlarında sulandırılarak IgG antikorları aranmıştır. Deneyde her lama standard bir pozitif ve bir negatif kontrol serum konmuştur.

Bu deney FITC ile işaretli anti-human IgM kullanılarak yukarıda anlatıldığı gibi tekrarlanmıştır.

ELISA Çalışması: *T.gondii*'ye özgü IgG sınıfı antikorların araştırılmasında, Captia Toxo-G (Mercia Diagnostics); IgM sınıfı antikorların araştırılmasında, Platelia Toxo-M (Diagnostics Pasteur) ELISA kitleri kullanılmıştır. Deneyde, çift antikor sandviç yöntemi uyarınca anti-IgM (insan) kaplı mikrotitrasyon plakları katı faz olarak kullanılmış, hasta serumlarındaki spesifik IgM'lerin varlığı, *Toxoplasma* antijeni ve peroksidaz işaretli *T.gondii* monoklonal antikorları ile gösterilmiştir.

Sonuçlar

Toksoplazmoz ön tanımlı hastalara ait 100 serum örneğinde anti-kompleman immüno floresans (ACIF) yöntemi ile alınan sonuçlar Tablo 1'de gösterilmiştir.

IFA ile beş serum örneğinde IgM antikorları belirlenmiş, bu serumlar romatoid faktör ile absorbe edildikten sonra deney yinelenildiğinde, sadece dört serumda IgM antikorları tekrar saptanmıştır. IFA-IgG ile alınan sonuçlar Tablo 2'de gösterilmiştir. ELISA ile beş serumda IgM antikorları belirlenmiştir. ELISA-IgG ile alınan

Tablo 2. 100 Hasta Serumunda IFA-IgG ile Alınan Sonuçlar

Pozitif Serum Sulandırılmaları					Negatif
1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	
48	27	16	2	1	52

Tablo 3. 100 Hasta Serumunda ELISA-IgG ile Alınan Sonuçlar

IgG (Ul/ml)					Negatif
100	150	200	250	300	
38	25	16	15	9	62

Tablo 4. ACIF, IFA-IgG ve ELISA-IgG ile Pozitif Sonuç Elde Edilen Olgular

Hasta no.	ACIF*	IFA-IgG*	ELISA-IgG**
1	1/8	1/128	100
2	1/8	1/256	300
3	1/8	1/64	150
4	1/16	1/256	100
5	1/16	1/256	150
6	1/16	1/128	150
7	1/16	1/64	100
8	1/16	1/256	300
9	1/32	1/64	250
10	1/32	1/64	100
11	1/32	1/64	100
12	1/32	1/64	100
13	1/64	1/64	100
14	1/64	1/64	100
15	1/64	1/1024	300
16	1/64	1/256	250
17	1/64	1/256	250
18	1/64	1/256	300
19	1/64	1/256	300
20	1/64	1/256	300
21	1/64	1/64	150
22	1/128	1/128	200
23	1/128	1/64	100
24	1/128	1/128	300
25	1/128	1/128	250
26	1/128	1/128	250
27	1/128	1/256	300
28	1/256	1/256	300

* Pozitif sonuç elde edilen serum sulandırılmaları

** Ul/ml

sonuçlar Tablo 3'te gösterilmiştir. 28 olguda ACIF, IFA-IgG ve ELISA-IgG ile pozitif sonuç elde edilmiştir (Tablo 4).

İrdeleme

İlk kez 1908 yılında Nicolle ve Manceaux tarafından *Cytodactylus gondii* adlı bir kemiriciden izole edilen *Toxoplasma gondii*, son konağı kedigiller, ara konağı ise insan dahil tüm memeliler, kuşlar ve sürüngenler olabilen bir zorunlu hücre içi parazittir (11). 1923'te Janku'nun bir çocukta göz toksoplazmozunu olgusunu ve 1937'de Wolf ve Coven'in bir süt çocuğunda konjenital toksoplazmoz olgusunu bildirmeleri üzerine insandaki önemi ortaya çıkmıştır (11,12). Yurdumuzda tanımlı kesin ilk insan olgusunu da 1953'te Unat ve arkadaşları (13) bildirmiştir. Sonraki yıllarda yapılan birçok çalışmada yurdumuzda *T.gondii* infeksiyonunun yaygın olduğu belirlenmiştir (14-16). Toksoplazmozun dünya erişkin nüfusunun % 40'ında sessiz infeksiyonlar şeklinde seyrettiği bilinmektedir. Buna karşın ağır bulgularla seyreden konjenital ya da sonradan kazanılmış toksoplazmoz olguları da siktir. Sadece klinik bulgulara dayanılarak toksoplazmoz tanısı koymak genellikle mümkün değildir. İnfekte hastadan *T.gondii* izolasyonu, toksoplazmozun tanısında en güvenilir yöntemdir. Ancak direkt etyolojik tanı oldukça güç olduğundan, serolojik yöntemler ile *T.gondii*'ye karşı oluşan antikorların aranması tanıda tercih edilmektedir (2,4,5).

Toksoplazmozun tanısında kullanılan teknikler gelişmiş olmak-

la birlikte, elde edilen sonuçların yorumlanmasında belirli bir standardizasyon sağlanamamıştır. Güvenilir, sağlıklı bir sonuç elde etmek için, serum örneğinin uygun zamanda alınması, 2-3 hafta arayla alınan ikinci serumun incelenmesi, yöntemin özelliklerinin çok iyi bilinmesi, sonuçların iyi yorumlanması gibi kriterlerin daima göz önünde tutulması gerekmektedir.

Tek yöntem ve tek serum örneği ile alınan sonuçlar infeksiyonun hangi dönemde olduğunu anlamada güvenilirdir olmamaktadır. Her zaman ikinci bir serum alacak imkan ve zaman olmayabilir. Bu nedenle tek serum örneğinde, birden fazla yöntemle çalışılarak yorumlanabilir ve güvenilir bir sonuca kısa sürede varmak hedeflenir.

Akut toksoplazmozda karşılaşılabilen antikor yanıtı dört farklı kategoride değerlendirilmektedir (2,4,5,17). [1] Olguların % 80'inde, ilk ortaya çıkan spesifik IgM'ler birkaç ay hasta serumunda belirlenebilir. Daha sonra beliren ve titresi giderek artan IgG'ler 6-12 ay kadar yüksek düzeylerini korurlar ve yavaş yavaş azalarak düşük titrelere uzun süre kalırlar. [2] Özellikle hücrel immün yetmezliği olanlarda olmak üzere olguların % 5'inde klinik belirtiler daha ağırdır ve bu olgularda spesifik IgG ve IgM'ler yıllarca yüksek titrelere kalabilirler. [3] İnfekte bireylerin % 5-10 kadarında normal IgM yanıtı görülmesine karşın, IgG titresi fazla yükselmez (100 UI); bu durum özellikle tedaviye başlanan olgularda, ya da yeterli antijen uyarısı olmayan bireylerde görülür. [4] İnfekte bireylerin % 5 kadarında ise spesifik IgM yanıtı ya hiç oluşmaz ya da eser miktarda oluşur; IgG düzeyi ise oldukça yüksektir (1000 UI). Bu durumda bir reinfeksiyon düşünülebilir.

Bu bilgilere göre infeksiyonun başlangıcından itibaren 2-3 ay sonra negatifleşen ve spesifik IgM yanıtı oluşmayan hastalarda IgM antikorlarını belirleme olasılığı oldukça azdır.

ELISA ve IFA yöntemleri IgM ve IgG sınıfı antikorları ayrı ayrı saptamaktadır ve bu deneyler genelde uyumlu sonuçlar vermektedir. Bu çalışmada da 100 serum örneğinin 48'inde IFA ile IgG antikorları saptanmış, bunların 38'inde ELISA ile de IgG antikorları belirlenmiştir. IFA yönteminde serum sulandırılmalarının daha düşük olması ve ELISA ile eşik değerin altındaki antikorların belirlenememesi bu iki yöntem arasında % 10'luk bir farkın doğmasına neden olabilir. Nitekim bu çalışmada IFA ile IgG antikorları belirlenen 10 serum örneğinde ELISA ile 40-70 UI/ml düzeyinde (kit kriterlerine göre pozitiflik sınırının altında) IgG antikorları belirlenmiştir.

IFA ile IgM antikorlarının belirlenmesinde, spesifik IgG'lerin ve romatoid faktörün yalancı pozitifliğe ya da negatifliğe neden olduğu bildirilmektedir (7). Buna karşılık ELISA ile spesifik IgM araştırmalarında anti-IgM kaplı katı fazların kullanılması ile spesifik sonuçlar alındığı, bu yöntemle spesifik IgG ve romatoid faktör varlığının yanlışlara yol açmadığı bildirilmektedir (8). Bu çalışmada IFA ile beş serum örneğinde IgM antikorları belirlenmiş, RF ile absorblama işleminden sonra dördünde IgM antikorları yine saptanırken, birinin negatif sonuç verdiği gözlenmiştir. Katı faz anti-IgM kaplı ELISA-IgM kiti kullanılan çalışmamızda, beş hastada (4'ünde IFA-IgM pozitif) IgM antikorları belirlenmiştir.

KBD genellikle geç pozitif olur ve antikorlar çabuk kaybolur. Diğer deneyler pozitif sonuç verdiği halde, KBD'nin negatif sonuç vermesi, ya çok yeni bir infeksiyonu ya da eskiden geçirilmiş bir infeksiyonu düşündürür. KBD'nin de pozitif sonuç vermesi akut bir infeksiyon işareti olarak kabul edilir. Yani kompleman birleşmesi deneyi, akut *Toxoplasma* infeksiyonunun geç dönemini belirlemeye yararlıdır.

IFA, ELISA ve KBD birbirinden ayrı laboratuvar disiplinlerini gerektirmektedir. Toksoplazmoz şüphesi ile gelen bir serumu bu üç farklı yöntemle incelemek hem zaman, hem de ekonomik açıdan güçtür. Bunun yanı sıra kullanılan yöntemlerin farklı *Toxoplasma* antijenlerine karşı gelişen antikorları saptamaları ve bu yöntemler ile değişik sınıf veya özelliklerdeki immüno globülinlerin belirlenmesi, ilk bakışta çelişkili görünen sonuçların elde edilmesi

ne yol açmaktadır.

Ancak ACIF testi ile IFA yöntemi birlikte, hatta aynı lam üzerinde uygulanabilir bir yöntemdir. ACIF, IFA-IgG ve IFA-IgM yöntemleri aynı lamda uygulanarak toksoplazmoz tanısında bu üç değerli yöntemin sonuçlarının tek serum örneği ile kısa bir zamanda alınabilmesi olasıdır.

Bu ön çalışmada ilk kez ACIF testi kullanılarak IgM antikorlarının kaybolduğu dönemde akut toksoplazmozun geç dönemini saptamada bu yöntemin yerinin araştırılması hedeflenmiştir. ACIF ile antikor belirlenen 28 hastanın serumunda hem ELISA hem de IFA ile IgG antikorları belirlenmiş ve bu hastaların geç akut dönemde olabileceği düşünülmüştür. Bu 28 hasta ve IgM antikorları belirlenen akut *Toxoplasma* infeksiyonu tanısı konan beş hasta kontrole alınmıştır. ACIF ile antikor belirlenen 28 hastada bu antikorların ne kadar zaman sonra negatifleşeceği ve akut *Toxoplasma* infeksiyonlu 5 hastada da ACIF ile antikorların ne zaman belirlenebileceğinin araştırılması ve alınacak sonuçların ayrı bir çalışmada sunulması planlanmıştır.

Bu ön çalışma sonuçları ACIF testinin IFA-IgG ve IFA-IgM ile birlikte pratik olarak uygulanabilir olduğunu göstermiştir. Bu konuda yapılan yeni çalışmalar ve kontrole aldığımız hastalardan alacağımız sonuçlar, testin güvenilirliği hakkında kesin bilgiler edinmemizi sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. Catar G. Possibilities of distribution of toxoplasmosis in urban conditions. *J Parasitol* 1974; 66: 447-50
2. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic medical parasitology: tissue protozoa. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press, 1993: 92
3. Lunde MN, Siegel SE. The transmission of toxoplasmosis by blood transfusion. *J Parasitol* 1970; 56: 218-9
4. Beamon MH, McCabe RE, Wong SY Remington JS. *Toxoplasma gondii*. In: Mandell G L, Bennett J E, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Fourth ed. New York: Churchill Livingstone, 1995: 2455-74
5. Wilson M, Schantz P, Pieniazek N. Diagnosis of parasitic infections: immunologic and molecular methods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover F C, Tenover RH, eds. *Manual of clinical microbiology*. Washington: ASM Press, 1995: 1164
6. Gentilini M, Niel G, Legardare B. Toxoplasmosis in West Africa. *J Parasitol* 1974; 63: 221-4
7. Araujo FG, Barnett EV, Gentry LO. False-positive anti-*Toxoplasma* fluorescent-antibody response and some pitfalls in diagnosis. *J Pediatr* 1973; 83: 27
8. Payne R A, Isaac M, Francis J M. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using antibody class capture for the detection of anti-*Toxoplasma* IgM. *J Clin Pathol* 1982; 35:892
9. Herbrink P, Van Loon AM, Rotmans JP, Van Knapen F, Van Dijk W. Interlaboratory evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay, antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay, and immunoblotting for detection of immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 100
10. McCabe RE, Remington JS. The diagnosis and treatment of toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol* 1983; 2: 95
11. Cheng TC. *General parasitology: apicomplexa, xospora and microspora*. New York: Academic Press, 1978: 265
12. Wolf A, Cowen D, Paige BH. Human toxoplasmosis occurrence in infants as encephalomyelitis: verification by transmission to animals. *Science* 1939, 89: 226-9
13. Unat ET, Alyanak N, Şahin V. Milier tüberküloz ile birlikte bulunan bir kahil toksoplazmozisi vakası hakkında. *Hastane* 1953: 534-7
14. Ekmekçi H. Toxoplazmozis'de enfeksiyon kaynakları: II. köpek ve kedilerde *Toxoplasma* antikorları. *Mikrobiyol Bül* 1970; 4: 11-4
15. Güllan K. Toksoplazmozis'in yurdumuzdaki durumu hakkında serolojik bir araştırma. *Ankara Üniv Tıp Fak Mecm* 1969; 22:415-8
16. Saruç F. *Toxoplasma gondii* antikorlarının araştırılması. *Diyarbakır Üniv Tıp Fak Derg* 1976; 5: 565-7
17. Desmouts G, Daffos F, Ferestier F, Capella-Pavlovsky M, Thulliez P, Chartier M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Lancet* 1985; 1: 500