Awidność przeciwciał klasy IgG dla antygenów *Francisella tularensis* w przebiegu tularemii u ludzi

Avidity of IgG class antibodies to *Francisella tularensis* in the course of tularemia in humans

Waldemar Rastawicki, Karolina Śmietańska, Natalia Rokosz-Chudziak, Urszula Roguska

Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

W pracy przeanalizowano awidność przeciwciał klasy IgG dla antygenów *Francisella tularensis* w 52 próbkach surowicy uzyskanych od 40 osób z tularemią. Wykazano, że indeks awidności przeciwciał dla *F. tularensis* o osób dorosłych był niższy niż u dzieci i młodzieży. Badanie próbek surowicy uzyskanych 2-3 krotnie w przebiegu tularemii nie wykazało istotnych różnic w poziomie indeksu awidności w zależności od okresu choroby. Jednakże, w próbkach surowicy uzyskanych pięciokrotnie od 9-letniej dziewczynki z węzłowo-oczną postacią tularemii, stwierdzono narastające wartości indeksu awidności, w zakresie od 0,51 do 0,94.

Słowa kluczowe: *Francisella tularensis*, tularemia, przeciwciała klasy IgG, awidność

ABSTRACT

Introduction: Tularemia is a highly infectious zoonotic disease caused by Gram-negative bacterium *Francisella tularensis*. The microbiological diagnosis of tularemia is based mainly on serological investigations. The present study was undertaken to determine the avidity of IgG class antibodies to *Francisella tularensis* in the course of tularemia in humans and to evaluate its value for estimation of the phase of diseases.

Methods: Fifty two serum samples obtained from 40 patients with tularemia were tested by in-house ELISA in duplicate in the same plate, without and after the 0.5 h incubation with 8M urea. The age of the subjects was between 6 and 77 years. From one patient, a 9-years-old girl with oculoglandular form of tularemia, five serum samples were taken, respectively after 0.5, 1.5, 3, 6 and 12 months from the beginning of the first clinical symptoms.

Results: The results of the study showed higher values of the avidity index (AI) of IgG antibodies for *F. tularensis*, often exceeding the value of 0.9, in children and adolescents than in adults. The examination of serum samples obtained 2-3 times in the course of

tularemia from few patients did not show significant differences in the level of avidity index depending on the period of the disease. However, in five serum samples obtained from a 9-years-old girl in the different phases of tularemia the avidity index showed increasing values (0.51, 0.80, 0.92, 0.90 and 0.94, respectively).

Conclusions: The avidity index of IgG may be helpful in excluding recent infection, but its usefulness in detecting an active phase of invasion requires further research.

Key words: *Francisella tularensis*, tularemia, antibodies of class IgG, avidity

WSTĘP

Tularemia jest wysoce zakaźną chorobą odzwierzęcą wywołowaną przez pałeczki *Francisella tularensis*. W zależności od zjadliwości szczepu oraz drogi wniknięcia patogenu do organizmu ludzkiego, rozpoznaje się następujące postacie kliniczne tularemii: wrzodziejąco-węzłową, węzłową, oczno-węzłową, anginową, trzewną, duropodobną oraz płucną. Zakażenie może przebiegać w postaci ostrej, z wysoką gorączką, dreszczami, bólami mięśni oraz ogólnym osłabieniem lub w postaci łagodnej. Laboratoryjna diagnostyka tularemii opiera się na potwierdzeniu obecności drobnoustrojów bądź ich DNA w próbkach materiału klinicznego czy też na wykryciu na diagnostycznie znamiennej poziomie swoistych przeciwciał w próbkach surowicy (4, 5).

Ze względu na fakt, że tularemia nie występuje powszechnie w populacji, a w czasie jej przebiegu stymulowany jest intensywnie układ odpornościowy do produkcji przeciwciał, badania serologiczne charakteryzują się bardzo wysoką czułością i swoistością. Przeciwciała dla antygenów *F. tularensis* pojawiają się we krwi zazwyczaj już po 10-14 dniach od początku objawów klinicznych, osiągając najwyższy poziom w 4-7 tygodniu choroby (10). Z obserwacji własnych wynika, że przeciwciała we wszystkich trzech klasach immunoglobulin dla antygenów *F. tularensis* utrzymują się długo na bardzo wysokim poziomie, uniemożliwiając prześledzenie dynamiki przeciwciał w kolejnych, kontrolnych próbkach surowicy uzyskanych po ustąpieniu objawów klinicznych. W rutynowo prowadzonej diagnostyce tularemii właściwość ta może powodować problemy z prawidłową interpretacją wyników badań serologicznych. Nie wiadomo bowiem, czy wykryty diagnostycznie znamieny poziom przeciwciał związany jest z aktualnym zakażeniem pałeczkami *F. tularensis* czy też świadczy jedynie o przechorowaniu tularemii w przeszłości.

Rozróżnienie aktualnego zakażenia od przebytego jest istotnym problemem w serodiagnostyce wielu chorób zakaźnych. Pomocnym narzędziem ułatwiającym to zadanie, oprócz określania indeksu IgM/IgG jest oznaczanie awidności przeciwciał klasy IgG, stosowane powszechnie w serologicznej diagnostyce toksoplazmozy. Termin awidność oznacza wypadkową sił oddziałujących pomiędzy całymi cząsteczkami przeciwciał i antygenem. We wczesnej fazie zakażenia produkowane swoiste przeciwciała charakteryzują się słabą siłą wiązania antygenów a powstające kompleksy antygen-przeciwciało są utrzymywane głównie dzięki wiązaniom wodorowym, które łatwo ulegają rozerwaniu pod wpływem mocznika. Produkowane w późniejszej fazie choroby przeciwciała klasy 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. Przykładowo, w przypadku toksoplazmozy czas potrzebny na przejście z niskiej do wysokiej awidności wynosi około 12–16 tygodni, zatem przeciwciała o wysokiej awidności występują w fazie przewlekłej zarażenia (3, 7, 15).

Celem prezentowanej pracy była ocena poziomu awidności przeciwciał klasy IgG dla antygenów *Francisella tularensis* w przebiegu tularemii u ludzi.

Próbki surowicy. Przedmiotem badań były 52 próbki surowicy uzyskane od 40 osób z tularemią. Dwadzieścia dwie próbki uzyskano w różnych okresach choroby od 8 osób (od czterech osób uzyskano po dwie próbki surowicy, od dwóch osób po trzy próbki i od jednej osoby pięć próbek surowicy). Najbardziej interesujący był materiał zebrany od 9-letniej dziewczynki z oczno-węzłową postacią tularemii. Probki surowicy uzyskano od tej pacjentki pięciokrotnie, odpowiednio: 2 tygodnie (próbka nr 1), 6 tygodni (próbka nr 2), 3 miesiące (próbka nr 3), 6 miesięcy (próbka nr 4) oraz 12 miesięcy (próbka nr 5) od początku objawów klinicznych. Pozostałe próbki surowicy uzyskano jednokrotnie od osób z różnymi postaciami tularemii. Niestety, w przypadku tych osób nie dysponowano dokładną datą wystąpienia pierwszych objawów klinicznych, należy przypuszczać jednak, że były to próbki uzyskane w ostrej fazie choroby. Wiek badanych osób wynosił od 6 do 77 lat. We wszystkich próbkach surowicy, we wcześniej prowadzonych rutynowych badaniach serologicznych prowadzonych przy rozcieńczeniu badanej próbki 1/100, wykryto bardzo wysoki, diagnostycznie znamieny poziom przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM dla antygenów *F. tularensis*.

Zestaw ELISA opracowany we własnym zakresie (ELISA NIZP-PZH). Odczyn wykonywano na polistyrenowych płytkach Maxi-Sorp firmy Nunc, wg metody opisanej uprzednio, poszukując przeciwciał wyłącznie klasy IgG (12). Jako antygenu użyto inaktywowanej zawiesiny pałeczek *F. tularensis* rozbitych ultradźwiękami. W odróżnieniu jednak od rutynowo wykonywanego odczynu ELISA, w którym badano próbki surowicy wyłącznie w rozcieńczeniu 1/100, ze względu na bardzo wysoki poziom przeciwciał, wykonywano kolejne, dwukrotne rozcieńczenia próbek surowicy (od rozcieńczenia 1/100 do 1/1600). Pozwoliło to na wybranie najbardziej odpowiedniego rozcieńczenia do badania awidności przeciwciał klasy IgG. W celu określenia awidności przeciwciał badaniom poddawano równolegle na jednej płytce surowice inkubowane bez użycia roztworu mocznika (PBST) oraz te same próbki surowicy inkubowane z użyciem 8 M roztworu mocznika. Ten dodatkowy etap, w porównaniu do rutynowo wykonywanego odczynu ELISA, przeprowadzono przed dodaniem roztworu koniugatów (30 minut inkubacji w temperaturze 37°C plus czterokrotne płukanie PBST).

Określanie indeksu awidności przeciwciał klasy IgG. Indeks awidności próbki (AI) wyznaczano jako stosunek wartości gęstości optycznej (OD_{450}) uzyskanej w reakcji z użyciem roztworu dysocjującego (mocznik) do wartości uzyskanej dla roztworu kontrolnego (bez mocznika). Indeks awidności AI interpretowano arbitralnie zgodnie z podaną niżej tabelą:

Indeks awidności AI	Interpretacja
$AI < 0,40$	Niska awidność
$0,40 \leq AI < 0,60$	Średnia awidność
$AI > 0,60$	Wysoka awidność

WYNIKI

Przeprowadzone wstępne miareczkowanie odczynu ELISA wykazało, że do badania poziomu awidności przeciwciał klasy IgG dla *F. tularensis* najlepsze będzie rozcieńczenie próbki surowicy 1/400.

W tabeli I przedstawiono wyniki oznaczania awidności przeciwciał klasy IgG w próbkach surowicy uzyskanych od osób z tularemią w zależności od wieku. W tabeli uwzględniono jedynie próbki surowicy uzyskane po raz pierwszy od danego pacjenta (w ostrej fazie choroby). U dzieci i młodzieży zdecydowanie dominowały wysokie wartości indeksu awidności, często przekraczające wartość 0,9. U osób dorosłych, po 20-tym roku życia, widoczny jest spadek średniej wartości indeksu AI (0,58), który utrzymuje się na podobnym poziomie u osób dorosłych z pozostałych grup wiekowych.

Tabela I. Awidność przeciwciał klasy IgG w próbkach surowicy uzyskanych od osób z tularemią w zależności od wieku. W tabeli uwzględniono jedynie próbki surowicy uzyskane po raz pierwszy od danego pacjenta (w ostrej fazie choroby). Oznaczenie wykonano przy rozcieńczeniu próbki 1/400.

Grupa wieku badanych osób z tularemią (lata)	Liczba próbek surowicy	Średnia wieku (lata)	Liczba próbek z indeksem awidności:			Średnia wartość współczynnika awidności (AI)
			Niskim (<0,40)	Średnim (0,4-0,6)	Wysokim (>0,6)	
<10	5	5,8	0	0	5	0,79
10-20	8	12,0	1	0	7	0,77
20-40	10	34,4	4	1	5	0,58
40-60	8	51,1	3	2	3	0,52
>60	10	65,9	2	5	3	0,53
Łącznie	41	37,1	10	8	23	0,62

W tabeli II zaprezentowano dokładne wartości poziomu przeciwciał przed i po zastosowaniu mocznika wraz z uzyskanymi wartościami współczynnika awidności w próbkach surowicy uzyskanych 2-3 krotnie w różnych odstępach czasowych w przebiegu choroby od sześciu osób z tularemią. Przeprowadzone badania nie wykazały istotnych różnic w wartości indeksu awidności w zależności od czasu uzyskania próbki surowicy w przebiegu choroby. Mamy tu do czynienia zarówno z bardzo niewielkim spadkiem jak i wzrostem tej wartości w kontrolnych próbkach surowicy.

Kinetykę awidności przeciwciał w przebiegu tularemii najlepiej można zaobserwować na przykładzie próbek surowicy uzyskanych w różnych okresach od początku objawów klinicznych od 9-letniej dziewczynki z węzłowo-oczną postacią tularemii. I tak, w pierwszej próbce uzyskanej na samym początku choroby (około dwa tygodnie od początku objawów klinicznych) awidność przeciwciał klasy IgG dla antygenów *F. tularensis* wynosiła 0,51. W próbce drugiej, uzyskanej po kolejnych czterech tygodniach, awidność była już zdecydowanie wyższa i wynosiła 0,80. W kolejnej, trzeciej próbce surowicy, uzyskanej po 3 miesiącach od początku objawów klinicznych, wartość współczynnika awidności wynosi już 0,92. Wartość ta utrzymuje się na prawie nie zmienionym poziomie w próbce czwartej i piątej (Tabela III).

Tabela II. Awidność przeciwciał klasy IgG w próbkach surowicy uzyskanych 2-3 krotnie w różnych odstępach czasowych w przebiegu choroby od osób z tularemią. Oznaczenie wykonano przy rozcieńczeniu próbki 1/400.

Pacjent (wiek, płeć)	Odstęp czasu	OD ₄₅₀ próbki bez inkubacji z mocznikiem	OD ₄₅₀ próbki po inkubacji z mocznikiem	Współczynnik awidności (AI)
Nr 1 (66 lat, M)	-	1,453	0,727	0,50
	62 dni	1,394	0,585	0,42
Nr 2 (73 lata, M)	-	1,374	0,689	0,50
	38 dni	1,256	0,559	0,45
Nr 3 (77 lat, K)	-	1,255	0,198	0,16
	40 dni	1,295	0,219	0,17
Nr 4 (34 lata, M)	-	1,501	0,507	0,34
	23 dni	1,548	0,688	0,44
Nr 5 (5 lat, K)	-	1,384	0,918	0,66
	36 dni	1,447	0,828	0,57
	70 dni	1,439	0,842	0,58
Nr 6 (7 lat, M)	-	1,643	1,496	0,91
	36 dni	1,603	1,418	0,88
	70 dni	1,477	1,164	0,79

Tabela III. Awidność przeciwciał klasy IgG w próbkach surowicy uzyskanych od 10-letniej dziewczynki z węzłowo-oczną postacią tularemii w różnych okresach od początku objawów klinicznych. Oznaczenie wykonano przy rozcieńczeniu próbki 1/400.

Kolejny numer próbki	Okres choroby	OD ₄₅₀ próbki bez inkubacji z mocznikiem	OD ₄₅₀ próbki po inkubacji z mocznikiem	Współczynnik awidności (AI)
1	2 tyg.	1,162	0,596	0,51
2	6 tyg.	1,504	1,203	0,80
3	3 mc	1,608	1,487	0,92
4	6 mc	1,585	1,426	0,90
5	12 mc	1,619	1,524	0,94

DYSKUSJA

Podczas odpowiedzi immunologicznej organizm produkuje przeciwciała przeciwko różnym epitopom znajdującym się na obcych cząsteczkach, białkach i czynnikach zakaźnych. Przeciwciała te wiążą się z antygenem z różną siłą określaną jako powinowactwo. Antygen z reguły posiada kilka determinant, które są rozpoznawane przez przeciwciała. Siła wiązania pomiędzy przeciwciałem a kompleksem determinant antygenowych, stanowi tym samym odzwierciedlenie całościowej interakcji antygenu z przeciwciałem i określana jest jako awidność (12). We wczesnej fazie infekcji swoiste przeciwciała charakteryzują się zazwyczaj słabą siłą wiązania antygenów. Powstające kompleksy antygen–przeciwciało są utrzymywane głównie

dzięki wiązaniom wodorowym, które łatwo ulegają rozerwaniu pod wpływem mocznika występującego w buforze stosowanym w teście do odpłukiwania nadmiaru reagentów. Trwająca infekcja stymuluje układ immunologiczny gospodarza a 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 (8).

Badanie awidności przeciwciał klasy IgG stosowane jest powszechnie w serodiagnostyce toksoplazmozy (4, 8, 17). Awidność przeciwciał IgG przeciwko *T. gondii* zwiększa się wraz z czasem trwania zarażenia. U osób z pierwotną inwazją jest niższa od 15% i na tym poziomie utrzymuje się przez 5–7 miesięcy po pojawieniu się pierwszych objawów. Jeśli wynosi powyżej 30%, wskazuje na dłużej trwające zarażenie. U osób, u których stwierdzamy obecność przeciwciał przeciwko *T. gondii* w klasie IgM, wysoka awidność przeciwciał klasy IgG wskazuje na dłuższy czas trwania zarażenia i pozwala na wykluczenie świeżego zachorowania (1). Wysoka awidność IgG oraz brak wczesnych markerów aktywnego zarażenia (przeciwciała klasy M i/lub A) przemawiają za przewlekłą toksoplazmozą, a więc pozwalają na zrezygnowanie z badania kolejnych prób surowicy. Niska awidność dużych stężeń IgG oraz równoczesna obecność przeciwciał 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. 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 przewlekłej toksoplazmozy (8).

W dostępnym piśmiennictwie istnieją liczne doniesienia, o bardziej lub mniej udanych próbach zastosowania indeksu awidności przeciwciał klasy IgG do rozróżnienia ostrej fazy choroby od fazy przewlekłej również w przebiegu takich chorób jak: leishmanioza trzewna, strongyloidoza, toksokaroza, salmoneloza bydła, gruźlica, zakażenie wirusami opryszczki, HCV, Epstein-Barr, HIV, różyczki, West Nile i CMV (3, 9, 10, 15, 16, 18, 19, 20). Trzeba mieć jednak na uwadze fakt, że w przypadku serodiagnostyki toksoplazmozy opisano kilka metod oceny awidności przeciwciał (2, 13). Tak więc, istotny jest prawidłowy sposób wyliczenia wartości cut-off oraz indeksu awidności.

W badaniach własnych wykazano, że indeks awidności przeciwciał dla *F. tularensis* u osób dorosłych był niższy niż u dzieci. Badanie próbek surowicy uzyskanych od kilku osób 2–3 krotnie w przebiegu tularemii nie wykazało z kolei istotnych różnic w poziomie indeksu awidności. Na podstawie jego wartości, przynajmniej w przypadku tych kilku osób, nie można było rozróżnić czy próbka została pobrana w ostrej fazie choroby czy też była to próbka kontrolna, uzyskana po kolejnych 1–2 miesiącach. Być może, indeks awidności w próbkach surowicy uzyskanych od tych osób po kolejnych kilku miesiącach od początku objawów klinicznych uległ by istotnej zmianie lecz niestety nie dysponowano takim materiałem klinicznym. Nieco odmienny obraz indeksu awidności uzyskano w przypadku bardzo dobrze udokumentowanej historii choroby 9-letniej dziewczynki z węzłowo-oczną tularemią. W przypadku tej pacjentki, już w drugiej próbce surowicy uzyskanej po sześciu tygodniach od początku objawów klinicznych uzyskano wyraźny wzrost indeksu awidności. Co więcej w kolejnych próbkach indeks ten był jeszcze wyższy. Tak więc, w tym przypadku można było rozróżnić, na podstawie wartości indeksu AI, próbkę surowicy uzyskaną w ostrej fazie choroby ($AI = 0,51$) od próbek kontrolnych ($AI \geq 0,8$).

Podsumowując wyniki przeprowadzonych badań należy stwierdzić, że u większości osób z tularemią stwierdza się wysokie wartości współczynnika awidności ($>0,60$). Problematiczne wydaje się natomiast bezpośrednie wykorzystanie wartości AI do rozróżnienia aktualnej choroby od fazy przewlekłej. Należy przeprowadzić dalsze badania na dobrze zdefiniowanych próbkach surowicy uzyskanych w różnych okresach choroby.

PIŚMIENNICTWO

1. Adamek B, Olszok I, Bluszcz-Rożnowska A i inni. Awidność przeciwciał przeciwko *Toxoplasma gondii* – parametr przydatny w diagnostyce różnicowej. *Probl Med Rodz* 2009; 1: 46–50.
2. Bitkowska I, Waloch M, Dzbeński T.H. Oznaczanie awidności swoistych przeciwciał klasy G w serologicznej diagnostyce toksoplazmozy. *Med Doś Mikrobiol* 200, 52, 295-300.
3. Bosqui LR, Gonzaga HT, Gonçalves-Pires MDRF. Avidity as a criterion for diagnosis of human strongyloidiasis increases specificity of IgG ELISA. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017; 89: 262-4.
4. Cozon GJ, Ferrandiz J, Nebhi H i inni. 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: 32–6.
5. Ellis J, Oyston PCF, Green M, Titball RW. Tularemia. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 631-46.
6. Foley JE, Nieto NC. Tularemia. *Vet Microbiol* 2010; 140: 332-8.
7. Gaudy-Graffin C, Lesage G, Kousignian I. Use of an anti-hepatitis C virus (HCV) IgG avidity assay to identify recent HCV infection. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3281-7.
8. Holec-Gąsior L, Drapała D. Awidność przeciwciał IgG jako ważny test diagnostyczny w rozpoznawaniu aktywnej toksoplazmozy - stan obecny i nowe możliwości. *Forum Medycyny Rodzinnej* 2012; 6: 74–81.
9. Kimuda SG, Biraro IA, Bagaya BS. Characterising antibody avidity in individuals of varied *Mycobacterium tuberculosis* infection status using surface plasmon resonance. *PLoS One* 2018;13: e0205102.
10. Kobayashi N, Nagata T, Shinagawa S i inni. Increase in the IgG avidity index due to herpes simplex virus type 1 reactivation and its relationship with cognitive function in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 430: 907-11.
11. Koskela P, Salminen A. Humoral immunity against *Francisella tularensis* after natural infection. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 973–9.
12. Murray PR., Rosenthal KS, Pfaller MA. *Mikrobiologia*. Elsevier, 2009, USA
13. Perciani C, Peixoto P, Dias W, Kubrusly F, Tanizaki M. Improved method to calculate the antibody avidity index. *J Clin Lab Anal* 2007; 21: 201-6.
14. Rastawicki W, Jagielski M, Gierczyński R. Wykorzystanie odczynu ELISA w serologicznej diagnostyce tularemii. *Med Dośw Mikrobiol* 2005; 57: 425-9.
15. Sirin MC, Agus N, Yilmaz N. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, *Rubellavirus* and *Cytomegalovirus* among pregnant women and the importance of avidity assays. *Saudi Med J* 2017; 38: 727-32.

16. *Shepherd SJ, McAllister G, Keana J* i inni. Development of an avidity assay for detection of recent HIV infections. *J Virol Methods* 2015; 217: 42-9.
17. *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.
18. *Vilibic-Cavlek T, Ljubin-Sternak S, Kos L* i inni. The role of IgG avidity determination in diagnosis of Epstein-Barr virus infection in immunocompetent and immunocompromised patients. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2011; 58: 351-7.
19. *Vilibic-Cavlek T, Kristofic B, Savic V.* Diagnostic significance of immunoglobulin G avidity in symptomatic and asymptomatic West Nile virus infection. *Rev Soc Bras Med Trop* 2018; 51: 591-5.
20. *Rudzińska M, Kowalewska B, Sikorska K.* Clinical usefulness of Western blotting and ELISA avidity for the diagnosis of human toxocariasis. *Parasite Immunol* 2017; 39 (1) doi: 10.1111/pim.12400.

Otrzymano: 1 III 2019 r.

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie