REPUBLIKA E SHQIPËRISË
UNIVERSITETI I TIRANËS
FAKULTETI I SHKENCAVE TË NATYRËS
DEPARTAMENTI I BIOLOGJISË

Adresa : Bulevardi Zogi I, Tiranë, Tel/Fax: 042229590
www.fshn.edu.al

STUDIMI I KRAHASUAR I MATJEVE IMUNOLOGJIKE TË REALIZUARA ME APARATURAT: COBAS 6000 (ROCHE HITACHI), CHORUS (DIESSE), MINI-VIDAS 2000 (BIO-MEREUX) DHE ELISA EUROIMMUN

KANDIDAT
BLERTA LAZE

UDHËHEQËS SHKENCOR
PROF. As. ANILA MITRE

TIRANË 2014

REPUBLIKA E SHQIPËRISË
UNIVERSITETI I TIRANËS
FAKULTETI I SHKENCAVE TË NATYRËS
DEPARTAMENTI I BIOLOGJISË

DISERTACION

Paraqitur nga:

MSc. Biologji Blerta Laze

Për gradën shkencore:

DOKTOR I SHKENCAVE

Specialiteti: **Biologji Molekulare**

Tema: **"STUDIMI I KRAHASUAR I MATJEVE IMUNOLOGJIKE TË REALIZUARA ME APARATURAT: COBAS 6000 (ROCHE HITACHI), CHORUS (DIESSE), MINI-VIDAS 2000 (BIO-MEREUX) DHE ELISA EUROIMMUN"**

Udhëheqës shkencor: **Prof. As. Anila Mitre**

Mbrohet më datë:_____ para Jurisë:

1. _____ , **Kryetar**
2. _____, **Oponent**
3. _____, **Oponent**
4. _____, **Anëtar**
5. _____, **Anëtar**
6. _____, **Anëtar**

Tiranë, 2014

REPUBLIKA E SHQIPËRISË
UNIVERSITETI I TIRANËS
FAKULTETI I SHKENCAVE TË NATYRËS
DEPARTAMENTI I BIOLOGJISË

Adresa : Bulevardi Zogi I, Tiranë, Tel/Fax: 042229590
www.fshn.edu.al

STUDIMI I KRAHASUAR I MATJEVE IMUNOLOGJIKE TË REALIZUARA ME APARATURAT: COBAS 6000 (ROCHE HITACHI), CHORUS (DIESSE), MINI-VIDAS 2000 (BIO-MEREUX) DHE ELISA EUROIMMUN

KANDIDAT
BLERTA LAZE

UDHËHEQËS SHKENCOR
PROF. As. ANILA MITRE

TIRANË 2014

PËRMBLEDHJE

Çdo ditë e më tepër vihet re një rritje e sëmundshmërisë nga faktorët infektivë, vendin kryesor mes të cilëve e zenë infeksionet virale dhe bakteriale, mjaft e ndjeshme në nënat shtatëzëna, infektimi i të cilave në tre mujorin e parë sjell probleme për fetusin që është duke u formuar. Për këtë arsye objekti i studimit tonë ishin gratë shtatëzëna dhe infektimi i tyre me *Citomegalovirusin* dhe *Toxoplasma gondii*. Testimi i tyre u realizua vetëm për antitrupat IgM me aparaturat COBAS 6000, MINI-VIDAS, CHORUS dhe ELISA EUROIMMUN. Në tregun e diagnostikës mjekësore, gjithmonë e më tepër hidhen aparatura të reja të cilat tërheqin klientët edhe për shkak të kostos dhe shpejtësisë së diagnostikimit, por që specificiteti dhe ndjeshmëria e tyre janë të ndryshme. Në rastin e infeksioneve të toxoplasmës dhe citomegalovirusit, situata është më e komplikuar për shkak të reaksioneve të kryqëzuara që shfaqin antitrupat kundrejt epitopeve të ngjashme antigjenike. Në këtë studim janë analizuar 400 mostra me teknikat e mësipërme, rezultatet janë përpunuar nga ana statistikore dhe u arrit në përfundimin se teknika më e përshtatshme për diagnostikimin e infeksioneve të toxoplasmës dhe citomegalovirusit në gratë shtatëzëna është ECL në kombinim me teknikën ELISA EUROIMMUN. Ndërsa, aparati CHORUS nuk e arrin një cilësi të tillë dhe nuk rekomandohet për testime të grave shtatëzëna, por rezultatet e tij duhet të verifikohen me teste të tjera alternative si ECL dhe ELISA EUROIMMUN.

Fjalë kyçe: *Ndjeshmëri, specificitet, antitrupa, COBAS 6000, MINI-VIDAS, ELISA EUROIMMUN, ELISA CHORUS.*

ABSTRACT

Nowdays it is noticed an increase in morbidity from infectious factors, among which the principal place is occupied by viral and bacterial infections. This is quite sensitive in pregnant women, whose infection in the first trimester causes malformation of the fetus that is being formed. For this reason the aim of our study were pregnant women and their infection with *Cytomegalovirus* and *Toxoplasma gondii*. Their screening is conducted only for IgM antibodies with Cobas 6000, MINI-VIDAS, CHORUS and ELISA EUROIMMUN instruments. In medical diagnostics market, more and more new devices are added which also attract customers because of the cost and speed of diagnosis, but their specificity and sensitivity differ. This is more complicated in cases of *Toxoplasma gondii* and *Cytomegalovirus* because of cross reactions that exhibit their antibodies against similar antigenic epitopes. In this study, 400 samples were analyzed with the above techniques, the results are statistically processed and it was concluded that the most appropriate techniques for the diagnosis of *Cytomegalovirus* and *Toxoplasma gondii* infections in pregnant women is ECL in combination with ELISA EUROIMMUN technique. While, CHORUS instrument does not reach such quality and is not recommended for screening of pregnant women, so its results should be confirmed with other tests such as ECL and ELISA EUROIMMUN.

Key words: *Sensitivity, specificity, antibodies, COBAS 6000, MINI-VIDAS, ELISA EUROIMMUN, ELISA CHORUS.*

PASQYRA E LËNDËS

		Faqe
	Pasqyra e lëndës	I
	Përmbajtja e materialit tabelor	III
	Përmbajtja e figurave	V
	Lista e shkurtimeve	VII
	Parathënie	VIII
	Qëllimi i studimit	IX
	KREU 1: PJESA TEORIKE	1
1.1	Njohuri të përgjithshme mbi *Toxoplasma gondii*	1
1.2	Njohuri të përgjithshme mbi Citomegalovirusin	4
1.3	Njohuri të përgjithshme mbi sistemin COBAS 6000	6
1.3.1	Avantazhet e aparatit COBAS 6000	7
1.3.2	Teknologjia ECL	9
1.3.2.1	Parimet e metodave imunokimike në teknologjinë ECL	9
1.3.2.2	Reaksioni elektrokemiolumineshent	10
1.4	Njohuri të përgjithshme mbi sistemin VIDAS	14
1.4.1	Sistemi analitik Vidas	15
1.4.2	Metodat e përdorura në aparatin VIDAS	16
1.4.3	Avantazhet e aparatit MINI-VIDAS	18
1.5	Njohuri të përgjithshme mbi sistemin CHORUS	19
1.5.1	Testi i Fiksimit të Komplementit në aparatin CHORUS	20
1.5.2	ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) në aparatin CHORUS	20
1.5.3	Avantazhet e aparatit CHORUS	23
1.7	ELISA (EUROIMMUN)	23
	KREU 2. MATERIALE DHE METODA	25
2.1	Materiale dhe metoda në Sistemin COBAS 6000	28
2.1.1	Përshkrimi i proçedurës së matjes në aparatin COBAS 6000	28
2.1.2	Parimet e metodave imunokimike në teknologjinë ECL	29
2.1.3	Reagentët Elecsys Toxo IgM dhe Elecsys CMV IgM	30
2.1.4	Kitet e kalibratorëve Elecsys calset	31
2.1.5	Kitet e kontrollit Roche Precicontrol Toxo IgM dhe CMV IgM	33
2.1.6	Normat e rezultateve në aparatin COBAS 6000	34
2.2	Materiale dhe metoda në sistemin MINI-VIDAS	34
2.2.1	Proçedura e matjes në aparatin MINI-VIDAS	34
2.2.2	Teknika ELFA	35
2.2.3	Kitet e reagentëve Vidas Toxo IgM dhe CMV IgM	37
2.2.4	Normat e rezultateve në aparatin MINI-VIDAS	41
2.3	Materiale dhe metoda në sistemin CHORUS	42
2.3.1	Proçedura në testin ELISA CHORUS	42
2.3.2.	Reagentët CHORUS ELISA TOXO IgM dhe CMV IgM	43
2.3.3	Normat e rezultateve për teknikën ELISA në aparatin CHORUS	44
2.4	Materiale dhe metoda në teknikën ELISA EUROIMMUN	45
2.4.1	Proçedura në teknikën ELISA EUROIMMUN	45
2.4.2	Përbërja e kiteve në teknikën ELISA EUROIMMUN	46
2.4.3	Normat e rezultateve për teknikën ELISA EUROIMMUN	47
	KREU 3. REZULTATE DHE DISKUTIME	48
3.1.	Rezultatet e matjes së antitrupave anti-Toxoplasma IgM me teknikat ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN.	48
3.2	Rezultatet e matjes së antitrupave anti-Toxoplasma IgM me teknikat ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN.	57
3.3	Diskutime	66

PËRFUNDIME 76
FALENDERIME 77
LITERATURA 78
PËRMBLEDHJE 88
LISTA E PUBLIKIMEVE 89

PËRMBAJTJA E MATERIALIT TABELOR

Tabela 1-1	Testet e rekomandueshme për diagnozën e *Toxoplasma gondii*	3
Tabela 1-2	Testet e rekomandueshme për diagnozën e Citomegalovirusit	6
Tabela 3-1	Rezultatet e përmbledhura të teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.	48
Tabela 3-2	Rezultatet e mostrave pozitive dhe negative për antitrupat anti-Toxoplasma IgM me teknikat ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN.	48
Tabela 3-3	Rezultatet e ndjeshmërisë dhe specificitetit të teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN, për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.	49
Tabela 3-4	Rezultatet e analizës së variancës të teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN, për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.	49
Tabela 3-5	Rezultatet e korrelacionit ndërmjet teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM	50
Tabela 3-6	Rezultatet e analizës së variancës të teknikave ECL dhe ELFA për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM	51
Tabela 3-7	Rezultatet e analizës së variancës të teknikave ECL dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM	52
Tabela 3-8	Rezultatet e analizës së variancës të teknikave ECL dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM	53
Tabela 3-9	Rezultatet e analizës së variancës të teknikave ELFA dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM	54
Tabela 3-10	Rezultatet e analizës së variancës të teknikave ELFA dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM	55
Tabela 3-11	Rezultatet e analizës së variancës të teknikave ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM	56
Tabela 3-12	Rezultatet e përmbledhura të teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM	57
Tabela 3-13	Rezultatet e mostrave pozitive dhe negative për antitrupat anti-Citomegalovirus me teknikat ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN	57
Tabela 3-14	Rezultatet e ndjeshmërisë dhe specificitetit të teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN, për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM	58
Tabela 3-15	Rezultatet e analizës së variancës të teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM	58
Tabela 3-16	Rezultatet e korrelacionit ndërmjet teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM	59
Tabela 3-17	Rezultatet e analizës së variancës të teknikave ECL dhe ELFA për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM	60
Tabela 3-18	Rezultatet e analizës së variancës të teknikave ECL dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM	61
Tabela 3-19	Rezultatet e analizës së variancës të teknikave ECL dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM	62

Tabela 3-20	Rezultatet e analizës së variancës të teknikave ELFA dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM	63
Tabela 3-21	Rezultatet e analizës së variancës të teknikave ELFA dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM	64
Tabela 3-22	Rezultatet e analizës së variancës të teknikave ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM	65
Tabela 3-23	Paraqitja e vlerave të koefiçientit AUC për teknikat e përdorura për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM	70
Tabela 3-24	Paraqitja e vlerave të koefiçientit AUC për teknikat e përdorura për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM	71

PËRMBAJTJA E FIGURAVE

Figura 1-1	Cikli jetësor i *Toxoplasma gondii*	1
Figura 1-2	Kinetika e përgjigjes së antitrupave ndaj *Toxoplasma gondii*	3
Figura 1-3	Cikli jetësor i Citomegalovirusit	5
Figura 1-4	Mundësitë e zhvillimit të dëmtimeve të sistemit nervor në fëmijët e prekur me Citomegalovirus kongjenital	5
Figura 1-5	Fotografi e aparatit Cobas 6000 Roche Hitachi	6
Figura 1-6	Pjesët kryesore të cobas e 601: A. Gjilpëra sipper, B. Disku i reagentëve, C. Dhoma e matjes, D. Raket me kupa dhe gjilpëra, E. Dhoma e mbeturinave	8
Figura 1-7	Parimet e metodave imunokimike në teknologjinë ECL (COBAS 6000).	9
Figura 1-8	Përdorimi i kompleksit të ruteniumit në teknologjinë ECL	10
Figura 1-9	Gjëndjet e kompleksit të ruteniumit gjatë reaksionit ECL. a).Gjendja bazë e ruteniumit. b). Gjendja e eksituar e ruteniumit.	11
Figura 1-10	Fazat e amplifikimit të sinjalit në reaksionin ECL	11
Figura 1-11	Reaksioni ECL në dhomën e matjes	12
Figura 1-12	Gjenerimi i sinjalit të ECL-së.	13
Figura 1-13	Dhoma e matjes në teknikën ECL	14
Figura 1-14	Aparati Minividas	14
Figura 1-15	a) Hapja e kutisë së stripeve. b) Kanalet ku vendosen stripet e reagentëve	16
Figura 1-16	Metoda EIA indirekte	16
Figura 1-17	Matja e IgM-ve (Imunozbulimi)	17
Figura 1-18	Matja e antigeneve (Parimi Sandwich)	17
Figura 1-19	Matja e hapteneve (Parimi krahasues)	18
Figura 1-20	Fotografi e aparatit CHORUS	19
Figura 1-21	Vendosja e reagentëve në sistemin CHORUS	21
Figura 1-22	Metoda krahasuese në aparatin CHORUS	21
Figura 1-23	Stripi i reagentëve që zhvillojnë metodën krahasuese	22
Figura 1-24	Metoda indirekte e modifikuar në aparatin CHORUS	22
Figura 1-25	Stripi i reagentëve që zhvillojnë metodën indirekte të modifikuar	23
Figura 1-26	Fotografi e aparatit Tecan	24
Figura 2-1	Formular për të dhënat e grave shtatëzëna të përfshira në studim.	26
Figura 2-2	Parimi bridging	29
Figura 2-3	Reagentët Elecsys. a) Reagenti Elecsys Toxo IgM; b) Reagenti Elecsys CMV IgM	31
Figura 2-4	Kalibratorët cobas e analyzer të markuar me barkod dydimensional	32
Figura 2-5	Kitet Calset Elecsys a) Kalibratorët Cal1 TOXO M dhe Cal2 TOXO M. b) Kalibratorët Cal1 CMV M dhe Cal2 CMV M	32
Figura 2-6	Precicontroll CMV M 1 dhe Precicontroll CMV M 2	34
Figura 2-7	Përmbajtja e një stripi reagenti në sistemin VIDAS	35
Figura 2-8	Metoda EIA indirekte në aparatin MINI-VIDAS	36
Figura 2-9	Leximi fluoreshent në sistemin Vidas	37
Figura 2-10	Strip reagenti tek Vidas Toxoplasma	37
Figura 2-11	Stripi çift i reagentëve Vidas Toxo G dhe Toxo A	38
Figura 2-12	Etiketat e një stripi reagent Vidas	39
Figura 2-13	Kutia e stripeve të reagentëve Vidas	39
Figura 2-14	Skema e një SPR-je	40
Figura 2-15	Blloku SPR	40
Figura 2-16	Kyveta optike në një strip reagenti Vidas	41
Figura 2-17	Metoda indirekte në aparatin CHORUS	43

Figura 2-18	Fotografi e reagentit CHORUS Toxo IgM	43
Figura 2-19	Pusetat e testit ELISA EUROIMMUN, pas zhvillimit të reaksionit që shprehet me ngjyrë të verdhë	46
Figura 3-1	Skategrama e teknikave ECL dhe ELFA për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.	51
Figura 3-2	Skategrama e teknikave ECL dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.	52
Figura 3-3	Skategrama e teknikave ECL dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.	53
Figura 3-4	Skategrama e teknikave ELFA dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.	54
Figura 3-5	Skategrama e teknikave ELFA dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.	55
Figura 3-6	Skategrama e teknikave ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.	56
Figura 3-7	Skategrama e teknikave ECL dhe ELFA për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.	60
Figura 3-8	Skategrama e teknikave ECL dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.	61
Figura 3-9	Skategrama e teknikave ECL dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.	62
Figura 3-10	Skategrama e teknikave ELFA dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.	63
Figura 3-11	Skategrama e teknikave ELFA dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.	64
Figura 3-12	Skategrama e teknikave ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.	66
Figura 3-13	Paraqitja grafike e ndjeshmërisë të teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.	67
Figura 3-14	Paraqitja grafike e specificitetit të teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.	68
Figura 3-15	Paraqitja grafike e ndjeshmërisë të teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.	68
Figura 3-16	Paraqitja grafike e specificitetit të teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.	69
Figura 3-17	Paraqitja e grafikëve ROC të teknikave të përdorura për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM	69
Figura 3-18	Paraqitja e grafikëve ROC të teknikave të përdorura për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM	70

LISTA E SHKURTIMEVE

T.gondii	Toxoplasma gondii
CMV	Citomegalovirus
Toxo IgM	Imunoglobulinat M specifike ndaj Toxoplasma gondii
CMV IgM	Imunoglobulinat M specifike ndaj Citomegalovirusit
Toxo IgG	Imunoglobulinat G specifike ndaj Toxoplasma gondii
CMV IgG	Imunoglobulinat G specifike ndaj Citomegalovirusit
ADN	Acidi dezoksiribonukleik
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
Ag	Antigen
At	Antitrup
Fab	Fragmenti antigjen lidhës i antitrupit
ECL	Elektrokemilumineshenca
ELFA	Enzyme Linked Fluorescent Assay. Teknika fluoreshente imunoenzimatike
SPR	Faza solide në sistemin Vidas (Solid Phase Receptacle)
EIA	Teknika imunoenzimatike
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Testi imunoenzimatik
HRP	Peroksidaza Horseradish
TMB	Tetrametibenzidina
ANOVA	Anaiza njëfaktoriale e variancës
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
IgA	Imunoglobulina A
NIST	Instituti Kombëtar i Standarteve dhe Teknologjisë
RFV	Vlera relative e fluoreshencës
TV	Vlera e testit
FV	Vlera e fluoreshencës
ROC	Kurbat Receiver operating characteristic
AUC	Hapësira nën kurbë (area under the curve)
CFT	Testi i fiksimit të komplementit
ELISA (C)	ELISA (CHORUS)
ELISA (E)	ELISA (EUROIMMUN)

Parathënie

Në gusht të vitit 1975 Milstein dhe Kohler, përshkruan një metodë për prodhimin e antitrupave monoklonalë (fitues të cmimit Nobel, për këtë punim). Këta antitrupa hapën një epokë të re në analizat biokimike dhe diagnostikën mjekësore, thelbi i të cilave qëndron në markimin e antigenit ose antitrupit dhe formimin e kompleksëve antitrup-antigen. Në varësi të tipit të markimit në tregun ndërkombëtar, sot edhe në tregun shqipëtar, janë në përdorim teknika të ndryshme si elektrokemiolumineshenca, ELISA, ELFA, imunofluoreshenca, etj, të cilat dallojnë nga njëra-tjetra nga ndjeshmëria dhe specificiteti. Çdo ditë e më tepër dalin në treg teknika të reja të cilat tentojnë të jenë sa më të lira dhe të thjeshta në përdorim. Në momente të caktuara duhet që ndjeshmëria dhe specificiteti të jenë të larta, sepse një zbulim jo i saktë në gratë shtatëzëna mund të sjellë lindjen e fëmijëve me anomali që shoqërohet me kosto për familjen dhe shoqërinë. Për këtë arsye menduam të krahasojmë katër teknika të ndryshme duke përdorur kitet Toxoplasma IgM dhe Citomegalovirus IgM.

Për arsyet e sipërpërmendura në diagnostikën mjekësore po punohet gjithnjë e më shumë për studimin dhe vënien në dukje të teknikave më të ndjeshme dhe më specifike për sa i përket zbulimit të reaksioneve antigen-antitrup, në kuadrin e të cilit është zhvilluar edhe ky studim.

Në literaturë theksohet se teknika më e ndjeshme dhe specifike është PCR-ja. Por, realizimi i kësaj teknike është i kushtueshëm dhe kërkon kohë të gjatë. Për këtë arsye vëmendja është përqëndruar në studimin e teknikave serologjike, më pak të kushtueshme dhe të shpejta në nxjerrjen e rezultateve. Në këtë studim është realizuar matja e antitrupave anti-Toxoplasma IgM dhe anti-Citomegalovirus IgM në mostrat e marra nga paciente femra në tre mujorin e parë të shtatëzanisë, me teknikat ECL, ELFA dhe ELISA. Rezultatet i janë nënshtruar përpunimit statistikor dhe është vlerësuar ndjeshmëria dhe specificiteti për secilën teknikë.

Qëllimi i studimit:

Testimi i ndjeshmërisë dhe specificitetit të disa teknikave, që përdoren në diagnostikë: Elektrokemiolumineshenca, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN).

Objektivat:

- Përcaktimi i ndjeshmërisë dhe specificitetit të teknikave serologjike Elektrokemiolumineshenca, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.
- Përcaktimi i ndjeshmërisë dhe specificitetit të teknikave serologjike Elektrokemiolumineshenca, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.
- Renditja e teknikave sipas rezultateve të marra dhe përpunimit statistikor.
- Përcaktimi i teknikave nëpërmjet të cilave arrihet saktësia maksimale.

KREU 1. PJESA TEORIKE

1.1. Njohuri të përgjithshme mbi *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii është një parazit brendaqelizor, pjesëtar i rendit Apikomplexa, i kudo gjendur me një gamë të gjerë bujtarësh. Ky parazit mund të transmetohet prej oocisteve të maturuara, të shpërndara në ujë ose ushqim kryesisht prej maceve ose prej mishit të papjekur e të papërpunuar (fig 1-1) *(Montoya J. G dhe O. Liesenfeld., 2004).* Toxoplazmoza është një sëmundje e zakonshme dhe një problem i shëndetit publik në mbarë botën, sidomos në nënat shtatëzëna. Për shkak të infeksioneve akute dhe riaktivizime të shkaktuara nga *Toxoplasma gondii*, duhen marrë parasysh edhe prevalencat e këtij patogjeni. Sipas të dhënave të fundit, në Europë seroprevalenca varion nga 20 % në Europën veriore në më shumë se 60 % në Europën jugore dhe rreziku i transmetimit të toxoplasmosës gjatë shtatëzanisë është afërsisht 29 % *(Andrea-Romana Prusa et al., 2012).* Në Shqipëri, këto të dhëna janë të pakta. Në vitin 2008, Instituti i shëndetit publik në Tiranë, në bashkëpunim me Klinikën e Sëmundjeve Infektive të Universitetit të Barit, kanë realizuar një studim në qytetet Tiranë, Durrës, Shkodër dhe Vlorë për vlerësimin e prevalencës së toxoplazmozës në nënat shtatëzëna, e cila rezultoi 48.6 % *(Paolo Maggi, et al., 2008).*

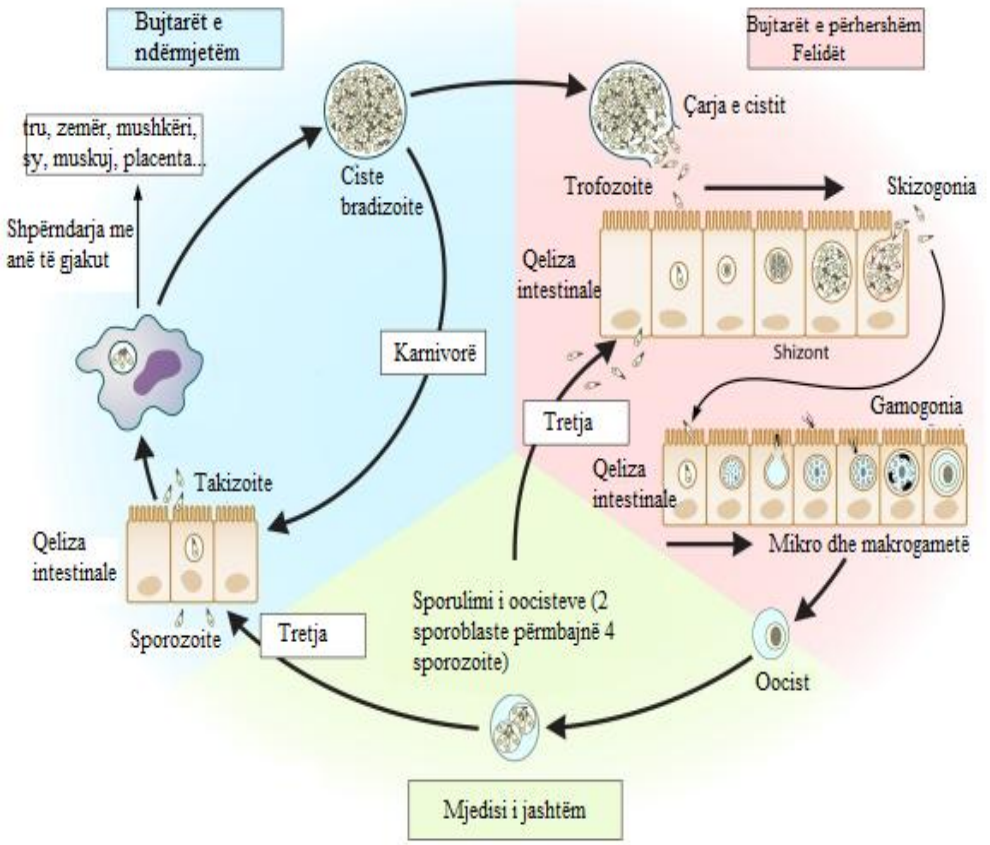


Figura 1-1: Cikli jetësor i *Toxoplasma gondii (Florence Robert-Gangneux and Marie-Laure Dardé, 2012*).

Gjithashtu në vitin 2008 është realizuar një studim që përfshinte 35 shtete të Europës, për vlerësimin e prevalencës së toxoplazmozës kongjenitale. Ky studim përfshinte edhe vendin tonë, por 7 shtete, një prej të cilëve edhe Shqipëria nuk iu përgjigjën këtij studimi *(Antoine Bénard, et al., 2008).*

T. gondii gjendet në tre forma: oociste, takizoide dhe bradizoide. Replikimi i tyre realizohet në bujtarët përfundimtar, zakonisht në pjesëtarët e familjes Felidae, prej të cilëve prodhohen oocistet *(Dubey JP et al., 2011).* Por, ato mund të kalojnë edhe te njerëzit nëpërmjet ushqimeve të infektuara me feçet e kafshëve. Në këtë rast, oocistet zhvillohen në takizoite, e cila është forma më e shpejtë e shumëfishimit të *T. Gondii.* Kështu, takizoidet shumohen duke shkaktuar shkatërrimin e indeve dhe përhapjen e infeksionit. Takizoidet në femrat shtatëzëna mund të infektojnë fetusin sepse kalojnë nëpërmjet qarkullimit të gjakut në inde të ndryshme, sy dhe sistemin nervor qëndror. Në disa gjitarë të infektuar, cistet mund të qëndrojnë gjithë jetën të përqëndruara në indin muskulor dhe në sistemin nervor qëndror ku shndërrohen në ciste indore ose bradizoite. Kjo mendohet të ndodhë si përgjigje e sistemit imun të bujtarit. Konsumimi i produkteve të infektuara të mishit është një burim infeksioni, sepse bradizoidet transformohen përsëri në takizoide. Është raportuar gjithashtu, se ky parazit mund të përhapet edhe nëpërmjet ujit të pijshëm të kontaminuar me oociste *(Ariel Many et al., 2006).*

Fillimisht, infeksioni akut i cili shfaqet shpeshherë pa simptoma, shoqërohet nga një infeksion i mëvonshëm që qëndron gjatë gjithë jetës. Toxoplazmoza është veçanërisht e rrezikshme gjatë shtatëzanisë, meqënëse transmetohet nga nëna te fetusi. Femrat të cilat infektohen me këtë parazit para shtatëzanisë, zakonisht nuk e transmetojnë atë te fetusi. Ndërsa, nënat që infektohen gjatë shtatëzanisë mund ta transmetojnë patogjenin te fetusi. Për këtë arsye është i rëndësishëm përcaktimi i titrit të antitrupave ndaj *T. gondii* përpara fillimit të një shtatëzanie *(Ariel Many et al., 2006).*

Infeksioni fillestar gjatë shtatëzanisë mund të çojë në dëmtime serioze të fetusit. Manifestimet klinike të toxoplazmozës variojnë në fetuse dhe të sapolindurit. Shumica e fëmijëve me infeksion kongjenital nuk shfaqin simptoma të jashtme pas lindjes por mund të zhvillojnë më vonë pasoja të rënda si vonesa mendore e psikomotore, humbje dëgjimi dhe vështirësi në proçesin e të mësuarit (*Antoine Bénard dhe Eskild Petersen, 2008).* Në disa fëmijë mund të shfaqen hidrocefalit, korioretinit dhe kalçifikime intrakraniale. Në shumicën e të sapolindurve të infektuar me *T.gondii* shfaqen çrregullime si hepatosplenomegalia, trombocitopenia, mikrocefalia, ethe dhe konvulsione. Shkalla e infeksionit fetal rritet me moshën e barrës. Por, rreziku i disa manifestimeve klinike është më i lartë në rastet e infeksioneve të hershme maternale (*Montoya J. G dhe O. Liesenfeld, 2004; Nielsen H. V et al., 2005; Thalib L et al., 2005).* Është raportuar se rreziku për transmetimin e toxoplazmozës kongjenitale është më i ulët nëse infeksioni shfaqet në tre mujorin e parë të shtatëzanisë, por agresiviteti i infeksionit është më i lartë. *(Ariel Many et al., 2006).*

Në ditët e sotme, po aplikohen gjithmonë e më shumë teknikat serologjike për diagnozën e toksoplazmozës, veçanërisht për diagnozën e hershme kongjenitale, për të cilën kërkohen teste serologjike shumë të ndjeshme *(Yera H et al., 2009).* Diagnoza e toksoplazmozës, zakonisht përcaktohet nga matja e antitrupave specifikë anti-Toxoplasma IgG ose IgM. Matja e antitrupave anti-Toxoplasma IgM shpreh një infeksion akut ose riaktivizim të mundshëm.

Antitrupat IgM ndaj Toxoplasma gondit shfaqen 1-2 javë pas shfaqjes së infeksionit, arrijnë pikun pas 6-8 javësh dhe zvogëlohen pas 6 muajsh (fig 1-2). *(Florence Robert-Gangneux and Marie-Laure Dardé, 2012*)

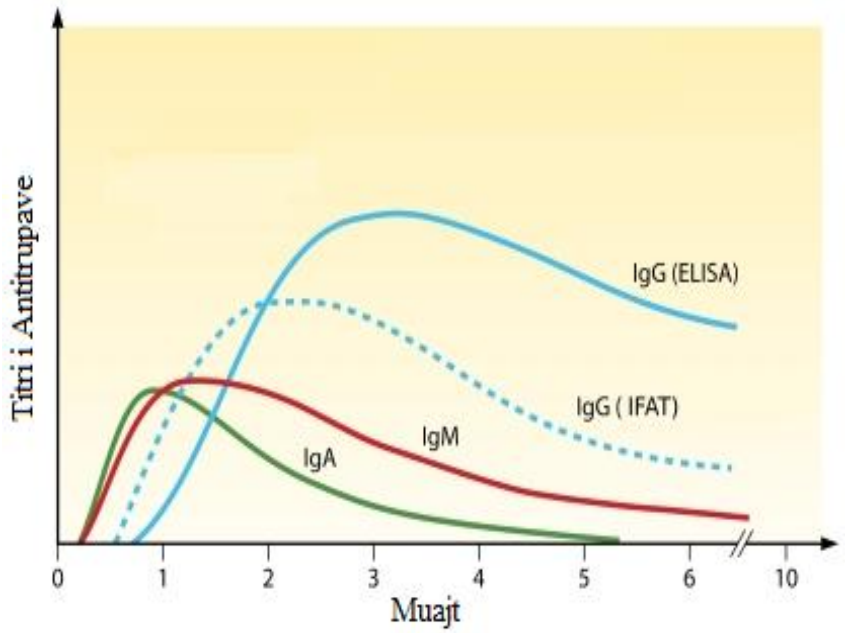
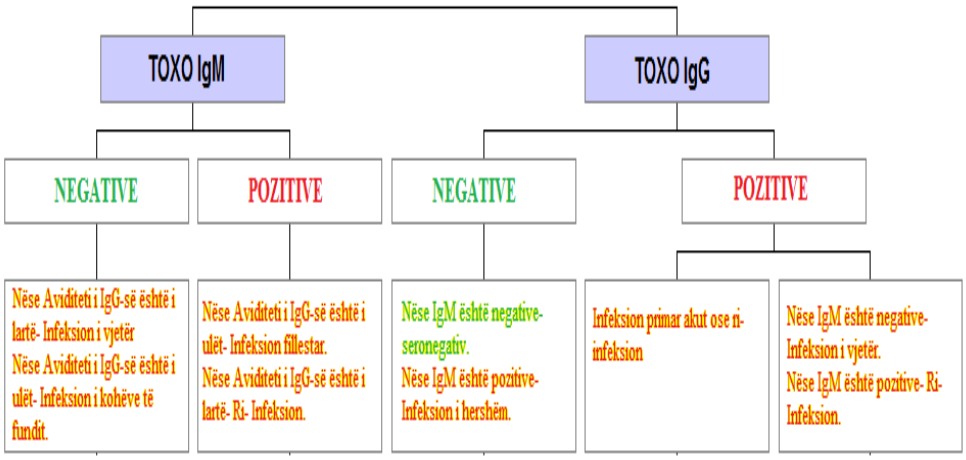


Figura 1-2: Kinetika e përgjigjes së antitrupave ndaj *Toxoplasma gondii (Florence Robert-Gangneux and Marie-Laure Dardé, 2012*).

Në tabelën 1-1 shprehen testet e rekomandueshme për diagnozën e *Toxoplasma gondi*, e cila mund të realizohet nëpërmjet analizimit të indeve (gjak, palca e kockave, fluidi cerebrospinal ose placenta), kulturave indore ose teknikës PCR.

Tabela 1-1: Testet e rekomandueshme për diagnozën e *Toxoplasma gondii*.



1.2. Njohuri të përgjithshme mbi Citomegalovirusin

Citomegalovirusi është një virus që përmban ADN me zinxhirë të dyfishtë, pjesëtar i familjes së herpesviruseve humane. Nëse krahasohet me pjesëtarët e tjerë të kësaj familje, vihet re se është virusi me përmasa më të mëdha me një gjenomë prej 235 kb *(Tania Crough dhe Rajiv Khanna, 2009)*. Ky virus gjendet kudo në popullatat humane, duke shkaktuar infeksione që shoqërojnë bujtarin gjatë gjithë jetës me riinfeksione dhe riaktivizime rastësore ose jo, sidomos pas transplanteve. Transmetimi i infeksionit kërkon kontakt të drejtpërdrejtë me sekrecione të infektuara si pështyma, urina, sekrecione vaginale e cervikale, sperma, qumështi i gjirit dhe gjaku *(Cheeran M et al., 2009).* Në përgjithësi, infeksionet e shkaktuara nga Citomegalovirusi janë pa simptoma. Megjithatë, infeksionet maternale gjatë shtatëzanisë shoqërohen me një rrezik të lartë të transmetimit intrauterin, duke rezultuar në dëmtime fetale që përfshijë rritjen dhe zhvillimin mendor. Rreziku i dëmtimeve të sistemit nervor qëndror të fëmijëve që lindin me infeksion kongjenital zvogëlohet me moshën e shtatëzanisë së nënës (fig 1-4). Rreziku më i lartë është në tre mujorin e parë të shtatëzanisë (80 %), në tre mujorin e dytë mundësia e dëmtimeve zvogëlohet në më pak se 10 %, ndërsa në tre mujorin e fundit mundësia zvogëlohet deri në 0 *(Kenneson and Cannon, 2007)*). Është raportuar se 10-15 % të fëmijëve që lindin me infeksion kongjenital do të kenë çrregullime si mikrocefali, hepatosplenomegali, njolla në lëkurë, korioretinit, trombocitopeni dhe anemi. Gjithashtu, 20%-30% të këtyre fëmijëve mund të vdesin për shkak të koagulimit intravaskular, disfunksionit të mëlçisë ose superinfeksionit bakterial *(Silvia B et al., 2011).* Të dhënat në lidhje me seroprevalencën e Citomegalovirusit në Shqipëri janë më të pakta se për Toxoplasma gondii. Prevalenca e Citomegalovirusit në popullatën e dhuruesve të gjakut në Tiranë *(Seferi Irena, et al., 2009)*, është mjaft e lartë nëse e krahasojme me prevalencën në botë 0.15-3 % *(Van Helden J, et al, 2009).* Ndërsa seroprevalenca e këtij virusi në Shtetet e Bashkuara të Amerikës është 60 % *(Cheeran et al., 2009).*

Në figurën 1.3. paraqitet cikli jetësor i Citomegalovirusit. Virusi hyn në qelizat humane nëpërmjet fuzionit të drejtpërdrejtë ose rrugës endocitike. Atashimi i virusit në membranën qelizore humane realizohet nëpërmjet ndërveprimit të një receptori specifik sipërfaqësor të qelizës humane me glikoproteinat virale. Kjo shoqërohet me çlirimin e nukleokapsidit në citoplazmën e qelizës humane. Nukleokapsidet translokohen në bërthamë, ku çlirohet ADN-ja virale e cila i nënshtrohet replikimit. Ky proçes shoqërohet me stimulimin e funksioneve sintetizuese virale, duke u pasuar me inkapsulimin e ADN-së virale në kapside. Kapsidet transportohen në citoplazëm ku vishen me një shtresë të dytë prej kompleksit Rrjet endoplazmatik-Ap Golxhi dhe çlirohen nga qeliza nëpërmjet ekzocitozës *(Tania Crough and Rajiv Khanna, 2009*).

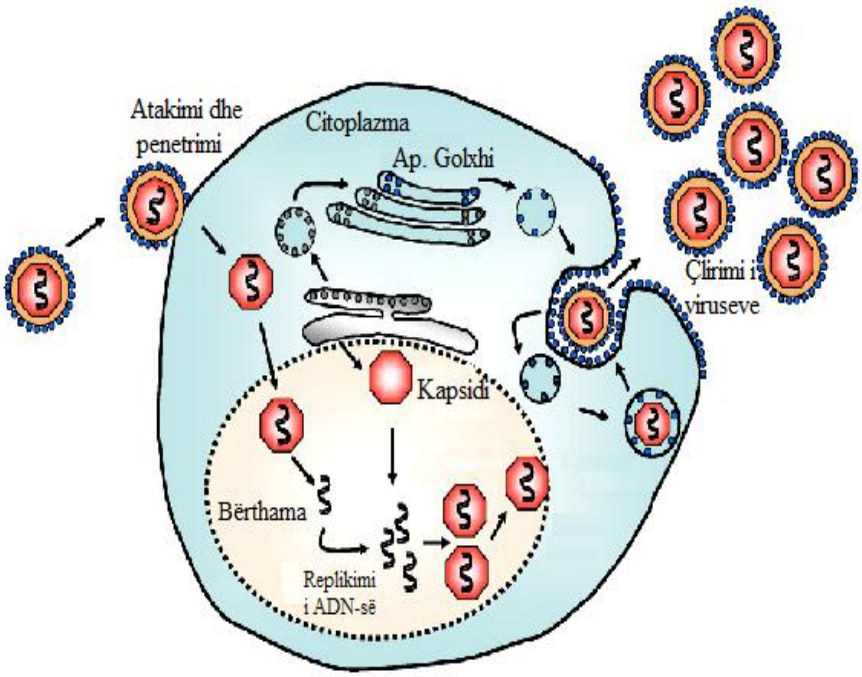


Figura 1-3: Cikli jetësor i Citomegalovirusit *(Tania Crough and Rajiv Khanna, 2009*).

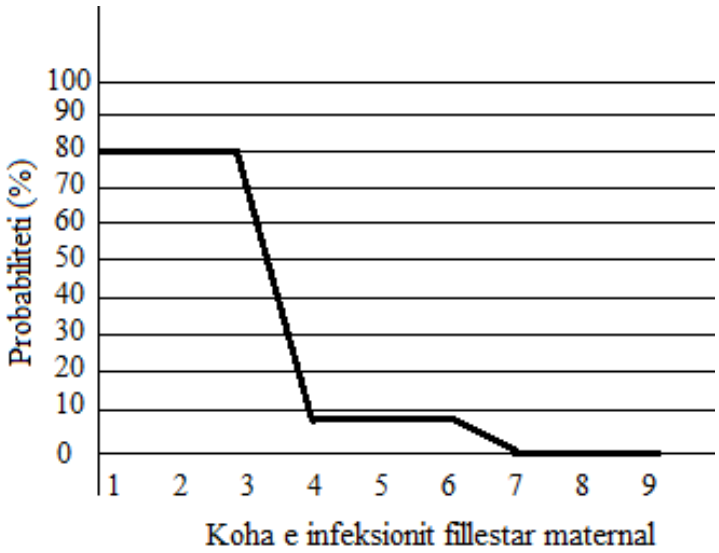
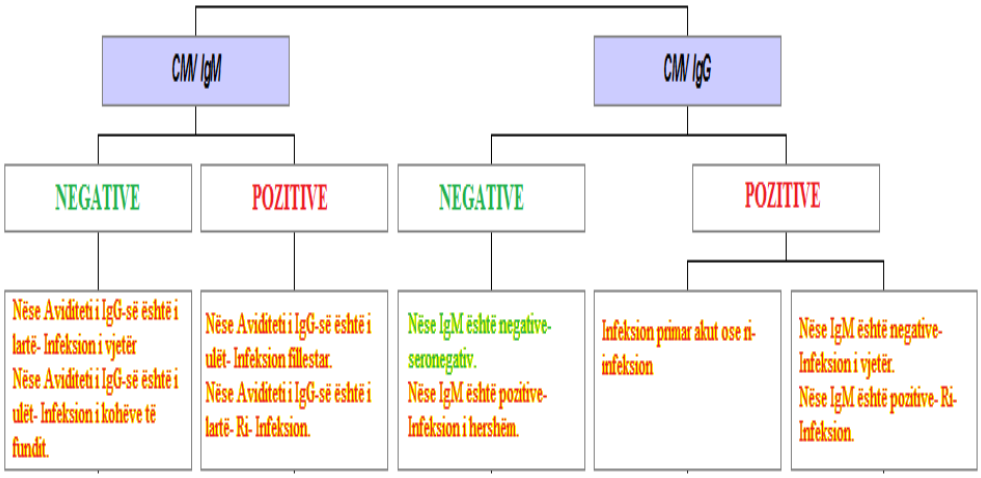


Figura 1-4: Mundësitë e zhvillimit të dëmtive të sistemit nervor në fëmijët e prekur me Citomegalovirus kongjenital *(Kenneson and Cannon, 2007).*

Hapi i parë në diagnozën e infeksioneve të Citomegalovirusit është matja e antitrupave specifikë anti-Citomegalovirus IgG dhe IgM. Mostrat pozitive për antitrupat IgM shprehin një infeksion akut, ose një riaktivizim të mundshëm.

Në tabelën 1-2 shprehen testet e rekomandueshme për diagnozën e Citomegalovirusit.

Tabela 1-2: Testet e rekomandueshme për diagnozën e Citomegalovirusit.



1.3. Njohuri të përgjithshme mbi sistemin COBAS 6000

Figura 1-5: Fotografi e aparatit Cobas 6000 Roche Hitachi (foto: B. Laze).

Cobas 6000 përfshin një sistem automatik dhe plotësisht të kontrolluar i cili është programuar për vlerësime cilësore dhe sasiore të një varieteti të gjerë testesh. Ky sistem është i përbërë nga dy pjesë: cobas c 501 realizon analizat biokomike me testin

e turbidimetrisë dhe cobas e 601 realizon analizat me teknikën e elektrokemioluminishencës. Përdorimi i këtij sistemi është i lehtë dhe minimizon në maksimum gabimet, pasi reagentët, kalibratorët dhe kontrollet janë të pajisur me barkod dydimensional. Ky barkod lejon regjistrim plotësisht automatik dhe menaxhim të informacionit për reagentët dhe mostrat, duke moslejuar regjistrimin e reagentëve të skaduar. Në këtë studim është përdorur teknika e elektrokemiolumineshencës e cila bazohet në përqëndrimin e antitrupave të pranishme në mostër. Përqëndrimi i antitrupave është në përpjestim të drejtë me sasinë e dritës së prodhuar nga reaksioni kemoilumineshent *(Roche Diagnostics, Operator's manual, Version1,0).*
Sistemi Cobas 6000 bazohet edhe në aftësitë e përdoruesit, i cili performon të gjitha proçedurat e nevojshme për realizimin e matjeve, kalibrimeve dhe kontrolleve.

1.3.1. Avantazhet e aparatit COBAS 6000

- Kërkohet shumë pak proçedura manuale.
-Përdorimi i këtij sistemi është i lehtë dhe minimizon në maksimum gabimet, pasi reagentët, kalibratorët dhe kontrollet janë të pajisur me barkod dydimensional. Ky barkod lejon regjistrim plotësisht automatik dhe menaxhim të informacionit për reagentët dhe mostrat, duke moslejuar regjistrimin e reagentëve të skaduar.
-Lehtësi dhe rrjedhshmëri të punës nëpërmjet përdorimit të rakeve dhe tubave me barkode për mostrat duke siguruar edhe regjistrim automatik të testeve nëpërmjet barkodeve përkatëse.
-Pajisja e këtij sistemi me mekanizmat e duhur që parandalojnë ndërprerjen e matjes duke u shoqeruar me rezultate të besueshme në një kohë të shkurtër.
-Pajisja e aparatit me një dhomë reagentësh, temperatura e së cilës mbahet e qëndrueshme (20±3°C) duke lejuar ruajtjen e tyre.
-Matja e më shumë se 25 testeve njëkohësisht.
-Në këtë sistem përdoret teknika e Elektrokemioluminishencës (ECL), një teknologji shumë e re që ofron avantazhe të përcaktuara krahasuar me teknologjitë e tjera.
-Përdorimi i substancave elektrokimikisht aktive, kompleksi i ruteniumit dhe tripropilamina (TPA), në reaksionet që çojnë në emetimin e dritës është shumë pozitive për këtë sistem. Kjo ndodh sepse, gjatë matjes TPA-ja ripërdoret por gjendja e kompleksit të ruteniumit rigjenerohet vazhdimisht. Kjo do të thotë që kompleksi i ruteniumit mund të performojë shumë cikle të gjenerimit të dritës gjatë proçesit të matjes. Kjo tregon një efekt amplifikues i cili kontribuon në ndjeshmëriin e kësaj teknologjie. Për këtë arsye shumë fotone mund të krijohen nga një kompleks antigen-antitrup.
-Markimi jo izotopik shumë stabël lejon përshtatjen e reagentëve të lëngshëm.
-Ndjeshmërii i lartë i kombinuar me kohën e shkurtër të inkubimeve çon në analizë të cilësisë së lartë dhe rezultate të shpejta.
-Variacioni i madh i matjes i pesë rregullave të magnitudës minimizon hollimet dhe përsëritjet duke reduktuar humbjen e kohës dhe koston e reagentit.
-I aplikueshëm për matjen e të gjitha analizave duke zhvilluar një platformë solide.
-Reagentët e Elecsys përdorin një mikropjesëz magnetike të mbuluar me streptavidinë. Streptavidina është një proteinë bakteriale tetramerike e cila lidhet fort me molekulën e biotinës. Duke formuar komplekse shumë të qëndrueshme në një interval të gjerë temperature dhe pH. Biotina përdoret si markues i antitrupit apo antigenit për të bërë të mundur lidhjen e tyre me fazën solide

E përmendëm më sipër faktin që sistemi Cobas 6000 minimizon gabimet, pasi reagentët e tij janë të pajisur me një barkod dydimensional. Këta reagentë prodhohen, paketohen dhe pajisen me barkode nga Roche Diagnostics. Reagentët e pjesës cobas e 601 janë të parapërgatitur dhe duhet të qëndrojnë në temperaturë 2-8°C. Përpara përdorimit vendosen në diskun përkatës (fig 1-6), skanohen nga sistemi dhe mund të përdoren vetëm pasi janë njohur prej tij. *(Roche Diagnostics, Operator's manual, Version1,0).*

Barkodet e reagentëve përmbajnë informacionin e nevojshëm që duhet për të realizuar matjet. Ky informacion përfshin:

- Numrin e testeve
- Numrin e lotit
- Parametrat e kurbës së kalibrimit
- Datën e skadimit (nëse data e skadencës ka kaluar, aparati nuk e njeh reagentin).

Të njëjtat veçori kanë edhe kalibratorët dhe kontrollet, të cilat janë përmendur në kapitullin 2, Materiale dhe metoda. *(Roche Diagnostics, Operator's manual, Version1,0).*

Figura 1-6: Pjesët kryesore të cobas e 601: A. Gjilpëra sipper, B. Disku i reagentëve, C. Dhoma e matjes, D. Raket me kupa dhe gjilpëra, E. Dhoma e mbeturinave.

1.3.2. Teknologjia ECL

Lumineshenca është emetimi i dritës kur një elektron kalon nga një nivel i lartë energjetik në një nivel të ulët energjetik. Megjithëse ka tipe të ndryshme të lumineshencës të cilat varen nga aktivizimi i elektronit në gjendjen e eksituar, ato të gjitha rezultojnë në emetim të ngjashëm të energjisë radioaktive.
Në kemiolumineshencë, elektroni eksitohet nga një reaksion kimik duke përfshirë specie shumë reaktive. Reaksioni kemiolumineshent, shpesh përfshin oksidimin e një komponimi organik. Emetimi i dritës zgjat për një kohë të shkurtër dhe të vazhdueshme. Proçeset elektrokemiolumineshente përfshijnë shumë molekula duke përmendur përbërës të ruteniumit, osmiumit, rheniumit ose elementeve të tjerë. ECL është një proçes në të cilin elementët shumë reaktivë gjenerohen prej prekursorëve shumë të qëndrueshëm në sipërfaqe të një elektrode. Këta element shumë reaktivë veprojnë me njëri tjetrin, duke prodhuar dritë.
Zhvillimi i ECL-së bazohet në përdorimin e kompleksit ruthenium(II)-tris (bipyridil)[$Ru(bpy)_3]^{2+}$ dhe tripropylamine (TPA). Produkti final elektrokemiolumineshent formohet gjatë fazës së matjes. Reaksionet kemiolumineshente që çojnë në çlirimin e dritës prej kompleksit të ruteniumit, fillojnë elektrikisht, më shumë se kimikisht. Kjo realizohet nga aplikimi i një rryme drejt kompleksëve imunologjikë (duke përfshirë edhe kompleksin e ruteniumit) që janë të atakuara në mikropjesëzat e mbuluara me streptavidinë. Avantazhet e stimulimit elektrik të reaksionit kemiolumineshent kanë të bëjnë me kontrollin e saktë të të gjithë reaksionit. *(Roche Diagnostics, Operator's manual, Version1,0).*

1.3.2.1. Parimet e metodave imunokimike në teknologjinë ECL.

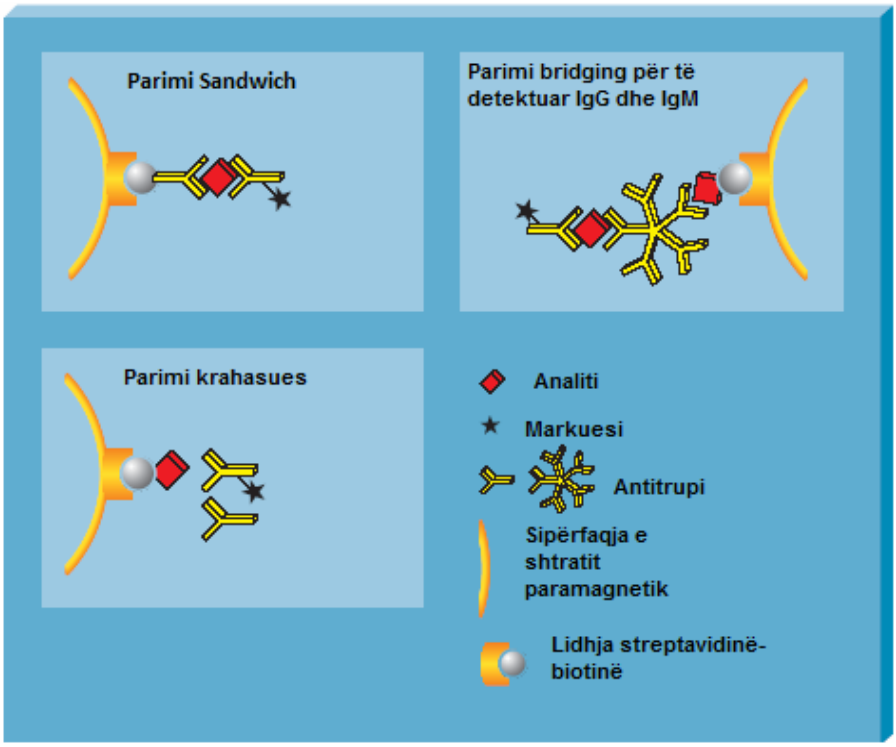


Figura 1-7: Parimet e metodave imunokimike në teknologjinë ECL (COBAS 6000).

Në këtë sistem janë të vlefshme tre parime: parimi krahasues, parimi sandwich dhe parimi bridging. Të tre parimet bazohen në e reaksioneve antigen-antitrup duke përdorur kompleksin streptavidinë-biotinë. Për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM dhe anti-Citomegalovirus IgM përdoret parimi bridging, i sqaruar në kapitullin II. Vlerësimi dhe llogaritja e përqëndrimit të antigenit bazohen në një mesatare të një kurbe kalibrimi, që përcaktohet duke përdorur standarte të përqëndrimeve të njohura të antigenit. *(Roche Diagnostics, Operator's manual, Version1,0).*

1.3.2.2. Reaksioni elektrokemiolumineshent

Teknologjia ECL përdor ruteniumin si kompleks për zhvillimin e dritës. Kripërat e ruthenium-tris (bipiridil) janë të qëndrueshme dhe të tretshme në ujë. Ligandët bipiridil mund të modifikohen lehtë me grupe reaktive për të formuar përbërës aktivë kemiolumineshentë. *(Roche Diagnostics, Operator's manual, Version1,0).*

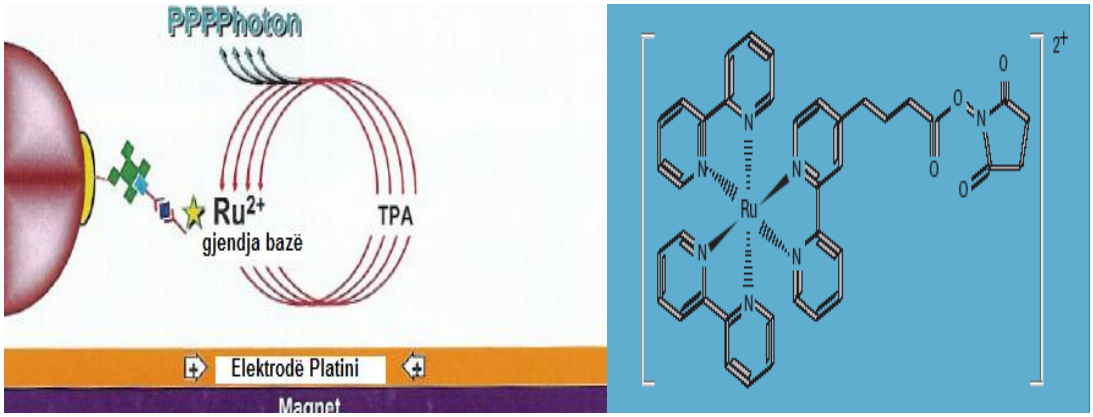


Figura 1-8: Përdorimi i kompleksit të ruteniumit në teknologjinë ECL. Për zhvillimin e mostrave të ECL-së, përdoret një ester N-hydroxysuccinimide (NHS) i një kompleksi të modifikuar Ru (bpy)3, sepse ai mund të çiftohet lehtësisht me grupet aminike të proteinave, haptenet dhe acidet nukleike. Kjo e lejon teknologjinë e matjes të aplikohet në një variacion të gjerë analizatorësh.

Reaksioni ECL-së në sipërfaqen e elektrodës

- Gjendja bazë: Dy substanca elektrokimikisht aktive, kompleksi i ruteniumit dhe tripropilamina (TPA), janë të përfshira në reaksionet që çojnë në emëtimin e dritës. Të dyja substancat qëndrojnë të qëndrueshme, për sa kohë që nuk aplikohet një rrymë ndaj tyre.

- Gjendja e eksituar e ruteniumit (fig 1-9b):
  Rryma aplikohet ndërmjet një elektrode dhe një fushe elektrike, e cila shkakton ndërveprimin e të gjithë elementëve që ndodhen në këtë fushë. Reaksioni i ECL-së ndërmjet ruthenium(II)-tris(bipyridil)$^{2+}$ dhe tripropilaminës (TPA) ndodh në sipërfaqen e një elektrode platiniumi. Rryma e aplikuar krijon një fushë elektrike,

e cila shkakton ndërveprimin e të gjitha materialeve në këtë fushë. *(Roche Diagnostics, Operator's manual, Version1,0).*

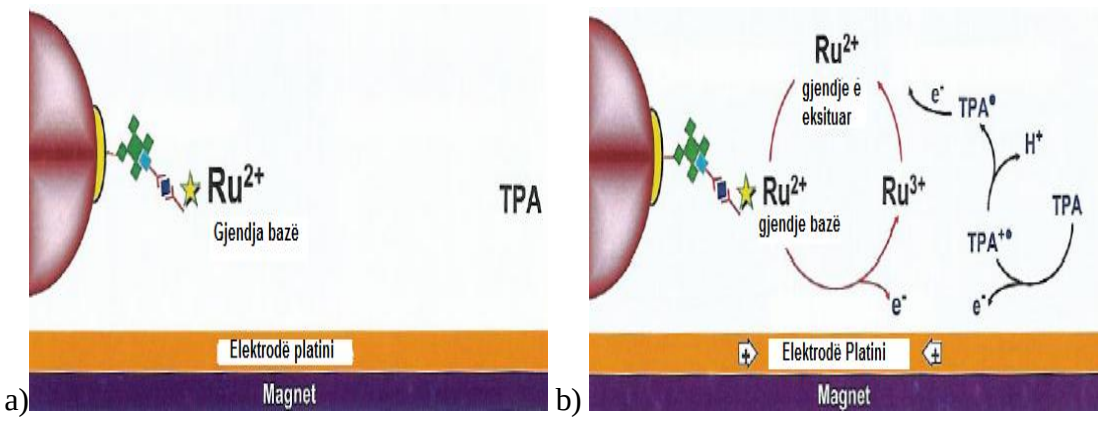


Figura 1-9: Gjendjet e kompleksit të ruteniumit gjatë reaksionit ECL. a).Gjendja bazë e ruteniumit. b). Gjendja e eksituar e ruteniumit.

Faza e prodhimit të dritës:

Tripropilamina oksidohet në elektrodë, çliron një elektron dhe formon një radikal të ndërmjetëm tripropilamine, i cili vepron më pas duke çliruar një proton (H^+) për të formuar një radikal të TPA-së, që shënohet $TPA^{\bullet}$ (fig 1-10).

Në kthim, kompleksi i ruteniumit gjithashtu çliron një elektron në sipërfaqen e elektrodës, duke u oksiduar për të formuar kationin $Ru(bpy)_3]_3^+$. Ky kation i ruteniumit është komponenti i dytë i reaksionit pasues kemiolumineshent me radikalin e TPA-së. *(Roche Diagnostics, Operator's manual, Version1,0).*

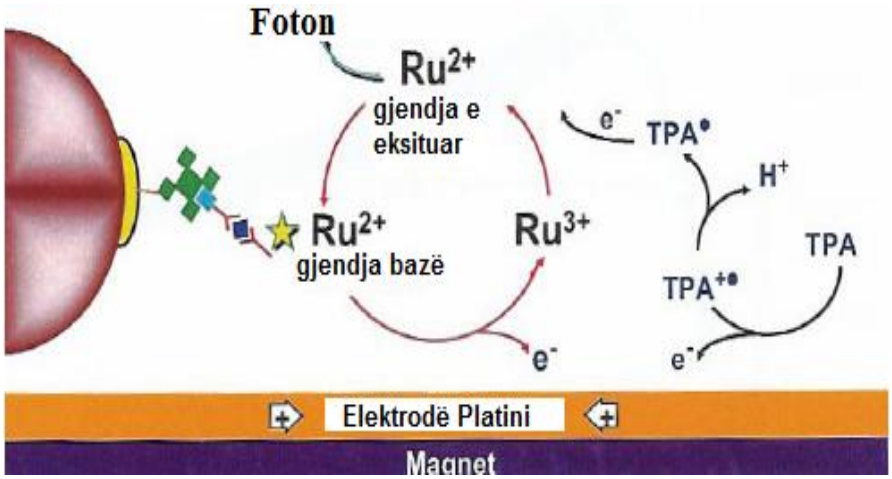


Figura 1-10: Fazat e amplifikimit të sinjalit në reaksionin ECL.

TPA• dhe $Ru(bpy)_3]_3^+$ ndërveprojnë me njëri-tjetrin, ndërsa $Ru(bpy)_3]_3$+reduktohet në $Ru(bpy)_3^{2+}$ dhe në të njëjtën kohë formojnë një gjendje eksituese nëpërmjet transferimit të energjisë (fig 1-11). Kjo gjendje është e paqëndrueshme dhe kalon në emetimin e një fotoni në gjatësinë e valës 620 nm për në gjendjen e tij fillestare. Tani cikli i reaksionit mund të fillojë përsëri. Radikali i tripropilaminës reduktohet nga produkte që nuk ndikojnë në proçesin e kemiolumineshencës. Reaksioni kontrollohet nga difuzioni i TPA-së dhe sasisë së kompleksit të ruteniumit të pranishëm. Meqënëse TPA-ja pakësohet në fushën elektrike, fuqia e sinjalit (drita) reduktohet ngadalë derisa të arrihet maksimumi. *(Roche Diagnostics, Operator's manual, Version1,0).*

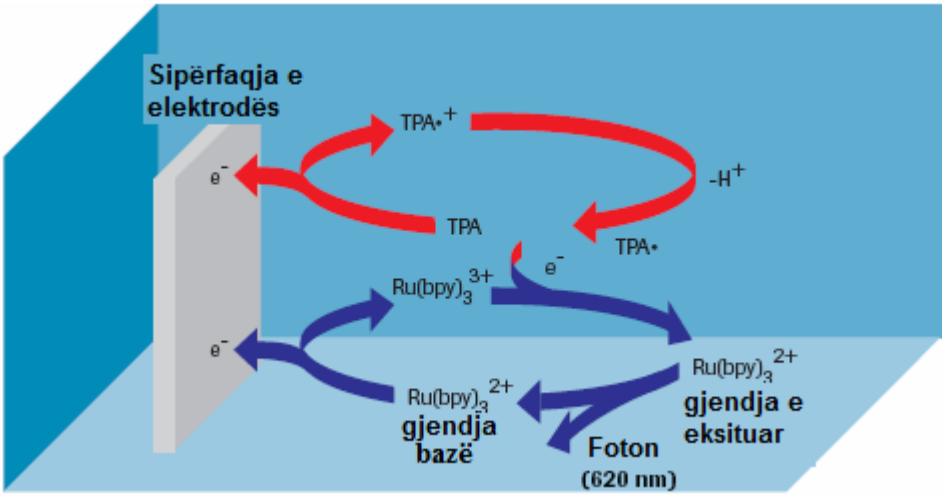


Figura 1-11: Reaksioni ECL në dhomën e matjes

Megjithëse gjatë matjes, TPA-ja ripërdoret, gjendja e kompleksit të ruteniumit rigjenerohet vazhdimisht. Kjo do të thotë që kompleksi i ruteniumit mund të performojë shumë cikle të prodhimit të dritës gjatë proçesit të matjes. Kjo tregon një efekt shumëfishues i cili kontribuon në ndjeshmërinë e kësaj teknologjie. Shume fotone mund të krijohen nga një kompleks antigen-antitrup. *(Roche Diagnostics, Operator's manual, Version1,0).*

Prodhimi i sinjalit të ECL-së:

Grafiku në figurën 1-12 shpjegon një prodhim tipik të sinjalit të ECL-së. E parë nga një këndvështrim elektrik, reaksioni mund të shpjegohet si më poshtë: Kur një rrymë aplikohet në elektrodë, ndodh një pik i emetimit të dritës për një interval të shkurtër dhe mund të matet si sinjali i ECL-së. Nën kurbë matet një hapësirë e përcaktuar përreth intensitetit maksimal.

Vija e ndërprerë tregon rrymën (voltazhin) e përdorur në elektrodë për të prodhuar sinjalin e ECL-së. Vija e vazhduar është drita aktuale e matur nga detektori fotoamplifikues. *(Roche Diagnostics, Operator's manual, Version1,0).*

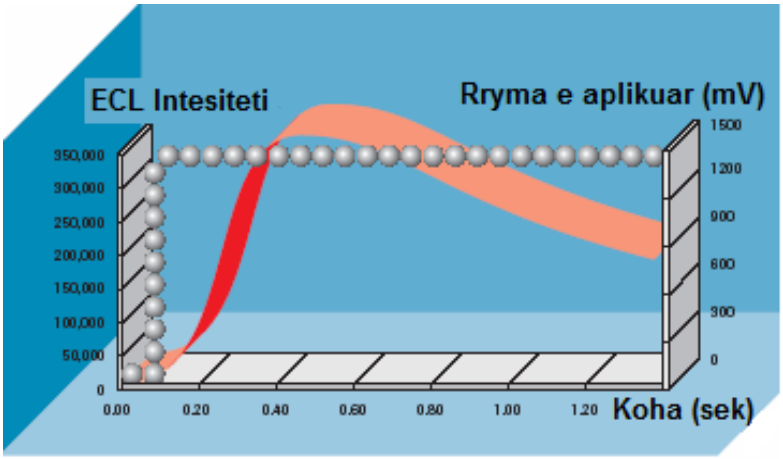


Figura 1-12: Gjenerimi i sinjalit të ECL-së.

Dhoma e matjes me ECL

Qëllimi sistemit është matja duke përdorur teknikën ECL, e cila bazohet në zhvillimin e tre hapave thelbësorë. *(Roche Diagnostics, Operator's manual, Version1,0).*

- **Ndarja:** Duke përdorur një magnet, mikropjesëzat e streptavidinës që janë të mbuluara me komplekset antigen-antitrup, depozitohen uniformisht në elektrodën e punës. Një sistem bufer (procell) përdoret për të larë pjesëzat në elektrodën që punon dhe për të larguar reagentin e tepërt dhe materialet e mostrës nga dhoma e matjes.

- **Reaksioni ECL:** Magneti zhvendoset dhe më pas aplikohet një rrymë në elektrodë, në të cilën mikropjesëzat e mbuluara me komplekset antigen-antitrup janë depozituar për të filluar reaksionin e ECL-së. Më pas sistemi përdor sinjalet korresponduese për llogaritjen e rezultatit.

- **Çlirimi i mikropjesëzave dhe pastrimi i dhomës:** Menjëherë sapo ka përfunduar matja, mikropjesëzat paramagnetike pastrohen larg nga sipërfaqja e elektrodës me një solucion special pastrues (clean cell). Sipërfaqja e dhomës së matjes rigjenerohet nëpërmjet ndryshimit të potencialit në elektrodë. Dhoma më pas është gati për një matje tjetër (fig 1-13).

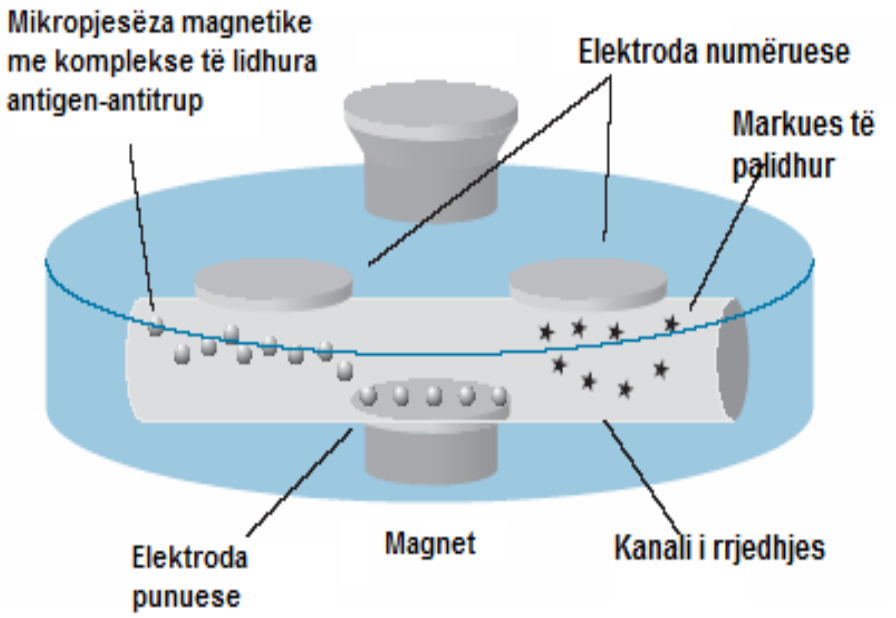


Figura 1-13: Dhoma e matjes në teknikën ECL.

1.4. Njohuri të përgjithshme mbi sistemin MINI-VIDAS

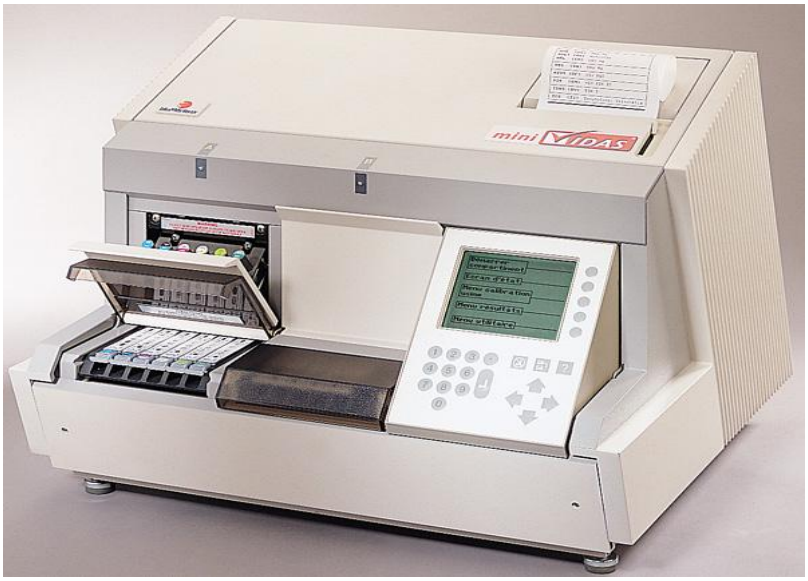


Figura 1-14: Aparati Minividas

Aparati MINIVIDAS (fig 1-14) përfshin një sistem multiparametrik të prodhuar nga BioMereux. Sistemi MINI-VIDAS konsiston në krijimin e seksioneve të paracaktuara, kryerjen e kalibrimeve e kontrolleve dhe realizimin e matjeve për mostra të caktuara. Nëpërmjet këtij sistemi analitik mund të kryhen analiza serologjike, imunokimike, për e anigeneve, mikrobiologjike dhe imunohemostazike. Kombinimi i të gjithë elementëve të përmendur më sipër siguron një sërë përparësish në sistemin VIDAS si

rezultate të besueshme, lehtësi në përdorim dhe rezultate të shpejta. Teknologjia e përdorur në këtë sistem njihet si ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), e cila është një kombinim i teknikës enzimologjike EIA me një lexim fluoreshent final. Enzima e përdorur është fosfataza alkaline ndërsa substrati është 4-metil umbelliferil fosfati (4-MUP) i hidrolizuar në 4-metil umbelliferon. Ky është produkti i fluoreshencës (4-metil-umbelliferon), intesiteti i së cilës matet në gjatësinë e valës 450 nm nga skaneri optik i aparatit minividas dhe shprehet në vlerë relative të fluoreshencës (RFV). *(Vidas Manual instrument, Version B)*

1.4.1. Sistemi analitik VIDAS

Pjesa analitike VIDAS është ndarë në 5 seksione të pavarura me nga 6 pozicione matjesh të protokolluara për çdo seksion. Secili seksion kontrollohet nga një mikroproçesor i cili konsiston në kontrollin e rrugës së transportit për stripin e reagentit, sistemit pipetues, fazës SPR dhe sistemin e inkubimit. Secili seksion vepron në mënyrë të pavarur duke krijuar mundësinë e zhvillimit të testeve të ndryshme në të njëjtën kohë.
Gjendja aktuale e seksioneve shprehet nëpërmjet një indikatori me dritë, i cili është i ndezur kur në seksion po zhvillohet një test, pulson kur në seksion ka përfunduar zhvillimi i një testi dhe është i fikur kur stripi i reagentit dhe SPR-ja kanë dalë nga seksioni përkatës.
Në secilin seksion të sistemit VIDAS ka një sistem pipetimi i cili siguron transferimin e të gjithë reagentëve, holluesve dhe shpëlarësve në rrugën e duhur. Kanalet pipetuese janë të pavarura fizikisht nga njëra-tjetra por janë të lidhur mekanikisht për të krijuar një sistem funksional. Lëvizjet në secilin seksion realizohen nga motorrë të cilët janë të kontrolluar nga protokolle me parametra të përcaktuar. Temperatura e zhvillimit të analizave në brendësi të aparatit Vidas duhet të jetë 37°C. Secila pjesë e aparatit është e pajisur me dy epruveta termale të cilat sigurojnë mirëmbajtjen e kësaj temperature të qëndrueshme.
Në çdo seksion, në skajin më të ulët të tyre, ndodhet një kapak plastik i cili mund të tërhiqet lart për të treguar kutinë e stripeve të reagentëve (fig 1-15a). Kjo kuti përmban 6 kanale në të cilët vendosen stripet e reagentëve (fig 1-15b). Kutia e stripeve të reagentëve mund të përdoret gjithashtu edhe për të futur në mënyrë automatike kartën që përmban të dhënat dhe faktorin e kalibrimit. *(Vidas Manual instrument, Version B)*

a) b)

Figura 1-15: a) Hapja e kutisë së stripeve. b) Kanalet ku vendosen stripet e reagentëve.

1.4.2. Metodat e përdorura në aparatin VIDAS.

Në sistemin VIDAS zhvillohet teknologjia ELFA (e trajtuar në kapitullin II) e cila bazohet në e reaksioneve antigen-antitrup. Në këtë teknologji përfshihen disa metoda *(Vidas Manual instrument, Version B)*:

- Matja e antitrupave (EIA indirekte). Antigenet janë të vendosur në paretet e brendshme të SPR-së. Nëse mostra përmban antitrupat që duhet të detektohen, 4-metil umbelliferil fosfati hidrolizohet në umbelliferon. *(Vidas Manual instrument, Version B)*

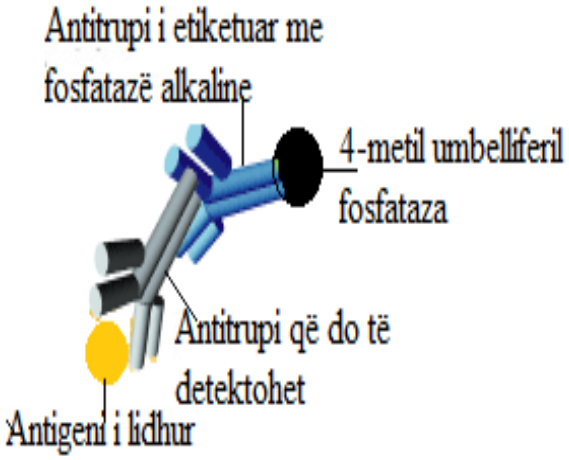


Figura 1-16: Metoda EIA indirekte

- Matja e imunoglobulinave M (imunozbulimi). IgM-të që do të detektohen kapen nga antitrupat anti-IgM që mbulojnë paretet e brendshme të SPR-së. Prania e IgM-ve detektohet nga antigenet e pranishëm në likid. *(Vidas Manual instrument, Version B)*

Figura 1-17: Matja e IgM-ve (Imunozbulimi)

- Matja e antigeneve bakterialë, viralë, proteinik, etj (Parimi Sandwich). Paretet e brendshme të SPR-së janë të veshura nga antitrupat që detektojnë antigenet e mësipërme. *(Vidas Manual instrument, Version B)*

Në këto tre metoda, nivelet e matura të fluoreshencës janë në përpjestim të drejtë me sasinë e antitrupave ose antigeneve të pranishme në mostër.

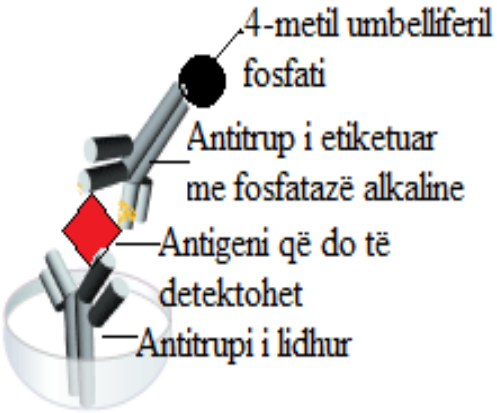


Figura 1-18: Matja e antigeneve (Parimi Sandwich)

- Matja e hapteneve (Parimi krahasues). Paretet e brendshme të SPR-së janë të veshura me një sasi të limituar të antitrupave. Haptenet që do të detektohen konkurrojnë me haptenet e etiketuara. Niveli i fluoreshencës së matur është në përpjestim të zhdrejtë me sasinë e hapteneve të pranishme në mostër. *(Vidas Manual instrument, Version B)*

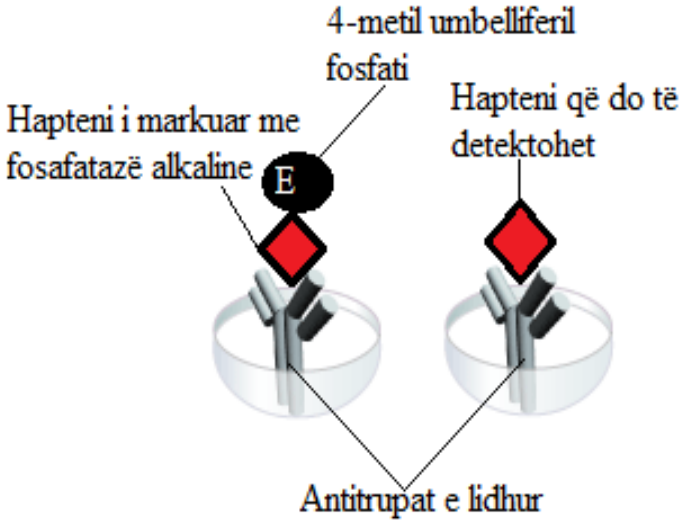


Figura 1-19: Matja e hapteneve (Parimi krahasues)

1.4.3. Avantazhet e aparatit MINI-VIDAS

-Siç e kemi përmendur në pjesën teorike, MINI-VIDAS është një sistem multiparametrik, i cili konsiston në krijimin e seksioneve të paracaktuara, kryerjen e kalibrimeve e kontrolleve dhe realizimin e matjeve për mostra të caktuara.
-Pjesa analitike Vidas është ndarë në 5 seksione të pavarura me nga 6 pozicione matjesh të protokolluara për çdo seksion. Secili seksion kontrollohet nga një mikroproçesor i cili konsiston në kontrollin e rrugës së transportit për stripin e reagentit, sistemit pipetues, fazës SPR dhe sistemin e inkubimit. Në këtë mënyrë, sigurohet saktësi në përpunimin e rezultateve.
-Secili seksion ka aftësi të veprojë në mënyrë të pavarur duke krijuar mundësinë e zhvillimit të testeve të ndryshme në të njëjtën kohë. Në secilin seksion të sistemit vidas ka një sistem pipetimi i cili siguron transferimin e të gjithë reagentëve, holluesve dhe shpëlarësve në rrugën e duhur.
-Temperatura e zhvillimit të analizave në brendësi të aparatit Vidas duhet të jetë 37°C. Secila pjesë e aparatit është e pajisur me dy epruveta termale të cilat sigurojnë mirëmbajtjen e kësaj temperature të qëndrueshme.
-Reagentët në sistemin MINI-VIDAS janë të organizuar në stripe njëpërdorimëshe. Çdo strip përmban një etiketë dhe një shenjë të koduar dhe të ngjyrosur, të cilat identifikohen nga një kod me 2-4 karaktere.
-Në sistemin MINI-VIDAS përdoret një fazë solide, SPR-ja, e cila është bazë për reaksionin imunologjik. Paretet e saj të brendshme janë të veshura me antitrupa ose

antigene që përdoren për të kapur analitin shenjë. SPR-ja përdoret për të pipetuar mostrën dhe reagentët dhe për të eleminuar ndotjet ndërmjet reagentit dhe aparatit.
Ekzistenca e SPR-së siguron një mirëmbajtje të reduktuar në minimum sepse nuk ka tuba, shiringa apo gjilpëra.
-Sistemi i matjes në aparatin VIDAS konsiston në një skanim optik fluorometrik. Ky sistem është i montuar në një pajisje mekanike duke mundësuar përdorimin në të pestë seksionet. Sistemi detekton çdo ndryshim kimik që mund të ndodhë në kyvetën optike në fund të stripit të reagentit
-Teknologjia e përdorur në këtë sistem njihet si ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), e cila është një kombinim i teknikës enzimologjike EIA me një lexim fluoreshent final.
-Përpara fillimit të proçedurës, sistemi kontrollon reagentët, skanon bar kodin, lexon fluoreshencën e substratit dhe kontrollon datën e skadencës së stripit
-Në secilën fazë, reagenti ciklohet disa herë jashtë dhe brenda SPR-së. Kjo rrit kinetikën e reaksionit dhe zvogëlon kohën e inkubimit.
-Sistemi optik i aparatit kontrollohet dhe kalibrohet nga teknikët gjatë proçeseve të mirëmbajtjes. Pasi realizohet kalibrimi i rregullt, ai mat fluoreshencën e standartit dhe e ruan këtë vlerë në kujtesë. Kjo vlerë fluoreshence do të bëhet pika e referimit për të gjitha kontrollet pasuese të kalibrimit.
-Fluoreshenca matet dy herë për çdo mostër në kyvetën e stripit të reagentit. Leximi i parë fluoreshent realizohet para përfshirjes së fazës solide në substrat. Leximi i dytë fluoreshent realizohet pas inkubimit të substratit me enzimën që ka mbetur në brendësi të fazës solide. *(Vidas Manual instrument, Version B)*

1.5. Njohuri të përgjithshme mbi sistemin CHORUS

Figura 1-20: Fotografi e aparatit CHORUS (foto: B. Laze).

CHORUS (fig 1-20) është një aparat i automatizuar multiparametrik, i programuar për të zhvilluar testet imunoenzimatike (ELISA) dhe të fiksimit të komplementit (CFT). Për çdo cikël proçesohen 30 teste, mjafton hedhja e mostrës me pipetë dhe aparati realizon vetë të gjitha proçedurat e tjera (hollime, inkubime, shpëlarje, lexime fotometrike, etj). Stripet janë të gatshme dhe secili është i pajisur me barkod që

lexohet nga aparati me anë të një skanimi. Programi i këtij aparati realizon kontroll të dyfishtë të testeve të regjistruara për të shmangur gabime të mundshme. *(CHORUS Trio Operating Manual)*

1.5.1. Testi i Fiksimit të Komplementit në aparatin CHORUS

Komplementi është një kompleks proteinash, të pranishme në plazmë si pjesë e sistemit imun të lindur. Këto proteina janë shumë të ndjeshme dhe inaktive në temperaturën 56°C, për 30 minuta. Komplementet janë të përbëra nga 9 proteina kryesore të emërtuara C_1-C_9 dhe nga proteina të tjera të emërtuara faktorët B, D, H, I, etj. Komplementi fiksohet nga një kompleks antigen-antitrup dhe si pasojë fillon një kaskadë reaksionesh që përfundon me aktivizimin e proteinave. Ai luan një rol të rëndësishëm në pastrimin e antigeneve dhe shkatërrimin e mikroorganizmave invadues.
Në studimin tonë nuk e kemi përfshirë testin CFT sepse nuk është programuar për matjen e patogjenëve në nënat shtatëzëna, veçanërisht *Toxoplasma gondii* dhe *Citomegalovirusin* pasi ka rezultuar me ndjeshmëri rreth 6 herë më të ulët se testi ELISA.

Në teori, diagnoza serologjike do të kërkonte serumin akut dhe konvaleshent (2 javë pas fillimit të simptomave), i ashtuquajturi serum çift, për të kontrolluar rritje të titrit të antirupit. Në të vërtetë, është shumë e vështirë për të marrë serume çifte dhe CFT përdoret si një test kontrolli, duke përdorur antigene të ndryshëm njëherësh. Kjo është veçanërisht e rëndësishme për sëmundjet e sistemit të frymëmarrjes, të cilat karakterizohen nga simptoma të ngjashme për të gjithë agjentët infektive. Megjithatë testi i fiksimit të komplementit ende nuk është çertifikuar dhe ka ende shumë problematika për tu zgjidhur. *(CHORUS Trio Operating Manual)*

1.5.2. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) në aparatin CHORUS

ELISA është një prej metodave analitike, e cila përdoret për matjen e antigeneve dhe antitrupave nëpërmjet formimit dhe vënies në dukje të kompleksëve specifikë antigen-antitrup. Për këtë nevojitet antigen ose antitrup që vesh fazën solide, konjugati dhe substrati që ndryshon ngjyrë në prani të enzimës. ELISA është përdorur gjerësisht si një metodë diagnostike në mjekësi, patologjinë e bimëve dhe në kontrollin e cilësisë në industri të ndryshme. Në terma të përgjithshëm, testi ELISA përdor një sasi të panjohur antigeni të fiksuar në një sipërfaqe dhe më vonë një antitrup specifik aplikohet në këtë sipërfaqe që të lidhet me antigenin. Antitrupi lidhet me një enzimë dhe në fazën finale shtohet një substancë që përmban substratin e enzimës. Reaksioni vijues prodhon një sinjal të detektueshëm që shprehet me ndryshimin e ngjyrës në substrat. Matja sasiore e intensitetit të dritës realizohet nga metoda spektrofotometrike. Ndjeshmëria e matjes varet nga amplifikimi i sinjalit gjatë reaksioneve analitike. Sinjali gjenerohet nga enzima të cilat janë të lidhura me reagentët që përdoren për matje, në raporte fikse për të lejuar kuantifikim të saktë kjo i ka dhënë emrin Enzime Linked). Analiti quhet edhe ligand sepse ai lidhet në mënyrë specifike me një reagent dhe kështu ELISA përfshihet në kategorinë e madhe

"Ligand Binding Assays". Ligandi zakonisht i imobilizuar është i thatë dhe vesh fundet transparente ose anët e dhomëzave të pjatës ELISA.
ELISA tradicionale përfshin substanca kromogjene dhe substanca që shkaktojnë ndryshim të dukshëm ngjyre për të evidentuar praninë e antigenit apo analitit. Teknikat e reja ELISA përdorin substanca fluorogjenike dhe elektrokemilumineshente për të krijuar sinjale të kuantifikueshëm. Këta transmetues të rinj mund të kenë shumë avantazhe si ndjeshmëri të lartë. *(CHORUS Trio Operating Manual)*

Figura 1-21: Vendosja e reagentëve në sistemin CHORUS (foto: B. Laze).

Në aparatin CHORUS zhvillohen katër tipe të teknikës ELISA, por në këtë studim përdoret metoda sandwich, e cila është trajtuar në kapitullin II. Metodat e tjera që përdoren janë metoda krahasuese, indirekte e modifikuar dhe e aviditetit (fig 1-22, 1-24).

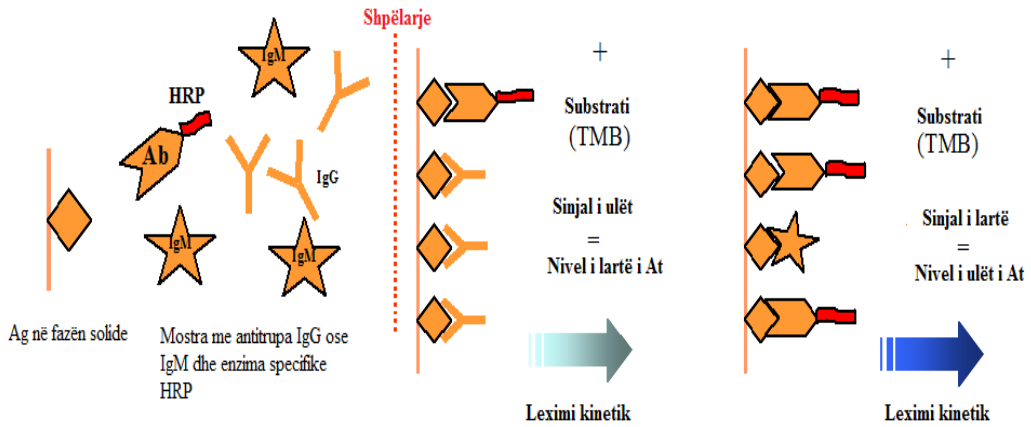


Figura 1-22: Metoda krahasuese në aparatin CHORUS.

Në figurën 1-22 paraqitet metoda krahasuese në aparatin CHORUS. Antigeni ndodhet i fiksuar në fazën solide, ndërsa mostra është trajtuar me enzima specifike HRP, të cilat lidhen me antitrupat ndaj antigenit. Nëse këta antitrupa janë të pranishëm në

mostër, formohet kompleksi antigen-antitrup-HRP. Me anë të shpëlarjes largohen antitrupat e palidhur me antigenet. Më pas shtohet substrati TMB në dy faza dhe realizohet leximi i sinjalit në çdo fazë. *(CHORUS Trio Operating Manual)*

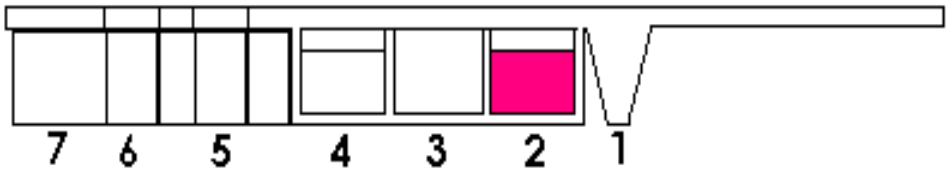


Figura 1-23: Stripi i reagentëve që zhvillojnë metodën krahasuese: Puseta 1 është vendi i depozitimit të mostrës, Puseta 2 përmban konjugatin, Puseta 3 është bosh, Puseta 4 përmban substratin, Puseta 5 është jo e ndjeshme, Puseta 6 është e ndjeshme dhe Puseta 7 është bosh. *(CHORUS Trio Operating Manual)*

Në figurën 1-24 paraqitet metoda indirekte e modifikuar në aparatin CHORUS. Në fazën solide janë të fiksuar antigene rekombinantë të lidhur me enzimën HRP. Nëse mostra përmban antitrupa ndaj këtyre antigeneve, formohen komplekset antitrup-antigen-HRP. Me anë të shpëlarjes largohen antitrupat e palidhur me antigenet. Më pas shtohet substrati TMB dhe realizohet leximi kinetik. *(CHORUS Trio Operating Manual)*

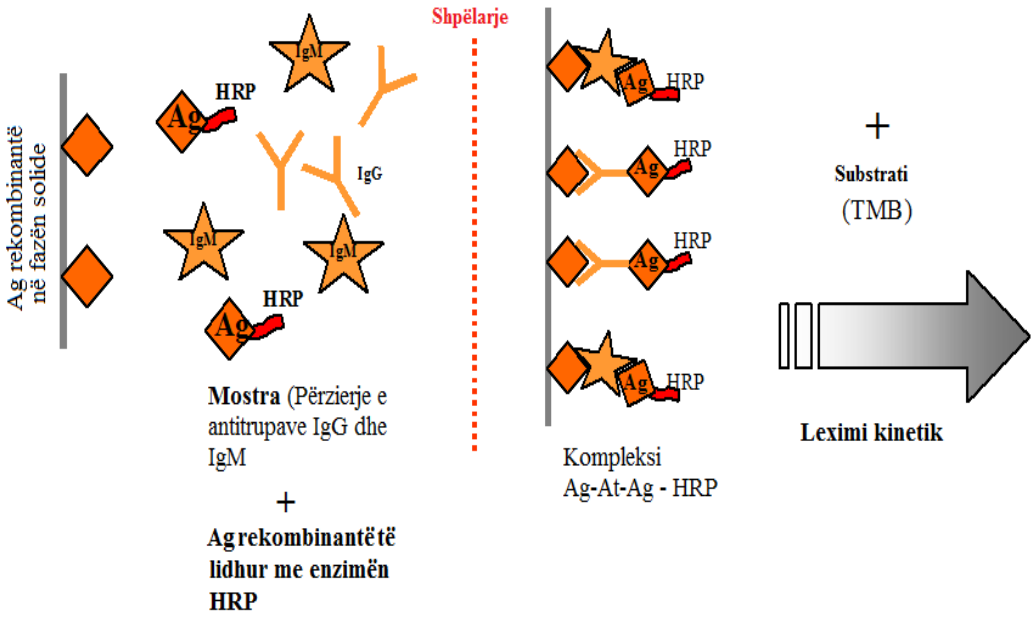


Figura 1-24: Metoda indirekte e modifikuar në aparatin CHORUS

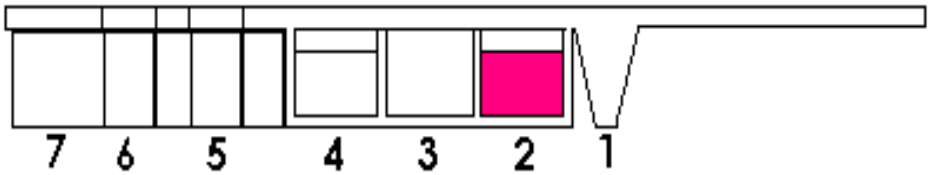


Figura 1-25: Stripi i reagentëve që zhvillojnë metodën indirekte të modifikuar: Puseta 1 është vendi i depozitimit të mostrës, Puseta 2 përmban konjugatin, Puseta 3 është bosh, Puseta 4 përmban substratin, Puseta 5 është jo e ndjeshme, Puseta 6 është e ndjeshme dhe Puseta 7 është bosh. *(CHORUS Trio Operating Manual)*

1.5.3. Avantazhet e aparatit CHORUS

-Chorus është një aparat i automatizuar multiparametrik, i programuar për të zhvilluar deri në 30 teste njëkohësisht. Pra, realizohen më pak teste nëse do të krahasohej me sistemet e tjera të analizuara më sipër, COBAS 6000 dhe MINI-VIDAS.
-Një veçori e rëndësishme e sistemit CHORUS, që është e përbashkët me dy sistemet e tjera, është fakti që mjafton hedhja e mostrës me pipetë dhe aparati realizon vetë të gjitha proçedurat e tjera (hollime, inkubime, shpëlarje, lexime fotometrike, etj).
-Reagentët janë të vendosur në stripe njëpërdorimëshe (veçori e përbashkët me sistemin MINI-VIDAS) dhe secili është i pajisur me barkod që lexohet nga aparati me anë të një skanimi.
-Programi i këtij aparati realizon kontroll të dyfishtë të testeve të regjistruara për të shmangur gabime të mundshme.
-Për e antitrupave anti-Toxoplasma IgM dhe anti-Citomegalovirus IgM në sistemin CHORUS përdoret metoda ELISA indirekte e cila bazohet në parimin e përgjithshëm të matjes së kompleksit antigen-antitrup nëpërmjet matjes së intensitetit të ngjyrës, të prodhuar prej reaksionit imunokimik. *(CHORUS Trio Operating Manual)*

1.6. ELISA EUROIMMUN

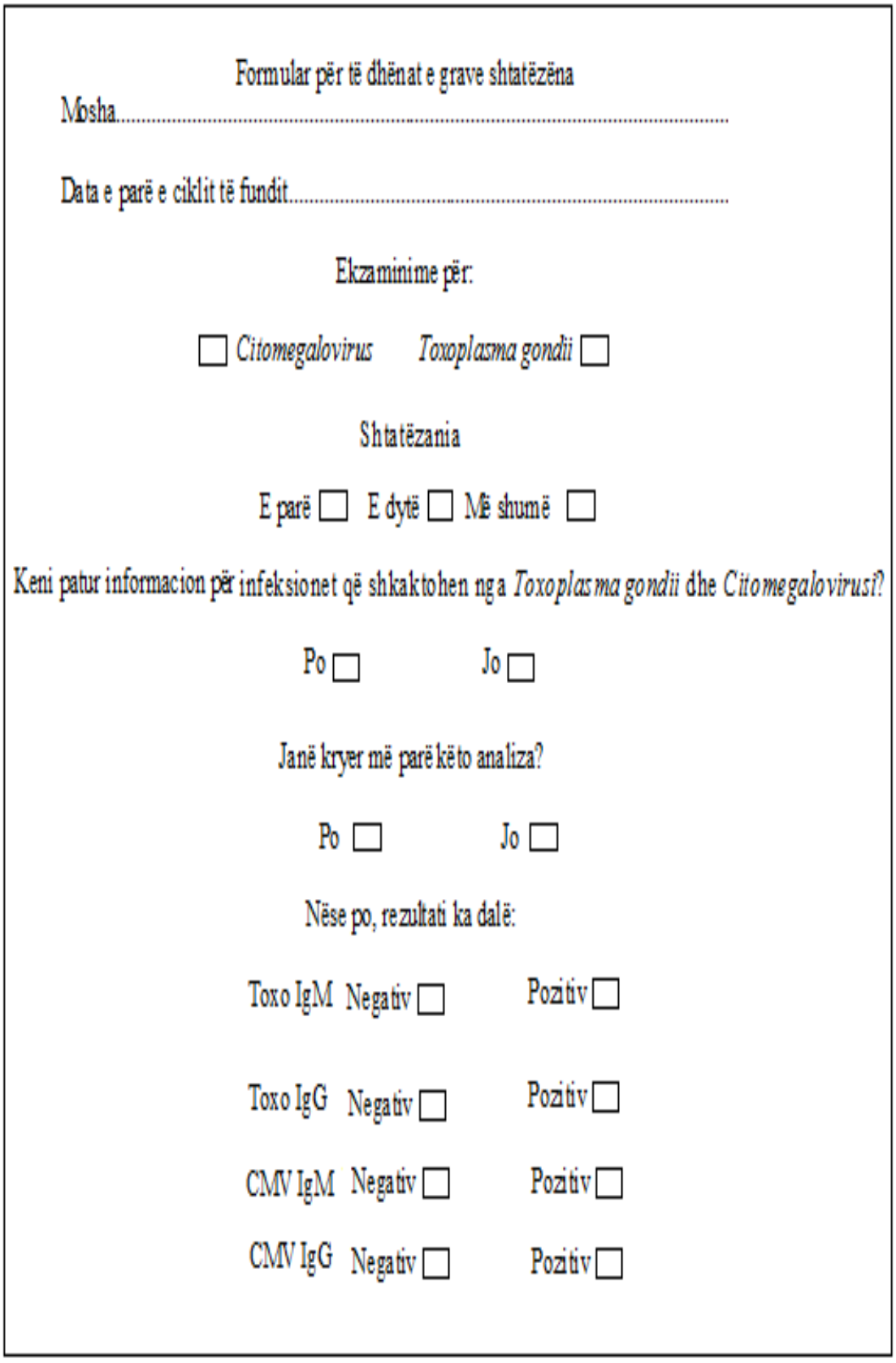
Kjo teknikë bazohet në të njëjtat veçori të shpjeguara në çështjen 1.5.2. Ndryshimi qëndron në faktin që reagentët CHORUS ELISA janë të gatshëm, të vendosur në stripe dhe aparati realizon të gjitha proçedurat automatikisht. Ndërsa kitet ELISA EUROIMMUN përmbajnë të gjithë reagentët e nevojshëm (kapitulli 2), por proçedurat realizohen manualisht dhe leximi fluoreshent realizohet në aparatin Tecan, i cili përfaqëson një sistem të hapur (figura 1-26). *(EUROIMMUN AG manual, 2011)*

Figura 1-26: Fotografi e aparatit Tecan (foto, B. Laze).

KREU 2. MATERIALE DHE METODA

Në përputhje me qëllimin u krijua edhe metodika e punës që përfshin periudhën 2011-2014.

- Hapi i parë është lidhja e marrëveshjes me dy spitalet gjinekologjike shtetërore Mbretëresha Geraldinë, Koço Gliozheni dhe me klinikat gjinekologjike private Hygeia, Iaqendro, Gliozheni dhe laboratoret diagnostikuese për mbledhjen e mostrave.
- Studimi është realizuar në laboratorin mjekësor "Intermedika" në Tiranë, ku janë mbledhur të gjitha rastet e ritestuara për toxoplasmën dhe citomegalovirusin, të cilat në testimin paraprak kanë dalë negativ. Në punim janë përfshirë të gjithë rastet që kanë dalë të dyshimta dhe pozitive (mbi 0.6 COI) në këto institucione dhe negative në laboratorin Intermedica. Çdo njëra nga mostrat u testua me katër teknika të ndryshme, të cilat janë ECL (aparati COBAS 6000 Roche Hitachi), ELFA (aparati MINI-VIDAS 2000 Bio-Mereux), ELISA (aparati CHORUS DIESSE) dhe ELISA EUROIMMUN.
- Për secilin nga rastet e përfshira në studim janë plotësuar formularë me të dhënat përkatëse të paraqitura në figurën 2-1, të cilat përfshijnë moshën, datën e parë të ciklit të fundit, nëse është testim i parë apo ritestim për toxoplasmën dhe citomegalovirusin, etj.
- Në këtë punim janë përfshirë 400 mostra të marra nga gratë shtatëzëna me moshë që varion 18-40 vjeç, të cilat ishin nga java e tetë deri në javën e njëzetë të shtatëzanisë. Mostrat u ndanë në dy grupe me nga 200 mostra secili. Grupi i parë i mostrave u testua për antitrupat anti-Toxoplasma IgM dhe grupi i dytë u testua për antitrupat anti-Citomegalovirus IgM. Në secilin grup mostrash, 50 prej tyre janë pozitive dhe 150 janë negative për antitrupat përkatës anti-Toxoplasma IgM ose anti-Citomegalovirus IgM.
- Gjaku u morr mbas kryerjes së analizës së gjakut komplet me qëllim shmangien e ndonjë infeksioni të mundshëm bakterial dhe viral që mund të ndikojë në rezultatin e ekzaminimeve tona.
- Mostrat e përdorura në këtë studim janë serume, të përftuara prej gjakut venoz. Gjaku është mbledhur në tuba me xhel dhe është centrifuguar për 10 minuta me 5000 rpm. Mbas ekstraktimit të serumit, brenda ditës është kryer matja e antitrupave Toxoplasma IgM dhe Citomegalovirus IgM me teknikën e elektrokemiolumineshencës në aparatin COBAS 6000. Më tej mostrat u ruajtën në frigorifer, në temperaturë -25 °C për tu analizuar me teknikat e tjera. Mostrat pozitive dhe të dyshimta janë verifikuar me anë të teknikës PCR, prej kompanisë CHORUS në kuadër të testimit të aparatit CHORUS në Shqipëri.



Formular për të dhënat e grave shtatëzëna

Mosha.....

Data e parë e ciklit të fundit.....

Ekzaminime për:

☐ *Citomegalovirus* *Toxoplasma gondii* ☐

Shtatëzania

E parë ☐ E dytë ☐ Më shumë ☐

Keni patur informacion për infeksionet që shkaktohen nga *Toxoplasma gondii* dhe *Citomegalovirusi*?

Po ☐ Jo ☐

Janë kryer më parë këto analiza?

Po ☐ Jo ☐

Nëse po, rezultati ka dalë:

Toxo IgM Negativ ☐ Pozitiv ☐

Toxo IgG Negativ ☐ Pozitiv ☐

CMV IgM Negativ ☐ Pozitiv ☐

CMV IgG Negativ ☐ Pozitiv ☐

Figura 2-1: Formular për të dhënat e grave shtatëzëna të përfshira në studim

Më tej, rezultatet u përdorën për të llogaritur ndjeshmërinë dhe specificitetin, të cilat janë matje statistikore të cilësisë së një testi. Ndjeshmëria mat përqindjen e mostrave aktuale pozitive që janë vërtetuar si të tilla, pra i referohet aftësisë së një testi për të identifikuar mostrat pozitive.
Specificiteti mat përqindjen e mostrave aktuale negative, gjithashtu që janë vërtetuar si të tilla, pra i referohet aftësisë së një testi për të identifikuar mostrat negative (rastet e dyshimta nuk merren parasysh).
Të dyja këto matje janë të lidhura me konceptet e gabimeve të tipit I dhe tipit II.

Llogaritja e ndjeshmërisë realizohet me formulën e mëposhtme:

$$\textbf{Ndjeshmëria} = \frac{\textbf{Numri i mostrave pozitive}}{\textbf{Numri i mostrave pozitive + numri i mostrave fals negative}}$$

Llogaritja e specificitetit realizohet me formulën e mëposhtme:

$$\textbf{Specificiteti} = \frac{\textbf{numri i mostrave negative}}{\textbf{Numri i mostrave fals pozitive + numri i mostrave negative}}$$

Si ndihmës për krahasimin e rezultateve të punës sonë u përdor programi SPSS, MedCalc dhe EXELSTAT. Nëpërmjet programit SPSS janë vlerësuar analiza njëfaktoriale e variancës dhe analiza e korrelacionit. Analiza e variancës njëdrejtimëshe ($\alpha = 0.05$) është përdorur për të testuar diferencat midis mesatareve të mostrave dhe kombinimit linear të mesatareve. Mostrat e analizuara janë me përmasa të barabarta. Në këtë rast janë hedhur dy hipotezat:
Hipoteza Ho: Mesataret e rezultateve të çdo testi nuk ndryshojnë midis tyre.
Hipoteza H1: Mesataret e rezultateve të çdo testi janë të ndryshme.
Nëse $p > 0.05$ pranohet hipoteza Ho, nëse $p < 0.05$ pranohet hipoteza H1 dhe hidhet poshtë hipoteza Ho.

Analiza korrelative përdoret për të përcaktuar nëse dy variabla janë të pavarur midis tyre ose bashkëndryshojnë, që do të thotë që variojnë së bashku. Me anë të korrelacionit, përcaktohet masa e shoqërimit si edhe drejtimi i shoqërimit. Në këtë studim është llogaritur koefiçienti i korrelacionit të produktit të momentit, i nxjerrë nga Karl Pearson. Testi i sinjifikancës në korrelacion përcakton nëse një koefiçient korrelacioni i një mostre nxirret nga një popullatë me koefiçient korrelacioni parametrik zero. Në këtë rast janë hedhur dy hipotezat:
Hipoteza Ho: Dy teknikat nuk korrelojnë midis tyre.
Hipoteza H1: Dy teknikat korrelojnë midis tyre.
Nëse $p > 0.01$ pranohet Hipoteza Ho, nëse $p < 0.01$ pranohet hipoteza H1.

Nëpërmjet programit MedCalc janë ndërtuar grafikët ROC, të cilët përfaqësojnë një metodë shumë efikase për vlerësimin e cilësisë së testeve diagnostikuese. Këta grafikë ndërtohen nëpërmjet vlerave të ndjeshmërisë në boshtin e ordinatave dhe 1-vlerat e specificitetit në boshtin e abshisave. Çdo pikë në grafik quhet pika operative dhe

formohet nëpërmjet përdorimit të niveleve të ndryshme cutoff për një rezultat pozitiv. Grafiku ROC vlerësohet nëpërmjet këtyre pikave diskrete dhe për çdo test ndërtohet një shpërndarje e caktuar e rezultateve të tij. Një nga matjet më të rëndësishme që lidhet me grafikun ROC është koefiçienti AUC. AUC është një matje e kombinuar e ndjeshmërisë dhe specificitetit, vlerëson performancën e përgjithshme të një testi diagnostikues dhe vlerat e tij luhaten ndërmjet 0 dhe 1. Sa më afër vlerës 1 të jetë koefiçienti AUC aq më e mirë është performanca e një testi diagnostikues. Kufiri i poshtëm i lejuar i koefiçientit AUC për një test diagnostikues është 0.5. Grafikët ROC dhe koefiçienti AUC i një testi nuk janë fikse sepse ndryshojnë për grupe të ndryshme pacientësh. *(Seong Ho Park et al., 2004)* Koefiçienti AUC llogaritet nëpërmjet formulës së mëposhtme:

$$AUC = \frac{1}{mn} \sum_{i=1}^{m} \sum_{j=1}^{n} 1\,(pi > pj)$$

m= rezultatet pozitive; n=rezultatet negative.

2.1. Materiale dhe metoda në Sistemin COBAS 6000

2.1.1. Përshkrimi i proçedurës së matjes në aparatin COBAS 6000

Analizatori cobas 6000 (e 601) realizon reaksionet imunologjike nëpërmjet elektrokemiolumineshencës (ECL). Një test ECL përfshin faza të ndryshme pipetimi , një periudhë inkubimi dhe një fazë përfundimtare të matjes.
Tre fazat e mësipërme realizohen në epruveta të vogla të quajtura kupa të analizave. Secili cikël i duhur i pipetimit zhvillohet për një kohë të përcaktuar, prej 42 sekondash. Pas kohës së duhur të inkubimit, përzierja e reaksionit pipetohet në dhomat e matjes ku zhvillohet procesi i matjes. Pas çdo pipetimi, gjilpërat e mostrës ose reagentit pastrohen dhe nëqoftëse është e nevojshme pastrohet edhe mikseri i mikropjesëzave.

Procedurat e përgatitjes: Pasi ndizet analizatori, fillojnë proçeset e fillimit gjatë të cilave mekanizmat rivendosen në pozicionet e tyre të punës. Selektohen testet e duhura për mostrën e pacientit dhe fillon proçedura duke u bazuar në protokollin përkatës të çdo testi *(MODULAR ANALYTICS E170, Elecsys 2010 and cobas e analyzers, 2011).* Fillimisht aspirohet një reagent (R1 ose R2) dhe mostra ose mikrocopëzat njëra pas tjetrës. Pas çdo aspirimi gjilpërat e aspirimit pastrohen. Mostra dhe reagenti hidhen në një kupë të re analize, ndërsa gjilpëra e analizës hidhet në koshin e duhur. Për disa teste që kërkojnë edhe hollim, diluenti (pretreatment) pipetohet së bashku me mostrën në një kupë analize. Më pas një sasi e mostrës së holluar hidhet bashkë me reagentin në një kupë të re analize.

2.1.2. Parimet e metodave imunokimike në teknologjinë ECL

Për e antitrupave anti-Toxoplasma IgM dhe anti-Citomegalovirus IgM në aparatin COBAS 6000 përdoret parimi bridging *(MODULAR ANALYTICS E170, Elecsys 2010 and cobas e analyzers, 2011).*
Parimi bridging (fig 2-1) është programuar që të masë antitrupat në lëngjet biologjike (IgA, IgG ose IgM). Kjo plotësohet me shtimin e antigeneve të biotiniluar dhe të markuar me rutenium në reagentët për të cilët ka afinitet antitrupi target.

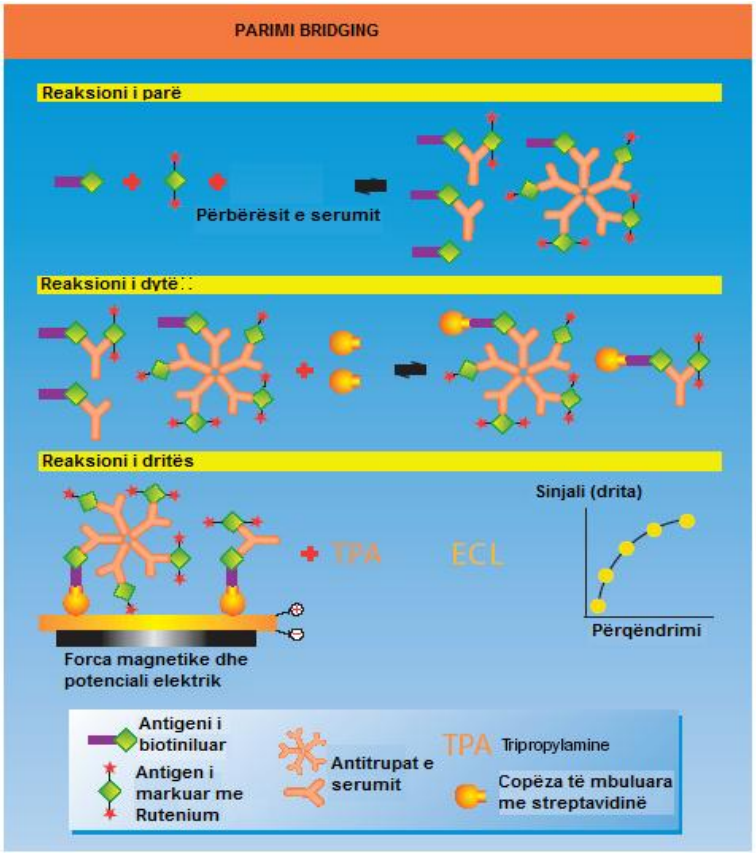


Figura 2-2: Parimi bridging

A. Fazat e matjes së antitrupave anti-Toxoplasma IgM:

Kohëzgjatja e çdo testi është 18 minuta dhe kalon në fazat e mëposhtme *(MODULAR ANALYTICS E170, Elecsys 2010 and cobas e analyzers, 2011; Roche Diagnostics, Operator's manual, Version1,0):*

- Inkubimi i parë: Shtohet antigeni rekombinant specifik i *Toxoplasma gondii*, i markuar me një kompleks ruteniumi. Antitrupat anti-toxoplasma IgM të pranishme në mostër veprojnë me kompeksin ruthenium-antigen.

- Inkubimi i dytë: Shtohen antitrupa monoklonalë specifikë IgM të biotiniluar dhe mikropjesëza të mbuluara me streptavidinë. Kompleksi lidhet me fazën solide nëpërmjet ndërveprimit të biotinës dhe streptavidinës.
- Përzierja e reaksionit kalon në dhomat e matjes, ku mikropjesëzat kapen magnetikisht në sipërfaqen e elektrodës. Pjesët e palidhura largohen me përdorimin e ProCell (shpëlarës).
- Aplikimi i një rryme elektrike indukton emetimin kemilumineshent, i cili matet nga një fotoamplifikues.
- Rezultatet përcaktohen automatikisht nëpërmjet krahasimit të sinjalit elektrokemilumineshent të përftuar nga produkti i reaksionit të mostrës dhe sinjalit të vlerës cutoff të përftuar paraprakisht nga kalibrimi i kitit Toxo IgM.

B. Fazat e matjes së antitrupave anti-Citomegalovirus IgM:

Fazat e matjes së antitrupave anti-Citomegalovirus IgM janë të ngjashme me fazat e përmendura më sipër *(MODULAR ANALYTICS E170, Elecsys 2010 and cobas e analyzers, 2011; Roche Diagnostics, Operator's manual, Version1,0).* Ndryshimi qëndron në dy fazat e inkubimit, të cilat shprehen respektivisht më poshtë:

- Inkubimi i parë: Shtohen antitrupa monoklonalë specifikë anti-IgM të biotiniluar.
- Inkubimi i dytë: Shtohet antigeni rekombinant specifik i *Citomegalovirusit*, i markuar me një kompleks ruteniumi dhe mikropjesëza të mbuluara me streptavidinë. Antitrupat anti-CMV IgM të pranishme në mostër veprojnë me kompeksin ruthenium-antigen.Kompleksi lidhet me fazën solide nëpërmjet ndërveprimit të biotinës dhe streptavidinës.

2.1.3. Reagentët Elecsys Toxo IgM dhe Elecsys CMV IgM

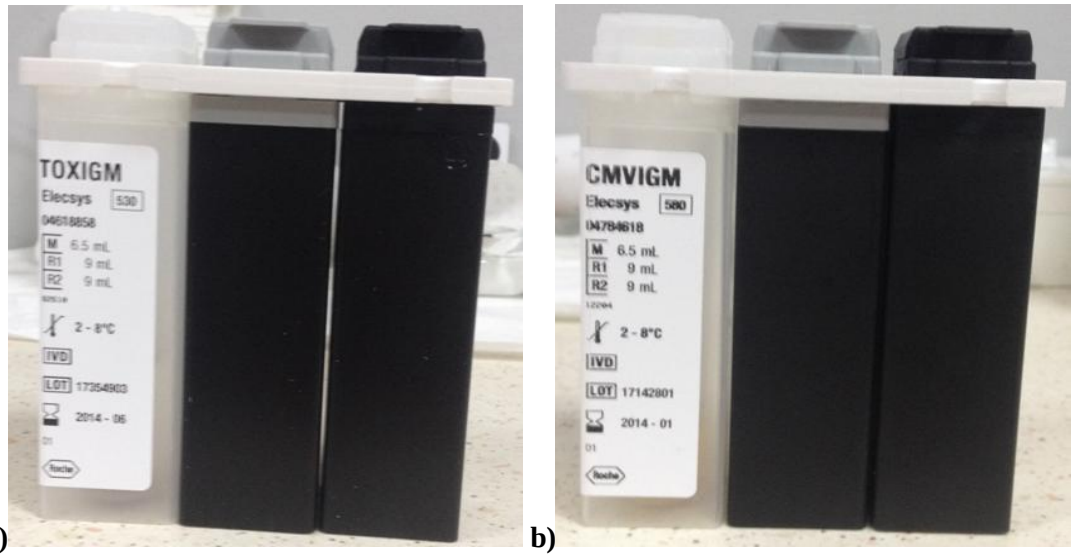
Reagentët e cobas e 601 kanë një barkod dydimensional (2D). Kjo lejon regjistrim plotësisht automatik dhe menaxhim të informacionit për reagentët. Çdo reagent përbëhet nga tre shishe M, R1 dhe R2, ku ndodhen reagentët e nevojshëm për analizë.

Përbërja e reagentëve TOXO M (REF 04618858 190 COBAS)

- M: Është shishe e bardhë me një kapak transparent, në të cilën ndodhen mikropjesëza të mbuluara me streptavidinë 0.72 mg/ml, me vëllim 6.5 ml.
- R1: Është shishe e zezë me kapak gri, me vëllim 9 ml, përmban antigenet e Toxoplasmës të markuar me kompleksin e ruteniumit > 1 mg/l dhe bufer acid sulfonik 2-morfolino-etan 50 mmol/l, pH=6.
- R2: Është shishe e zezë me kapak të zi, me vëllim 9 ml, përmban antitrupat monoklonalë të biotiniluar > 500 µg/l dhe bufer acid sulfonik [4-(2-hidroksietil)-piperazinë]-etan 50 mmol/l, pH=7.2.

Përbërja e reagentëve CMV M (REF 04784618 190 COBAS)

- M: Është shishe e bardhë me një kapak transparent, në të cilën ndodhen mikropjesëza të mbuluara me streptavidinë 0.72 mg/ml, me vëllim 6.5 ml.
- R1: Është shishe e zezë me kapak gri, me vëllim 9 ml, përmban antitrupat monoklonalë të biotiniluar > 500 µg/l > 1 mg/l dhe bufer acid sulfonik 2-morfolino-etan 50 mmol/l, pH=6,5.
- R2: Është shishe e zezë me kapak të zi ,me vëllim 9 ml, ndodhen antigenet e Citomegalovirusit të markuar me kompleksin e ruteniumit > 50 µg/l dhe bufer acid sulfonik 2-morfolino-etan 50 mmol/l, pH=5.5. *(Roche Diagnostics, Operator's manual, Version1,0).*



a) **b)**

Figura 2-3: Reagentët Elecsys. a) Reagenti Elecsys Toxo IgM; b) Reagenti Elecsys CMV IgM (foto: B. Laze).

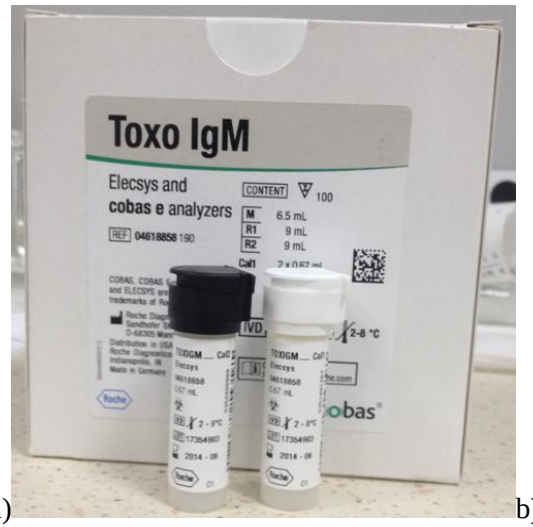
2.1.4. Kitet e kalibratorëve Elecsys calset

Për të realizuar kalibrimin përdoren kitet Elecsys Calset Toxo IgM. Secili kit përmban kalibratorë të markuar me barkode 2D. Shumica e kalibratorëve janë të përgatitur dhe të gatshëm për tu vendosur në raket e kalibrimit, kur është i nevojshëm një kalibrim. Disa prej kalibratorëve janë në gjendje të liofilizuar dhe duhen përgatitur hollimet përkatëse. Në rastin konkret, çdo kit TOXO M dhe CMV M përmban një çift kalibratorësh të cilët dallohen nga ngjyra e kapakëve të shisheve plastike. Kapaku i bardhë tregon kalibratorin e nivelit 1, ndërsa kapaku i zi tregon kalibratorin e nivelit 2. Gjithashtu në kutinë e kitit të kalibratorit ndodhet edhe karta e skanimit të kalibratorit. Secila shishe kalibratori ka një barkod linear që përmban një identifikues për tu lidhur me informacionin e koduar në barkodin e reagentit dhe në kartën e kalibratorit. Kalibratorët duhen përdorur të dy sëbashku dhe atëherë kur është e nevojshme. *(Roche Diagnostics, Operator's manual, Version1,0).*

Figura 2-4: Kalibratorët Elecsys të markuar me barkod dydimensional (foto: B. Laze).

Kalibrimi duhet të realizohet *(Roche Diagnostics, Operator's manual, Version1,0.*:

- Për çdo kit të ri Elecsys Toxo IgM ose Elecsys CMV IgM, jo më shumë se 24 orë pas regjistrimit të kitit në aparat.
- Pas një muaji nëse përdoret një reagent i ri me të njëjtin numër loti me reagentin e parë.
- Pas 7 ditësh nëse përdoret i njëjti reagent në aparat.
- Çdo herë që vlera e kontrolleve rezulton jashtë limiteve të specifikuar.

a) 

b)

Figura 2-5: Kitet Calset Elecsys a) Kalibratorët Cal1 TOXO M dhe Cal2 TOXO M. b) Kalibratorët Cal1 CMV M dhe Cal2 CMV M (foto: B. Laze).

Kalibratorët për kitin TOXO M

- Kalibratori Cal1: Është kalibratori negativ, ka dy shishe me vëllim 0.67 ml secila dhe përmbajnë serum human negativ për anti-Toxo IgM ose anti-CMV IgM.
- Kalibratori Cal2: Është kalibratori pozitiv, ka dy shishe me vëllim 0.67 ml secila dhe përmbajnë anti-Toxo IgM ose anti-CMV IgM humane, përafërsisht 130 U/ml. *(Roche Diagnostics, Operator's manual, Version1,0).*

Kalibratorët për kitin CMV M

- Kalibratori Cal1: Është kalibratori negativ, ka dy shishe me vëllim 1 ml secila dhe përmbajnë serum human negativ për anti-CMV IgM.
- Kalibratori Cal2: Është kalibratori pozitiv, ka dy shishe me vëllim 1 ml secila dhe përmbajnë anti-CMV IgM humane në bufer acid sulfonik [4-(2-hidroksietil)-piperazinë]-etan pH 7.4 dhe albumin. *(Roche Diagnostics, Operator's manual, Version1,0).*

2.1.5. Kitet e kontrollit Roche Precicontrol Toxo IgM dhe CMV IgM

Secili kit përmban gjithashtu kontrolle të markuar me barkode 2D. Siç e theksuam për kalibratorët, disa prej kontrolleve janë të përgatitur dhe të gatshëm për t'u vendosur në raket e kalibrimit, kur është i nevojshëm një kalibrim.
Disa prej kontrolleve janë në gjendje të liofilizuar dhe duhen përgatitur hollimet përkatëse. Në rastin konkret, çdo kit TOXO M dhe CMV M përmban një çift kontrollesh të cilët dallohen nga ngjyra e kapakëve të shisheve plastike. Kapaku në ngjyrë bezhë tregon Precikontrollin e nivelit 1, ndërsa kapaku me ngjyrë kafe tregon Precikontrollin e nivelit 2. Gjithashtu në kutinë e kitit të kontrollit ndodhet edhe karta e skanimit.
Secila shishe kontrolli ka një barkod linear që përmban një identifikues për t'u lidhur me informacionin e koduar në barkodin e reagentit dhe në kartën e kontrollit.
Kontrollet duhen përdorur të dy sëbashku për të kontrolluar kurbën e kalibrimit të reagentit, atëherë kur është e nevojshme. *(Roche Diagnostics, Operator's manual, Version1,0).*

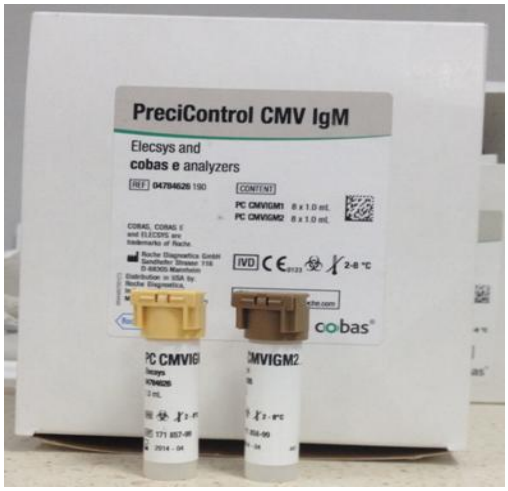


Figura 2-6: Precicontroll CMV M 1 dhe Precicontroll CMV M 2 (foto: B. Laze).

2.1.6. Normat e rezultateve në aparatin COBAS 6000.

Aparati COBAS 6000 llogarit automatikisht vlerën cut off të bazuar në matjet e kalibratorëve Cal1 dhe Cal2 *(MODULAR ANALYTICS E170, Elecsys 2010 and cobas e analyzers).* Rezultati për çdo mostër përcaktohet si reaktivë ose joreaktivë në formën e një indeksi cutoff (sinjali i mostrës/cutoff).

- Rezultatet e përftuara me testet Elecsys Toxo IgM mund të interpretohen si më poshtë:

- Negative (Joreaktive) – nëse indeksi është < 0.8 COI
- Pozitive (Reaktive) – nëse indeksi është ≥ 1 COI
- E dyshimtë – nëse 0.8 ≤indeksi<1 COI

- Rezultatet e përftuara me testet Elecsys CMV IgM mund të interpretohen si më poshtë:

- Negative (Joreaktive) – nëse indeksi është < 0.7 COI
- Pozitive (Reaktive) – nëse indeksi është ≥ 1 COI
- E dyshimtë – nëse 0.7 ≤indeksi< 1 COI

2.2. Materiale dhe metoda në sistemin MINI-VIDAS

2.2.1. Proçedura e matjes në aparatin MINI-VIDAS (bioMerieux SA)

Realizimi i një matjeje me sistemin MINI-VIDAS fillon me përgatitjen e mostrave, në rastin tonë mostrat kanë qënë të ruajtura në frigorifer në temperaturën -25 ± 6 °C. Protokolli përcakton radhën specifike të proçeseve të kërkuara për zhvillimin e një testi të caktuar (REF 30205 06637I, bioMerieux SA). Ai realizon përcaktimin e:

- vëllimit të mostrës,
- kohën e inkubimit në SPR,
- frekuencën e ciklimeve të reagentëve jashtë dhe brenda SPR-së,
- lëvizjen e SPR-së dhe stripit të reagentit,
- leximin final.

- Testet që përdorin të njëjtin protokoll mund të vendosen në të njëjtin seksion. Aparati Vidas grupon automatikisht testet e krahasueshme. Mostra duhet të vendoset në pusetën e parë të stripit të reagentit, siç përshkruhet në paketimin e testit. Vëllimi i mostrës së kërkuar ndryshon në varësi të testit. Stripi i reagentit vendoset horizontalisht në mënyrë që puseta e duhur të jetë nën fazën SPR. SPR-ja zhvendoset poshtë-lart që të pipetojë reagentët e kërkuar.

- Përdoret një strip TOXO M (ose CMV M) dhe një SPR për çdo mostër, kontroll ose standart që do të testohet.

- Çdo test përfundon për afërsisht 60 minuta *(Vidas Manual instrument, Version B)*

2.2.2. Teknika ELFA (bioMerieux SA)

Reaksioni dinamik

Përpara fillimit të proçedurës, sistemi kontrollon reagentët, skanon bar kodin, lexon fluoreshencën e substratit dhe kontrollon datën e skadencës së stripit

Në secilën fazë, reagenti ciklohet disa herë jashtë dhe brenda SPR-së. Kjo rrit kinetikën e reaksionit dhe zvogëlon kohën e inkubimit. *(Vidas Manual instrument, Version B)*

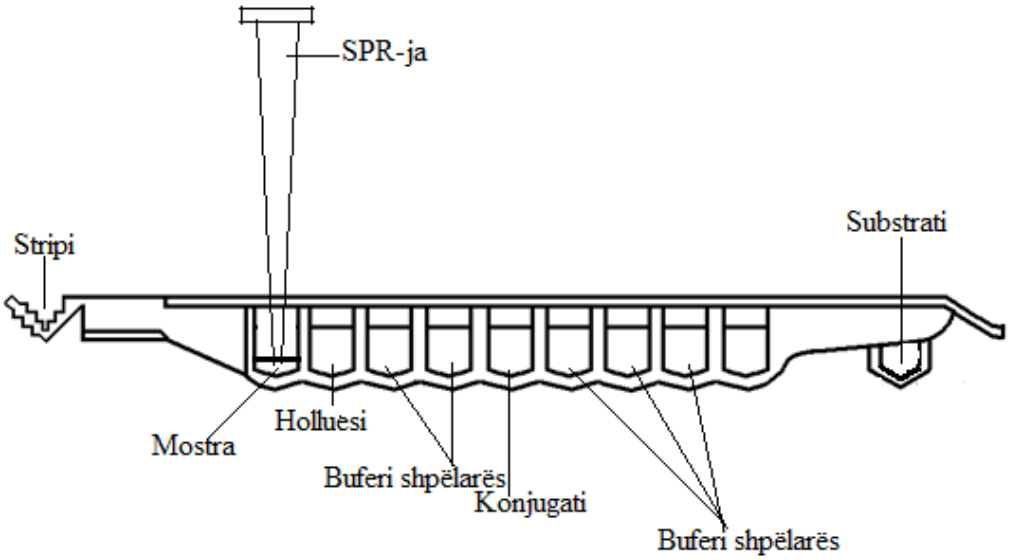


Figura 2-7: Përmbajtja e një stripi reagenti në sistemin VIDAS.

Reaksioni imunologjik

Kjo teknikë aplikohet në aparatin MINI-VIDAS. Teknika ELFA bazohet në kombinimin e një metode enzimatike dhe një leximi final fluoreshent. Reagentët e nevojshëm për zhvillimin e analizave janë të gatshëm dhe të vendosur paraprakisht në stripe. Reaksioni ciklohet brenda dhe jashtë fazës solide disa herë. Gjatë kësaj kohe, antitrupat specifikë anti-Toxoplasma IgM (ose anti-Citomegalovirus IgM) të pranishëm më serum do të lidhen me antigenin që ndodhet në paretet e fazës solide. Përbërësit e palidhur eleminohen gjatë fazave të shpëlarjes. Një antitrup monoklonal IgM (antihuman) i markuar me fosfatazë alkaline ciklohet brenda dhe jashtë fazës solide. Nëpërmjet një shpëlarjeje të fundit largohen përbërësit e palidhur. Gjatë fazës së fundit të matjes, ciklohet substrati (4-Metil-umbelliferil fosfati) brenda dhe jashtë fazës solide. Konjugati katalizon hidrolizën e këtij substrati duke formuar një produkt fluoreshent, 4-Metil-umbelliferoni, fluoreshenca e të cilit matet në gjatësinë e valës 450 nm *(Vidas Manual instrument, Version B)*

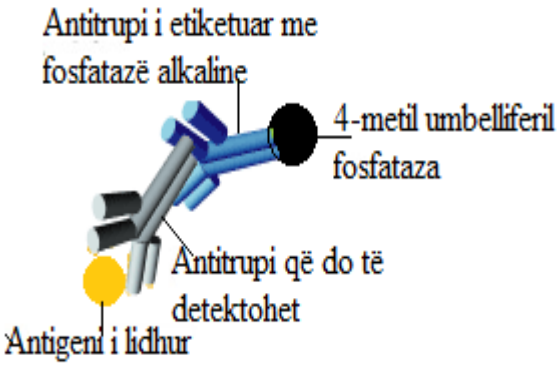


Figura 2-8: Metoda EIA indirekte në aparatin MINI-VIDAS *(bioMerieux SA)*.

Intensiteti i fluoreshencës matet nga skaneri optik i aparatit minividas dhe shprehet në vlerë relative të fluoreshencës (RFV). Sistemi optik i aparatit Vidas mat përqëndrimin e reagentit të zhvilluar gjatë analizës, duke përdorur një kanal të vetëm fluorometrik. Më pas reagenti prodhon një sinjal fluoreshent në përpjestim të drejtë me përqëndrimin e tij.

Sistemi optik i aparatit kontrollohet dhe kalibrohet nga teknikët gjatë proçeseve të mirëmbajtjes. Pasi realizohet kalibrimi i rregullt, ai mat fluoreshencën e standartit dhe e ruan këtë vlerë në kujtesë. Kjo vlerë fluoreshence do të bëhet pika e referimit për të gjitha kontrollet pasuese të kalibrimit. Kur procedura mbaron, rezultatet analizohen automatikisht nga kompjuteri, një vlerë testi gjenerohet për çdo mostër dhe printohet. Vlera e testit (TV) llogaritet me raportin RFV / standarten e vlerës së fluoreshencës (FV). Rezultati është negativ kur TV <0.05 dhe pozitiv kur TV ≥ 0.05. *(bioMerieux SA; (Vidas Manual instrument, Version B)*

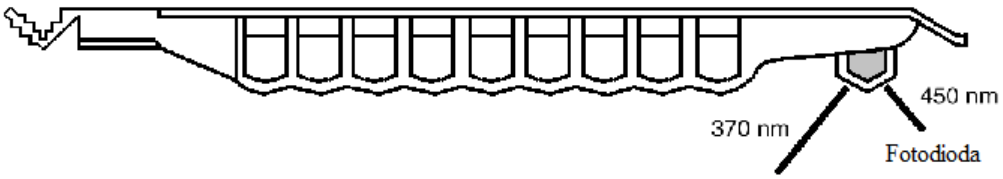


Figura 2-9: Leximi fluoreshent në sistemin Vidas

2.2.3. Kitet e reagentëve Vidas Toxo IgM dhe CMV IgM

Çdo kit Vidas përmban reagentët e nevojshëm për zhvillimin e një analize specifike *(REF 30205, bioMerieux SA)*. Përmbajtja e kiteve mund të ndryshojë në varësi të analizës, por zakonisht një kit përmban:
-Stripe reagenti tek ose çift.
-Faza solide SPR (një fazë për stripet tek dhe dy faza për stripet çift)
-Kontrollet dhe kalibratorët
-Standartet e nevojshme
-Një hollues (sipas kërkesës)
-Paketimin e duhur
-Kartë kalibratori

Stripet e reagentëve

Stripet e reagentëve tek përmbajnë 10 puseta. Mostra hidhet në pusetën e parë. Tetë pusetat e tjera përmbajnë reagentët e nevojshëm (konjugatin, holluesin, buferin shpëlarës). Puseta e fundit është kyveta optike në të cilën matet fluoreshenca e substratit. *(Vidas Manual instrument, Version B)*

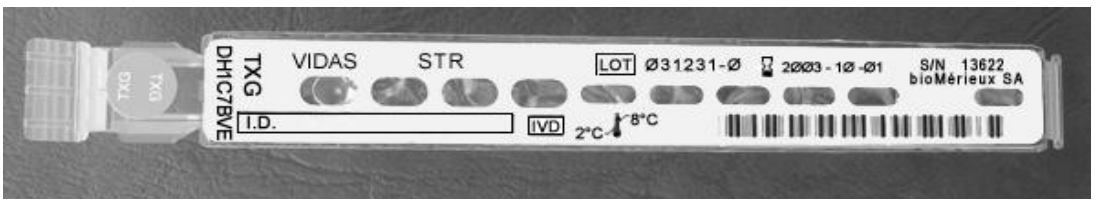


Figura 2-10: Strip reagenti tek Vidas Toxoplasma.

Disa teste kërkojnë përdorimin e stripeve çifte të reagentëve që përmbajnë dy stripe të ngjitura me njëra-tjetrën. Mostra ndahet ndërmjet dy pusetave të para të dy stripeve. Stripi i sipërm shërben si strip reference ndërsa stripi i poshtëm është stripi ku analizohet mostra pasi përmban një reagent më shumë se stripi i referencës (fig 2-11). Krahasimi i matjeve ndërmjet dy stripeve përcakton rezultatet e testit. *(Vidas Manual instrument, Version B)*

Figura 2-11: Stripi çift i reagentëve Vidas Toxo G dhe Toxo A.

Çdo strip reagenti që përdoret në aparatin MINI-VIDAS përmban 10 puseta, të cilat janë të mbuluara nga një qese e vulosur. Vulosja përfshin një barkod, i cili tregon kodin e testit, numrin e lotit të kitit dhe datën e skadencës. Qesja e pusetës së parë është e shpuar për të lehtësuar hedhjen e mostrës. Puseta e fundit e çdo stripi është një kyvetë në të cilën zhvillohet leximi fluorometrik. Pusetat në qendër të stripit përmbajnë reagentët e tjerë të nevojshëm për zhvillimin e testit. Stripi i reagentit TOXO M dhe CMV M përmban reagentët e mëposhtëm (REF 30205 bioMerieux SA):

- Puseta 1: Është vendi ku shtohet mostra.
- Puseta 2: Përmban serum human me anti-IgG dhe 1 g/l sodium azid (300µ/l)
- Puseta 3: Përmban serum human me anti-IgG dhe 1 g/l sodium azid (600µ/l)
- Puseta 4: Përmban solucion para-shpëlarës: Fosfat (10 mmol/l) pH 7.2, stabilizues proteinash dhe 1 g/l sodium azid (600µ/l).
- Pusetat 5, 7, 8, 9: Përmban solucion shpëlarës: TRIS (50 mmol/l) pH 7.4 dhe 1 g/l sodium azid (600µ/l).
- Puseta 6: Përmban konjugatin: Fosfatazë alkaline e markuar me antitrupa monoklonalë humanë IgM dhe 1 g/l sodium azid (400µ/l).
- Puseta 10: Është puseta ku ndodh leximi fluoreshent i substratit 4-metil-umbelliferil fosfati (0.6 mmol/l), dietanolaminës (0.62 mol/l, pH 9.2) dhe 1 g/l sodium azid (300µ/l)

Përpara se të përdoret një reagent me lot të ri, duhet të regjistrohen në aparat të dhëna specifike në lidhje me kurbën e kalibrimit. Këto të dhëna ndodhen në një kartë në çdo kit të ri.

Çdo strip Vidas përmban një etiketë dhe një shenjë të koduar dhe të ngjyrosur, të cilat identifikohen nga një kod me 2-4 karaktere. Barkodi identifikon:
-Emrin e testit
-Numrin (lotin) e prodhimit
-Datën e skadencës së kitit.

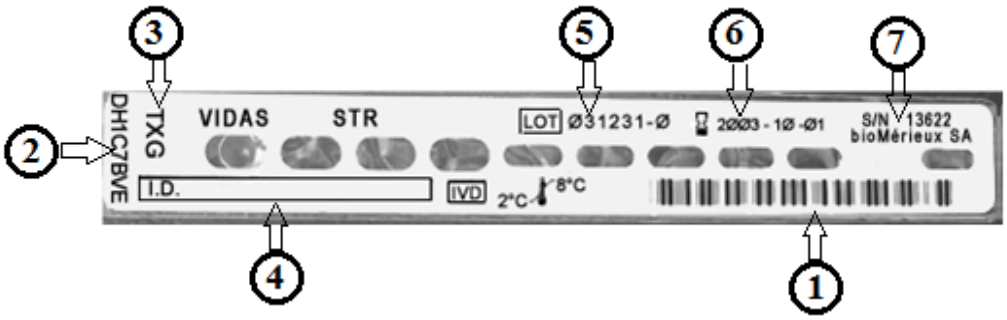


Figura 2-12: Etiketat e një stripi reagent Vidas Toxo : 1- barkodi- lexohet nga aparati për t'u njohur me testin, 2-numri përfaqëuses i barkodit-nese sistemi nuk e lexon dot barkodin, lexohet ky numër, 3-kodi i testit-përfaqëson emrin e testit që do të zhvillohet, 4-ID- është një hapësirë boshe ku mund të shkruhet emri i pacientit, nëse është e nevojshme, 5-numri i lotit-përdoret nga aparati për të koduar datën e skadencës së testit, 6-data e skadencës-korrespondon me datën e skadenvës së reagentit, 7-numri rendor- çdo kuti reagentësh ka një numër që korrespondon me rendin e prodhimit. *(Vidas Manual instrument, Version B)*

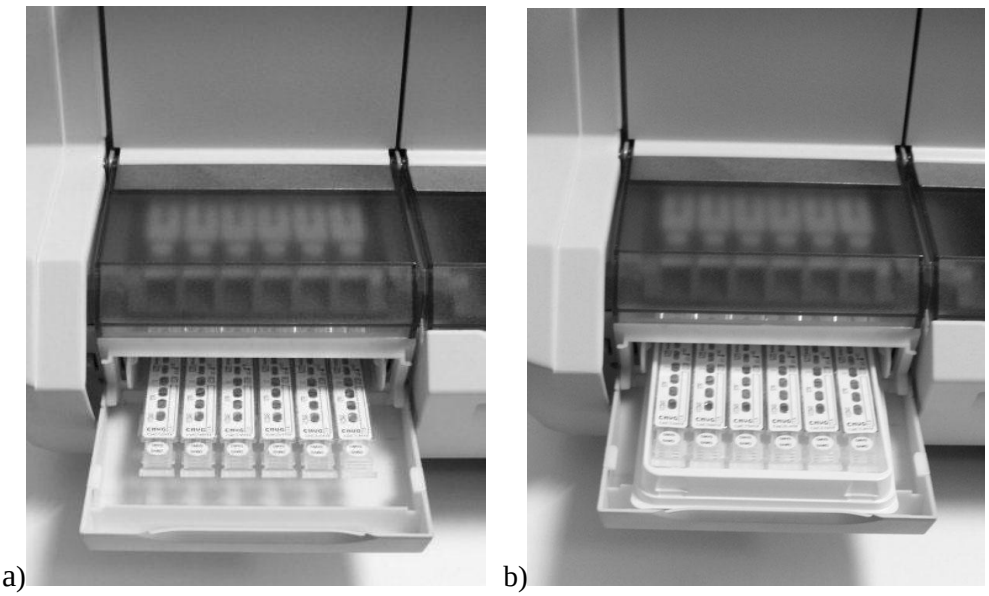


Figura 2-13: Kutia e stripeve të reagentëve Vidas. a) Stripet e reagentëve janë të vendosura në kutinë e stripeve të ndarë nga njëri-tjetri. b) Stripet e reagentëve janë të vendosura në kutinë e stripeve së bashku me kutinë e tyre.

Faza solide SPR

SPR-ja është një pajisje plastike (polistireni ose polipropileni) e aftë për të kapur proteinat e tretshme, viruset dhe bakteret. Ajo është e shënuar me një shenjë të koduar dhe të ngjyrosur. SPR-ja është faza solide bazë për reaksionin imunologjik. Paretet e saj të brendshme janë të veshura me antitrupa ose antigene që përdoren për të kapur analitin shenjë. SPR-ja përdoret për të pipetuar mostrën dhe reagentët dhe për të eleminuar ndotjet ndërmjet reagentit dhe aparatit. Mirëmbajtja është e reduktuar në

minimum sepse nuk ka tuba, shiringa apo gjilpëra. Çdo SPR për një test specifik identifikohet nëpërmjet një kapeleje të ngjyrosur e të koduar dhe një kod që përfaqëson emrin e testit. *(Vidas Manual instrument, Version B)*

Për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM dhe anti-Citomegalovirus IgM, paretet e fazës solide janë të veshura me antigene të purifikuar të Toxoplasmës dhe Citomegalovirusit. Çdo SPR identifikohet nëpërmjet kodit të TOXO IgM dhe CMV IgM-së. *(bioMerieux SA)*

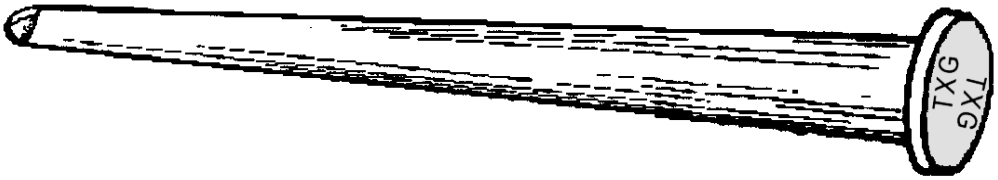


Figura 2-14: Skema e një SPR-je. Përveç pipetimit, SPR-ja përdoret për inkubim, përzierje dhe shpëlarje.

Kitet e kalibrimit dhe kontrollit

- Kalibrimi: Realizohet duke përdorur standartet e çdo kiti dhe duhet të zhvillohet sa herë hapet një reagent me lot të ri, pasi janë regjistruar të dhënat e kartës së kalibrimit. Pas kësaj, kalibrimi duhet të zhvillohet çdo 14 ditë.

- Në çdo kit VIDAS TOXOM janë të përfshira një kontroll negativ dhe një kontroll pozitiv. Këto kontrolle duhet të zhvillohen menjëherë pas hapjes së një kiti të ri, për t'u siguruar që performanca e reagentit nuk ka pësuar ndryshime. Gjithashtu, çdo kalibrim duhet të kontrollohet nëpërmjet këtyre dy kontrolleve. *(bioMerieux SA)*

Figura 2-15: Blloku SPR

Pjesa e sipërme e çdo seksioni VIDAS përmban një derë të vogël, e cila siguron hyrjen e bllokut SPR. 6 pozicionet e bllokut SPR korrespondojnë me 6 pozicionet e

stripeve të reagentëve (fig 2-15). Gjatë proçesit të analizës, SPR-të formojnë një mekanizëm pipetimi që përdoret gjatë gjithë analizës. Reagenti ciklohet jashtë dhe brenda çdo SPR-je nëpërmjet një sistemi pistonash me ajër. *(bioMerieux SA)*

Inkubatori: Zhvillimi i testeve me aparatin Vidas kërkon një temperaturë të kontrolluar. Temperatura e çdo seksioni, kutie reagentësh dhe blloku SPR-je kontrollohet dhe monitorohet individualisht. Çdo kuti reagentësh dhe bllok SPR-je është e pajisur me një sistem matjesh të temperaturës me një saktësi të lartë, i njohur si termistor. Gjatë prodhimit të aparatit, çdo termistor testohet sipas NIST (Instituti Kombëtar i Standarteve dhe Teknologjisë) dhe shfaq ndjeshmëri ndaj luhatjeve të temperaturave me 0.2°. *(Vidas Manual instrument, Version B)*

Sstemi i matjes: Sistemi i matjes në aparatin Vidas konsiston në një skanim optik fluorometrik. Ky sistem është i montuar në një pajisje mekanike duke mundësuar përdorimin në të pestë seksionet. Sistemi detekton çdo ndryshim kimik që mund të ndodhë në kyvetën optike në fund të stripit të reagentit (fig 2-20).

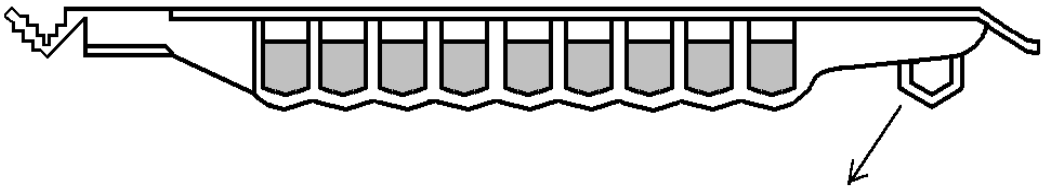


Figura 2-16: Kyveta optike në një strip reagenti Vidas.

Njësia qëndrore kontrollon të gjitha aspektet e funksionimit të aparatit Vidas, duke përfshirë të dhënat e analizave dhe verifikimin e sistemeve optike dhe mekanike. Aparati është i lidhur me një kompjuter, i cili shfaq, printon dhe ruan rezultatet. *(bioMerieux SA)*

2.2.4. Normat e rezultateve në aparatin MINI-VIDAS

Aparati MINI-VIDAS i shpreh rezultatet si indeks (raporti ndërmjet vlerës së sinjalit fluoreshent të gjetur në serumin që testohet dhe sinjalit standart që ruhet në kujtesën e aparatit). Fluoreshenca matet dy herë për çdo mostër në kyvetën e stripit të reagentit. Leximi i parë fluoreshent realizohet para përfshirjes së fazës solide në substrat. Leximi i dytë fluoreshent realizohet pas inkubimit të substratit me enzimën që ka mbetur në brendësi të fazës solide. Vlera Relative e Fluoreshencës (RFV) llogaritet duke zbritur vlerën e leximit fillestar nga leximi final. *(bioMerieux SA)*

- Rezultatet e përftuara me testin VIDAS CMV M :

- Negative – nëse indeksi është < 0.7
- Pozitive – nëse indeksi është ≥ 0.9
- E dyshimtë – nëse $0.7 \leq$ indeksi < 0.9

- Rezultatet e përftuara me testin VIDAS TOXO M:

- Negative – nëse indeksi është < 0.7
- Pozitive – nëse indeksi është ≥ 0.9
- E dyshimtë – nëse 0.7≤ indeksi<0.9

2.3. Materiale dhe metoda në sistemin CHORUS

2.3.1. Procedura në testin ELISA CHORUS

Kjo procedurë zhvillohet sipas protokolleve të kiteve CHORUS ELISA TOXO IgM *(DIESSE IO-09/013-C IFU 81041)* dhe CMV IgM *(IO-09/002-C IFU 81011)*

- Serumi i paholluar shtohet në pusetën 1 të çdo stripi që do të përdoret. Dy prej stripeve duhet të përdoren për kalibratorin (nëse është e nevojshme) dhe kontrollin.
- Vendosen stripet në aparat dhe realizohet proçedura e matjes.
- Për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM dhe anti-Citomegalovirus IgM përdoret metoda indirekte (sandwich).
- Antigenet e purifikuar të toxoplasmës ose të citomegalovirusit janë të fiksuar në fazën solide. Antitrupat specifike anti-Toxoplasma IgM lidhen me antigenet gjatë një inkubimi me serumin e holluar. Serumi, paraprakisht hollohet me një hollues që bllokon antitrupat IgG.
- Pas shpëlarjeve për eleminimin e proteinave që nuk veprojnë, mostra inkubohet me konjugatin e përbërë nga antitrupat monoklonalë IgM të lidhur me peroksidazë.
- Realizohen përsëri shpëlarje për largimin e konjugatit të palidhur dhe shtohet substrati.
- Ngjyra e formuar është në përpjestim të drejtë me përqëndrimin e antitrupave specifikë të pranishëm në serum. *(G. B. Wisdom, 1976 dhe R. Ziegalmaier, et al., 1980)*

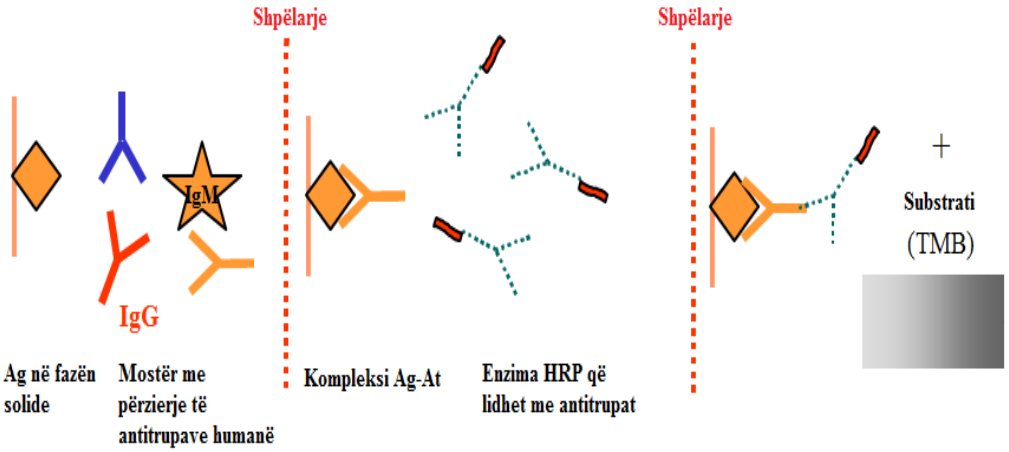


Figura 2-17: Metoda indirekte në aparatin CHORUS *(G. B. Wisdom, 1976 dhe R. Ziegalmaier, et al., 1980)*

2.3.2. Reagentët CHORUS ELISA TOXO M dhe CHORUS ELISA CMV M

Kiti CHORUS ELISA TOXO IgM *(DIESSE IO-09/013-C IFU 81041)* dhe CHORUS ELISA CMV IgM *(IO-09/002-C IFU 81011)* përmban 36 teste, një kalibrator dhe një kontroll. Çdo test është në trajtën e një stripi. Stripi përmban 7 puseta, përmbajtja e të cilave njihet nga aparati nëpërmjet leximit të një barkodi. Barkodi tregon kodin e analizës, numrin e lotit dhe datën e skadencës së kitit. Në pusetën e parë hidhet serumi jo i holluar, ndërsa pusetat e tjera përmbajnë reagentët e nevojshëm për zhvillimin e analizës. *(DIESSE Diagnostica manual, 2011).*

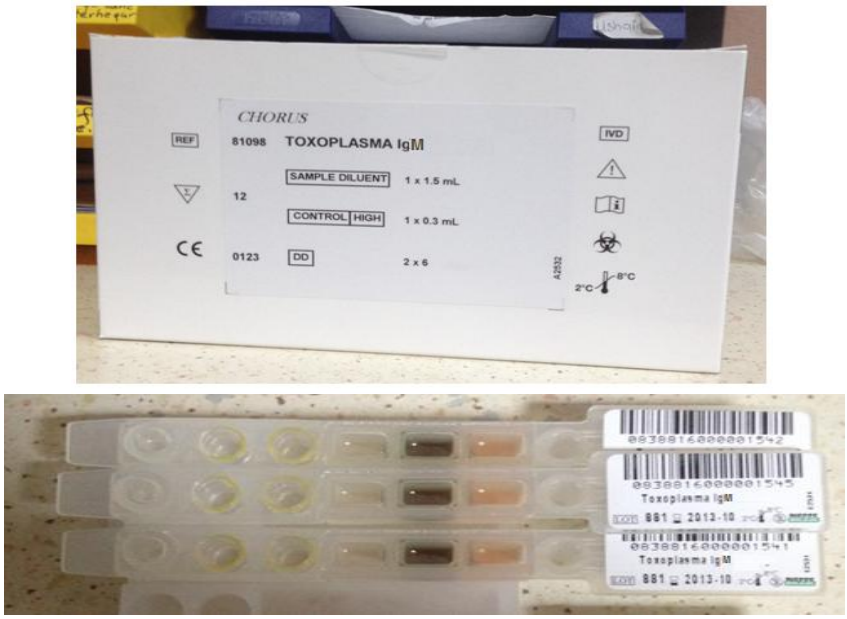


Figura 2-18: Fotografi e reagentit CHORUS Toxo IgM (foto B. Laze)

Puseta 1: Është pusetë bosh në të cilën hidhet serumi i paholluar.

Puseta 2: Përmban 0.35 ml Konjugat (antitrupa monoklonalë anti IgM të lidhur me peroksidazë në një tretësirë buferike fosfatike me fenol 0.05% dhe bronidox 0.02%)

Puseta 3: Përmban hollues për mostrat, 0.35 ml (solucion proteinik që përmban antitrupa humanë anti IgG, fenol 0.05%, bronidox 0.02% dhe një indikator që tregon praninë e serumit).

Puseta 4: Përmban substratin TMB, 0.35 ml (tetrametilbenzidinë 0.26 mg/ml dhe H_2O_2 0.01% në tretësirë buferike citrate 0.05 mol/l me pH= 3.8).

Puseta 5: Mikropusetë me mure të lirë.

Puseta 6: Në kitin TOXO M puseta 6 përfaqëson një mikropusetë me mure të veshura me antigene të purifikuar të Toxoplasmës. Në kitin CMV M puseta 6 përfaqëson një mikropusetë me mure të veshura me antigene të Citomegalovirusit, të përftuara prej kulturave të fibroblasteve humane të infektuara me këtë virus.

Puseta 7: Në kitin TOXO M puseta 7 është bosh. Në kitin CMV M puseta 7 përfaqëson një pusetë për reagentin e konfirmimit të testit. Ky reagent përmban antigene të thata të ngrira të marra prej kulturave të qelizave jo të infektuara.

Pozicioni 8: Hapësira e vendosjes së barkodit.

Kalibratori: Është një shishe me vëllim 175 µl. Përmban serum human të holluar me përqëndrim të njohur të antitrupave, proklinë dhe gentamicinë.

Kontrolli: Kemi të bëjmë me kontroll pozitiv. Është një shishe me vëllim 425 µl. Përmban serum human të holluar me përqëndrim të njohur të antitrupave, proklinë dhe gentamicinë.

Materiale të tjera të kërkuara:

- Bufer shpëlarës
- Solucion pastrues
- Solucion sanitaizing
- Ujë i distiluar
- Pajisje laboratorike: cilindra, tuba testues, etj.
- Mikropipeta për mbledhje të solucioneve në vëllime 50 – 200 µl
- Tretësirë hipoklorid natriumi (5%).

2.3.3. Normat e rezultateve për teknikën ELISA në aparatin CHORUS.

Aparati CHORUS i shpreh rezultatet si indeks (raporti ndërmjet vlerës OD të mostrës dhe vlerës së cut off), e cila mund të përdoret si matje sasiore sepse është në përjestim të drejtë me përqëndrimin e antitrupave specifikë IgM të pranishme në mostër *(DIESSE Diagnostica manual, 2011).*

- Rezultatet e përftuara me testin CHORUS ELISA Toxoplasma IgM mund të interpretohen si më poshtë:

- Pozitive – nëse indeksi është > 1.1
- Negative – nëse indeksi është < 0.9
- E dyshimtë – nëse indeksi është ndërmjet 0.9 dhe 1.1

➢ Rezultatet e përftuara me testin CHORUS ELISA Cytomegalovirus IgM mund të interpretohen si më poshtë:

- Pozitive – nëse indeksi është > 1.1
- Negative – nëse indeksi është < 0.9
- E dyshimtë – nëse indeksi është ndërmjet 0.9 dhe 1

2.4. Materiale dhe metoda në teknikën ELISA EUROIMMUN

2.4.1. Procedura në teknikën ELISA EUROIMMUN

Parimi i testit ELISA (EUROIMMUN) është i njëjtë me aparatin CHORUS, sipas parimit Sandwich. Ai bazohet në aftësinë e materialeve biologjike për t'u fiksuar në sipërfaqe plastike polistireni (faza solide).
Kur antigenet fiksohen në fazën solide dhe vendosen në kontakt me antitrupat e serumit, formohen komplekset antigen-antitrup. Antitrupat e palidhur largohen me anë të shpëlarjes e cila pasohet me shtimin e globulinave humane anti-IgM të konjuguar me peroksidazën horseradish (HRP) që lidhet me kompleksin antigen-antitrup. Konjugati i palidhur largohet me anë të shpëlarjes duke u shoqëruar me shtimin e konjugatit kromogjen tetrametilbenzen (TMB).
Nëse antitrupi specifik është i pranishëm në serum, zhvillohet ngjyrë blu. Reaksioni enzimatik ndërpritet me anë të shtimit të tretësirës H_2SO_4 1N duke e ndryshuar ngjyrën në të verdhë. Intensiteti i ngjyrës është tregues i përqëndrimit të antitrupave në serum, e cila lexohet në lexuesin Tecan.

Përpara fillimit të procedurës, të gjithë reagentët duhet të vendosen në temperaturën e dhomës, së bashku me mostrat duhet të përzihen në vortex dhe duhet të realizohet hollimi i buferit shpëlarës.

Vendosen stripet e pusetave në një mbajtëse të përshtatshme, realizohen kontrollet, kalibratorët (një kontroll negativ, një kontroll pozitiv dhe dy kalibratorë) dhe procedurat e tjera sipas protokollit përkatës *(EUROIMMUN AG manual, 2011).*

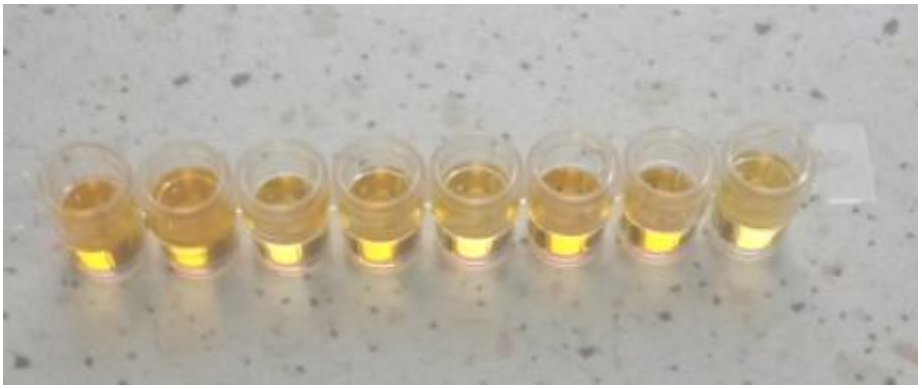


Figura 2-19: Pusetat e testit ELISA EUROIMMUN, pas zhvillimit të reaksionit që shprehet me ngjyrë të verdhë.

2.4.2. Përbërja e kiteve ELISA EUROIMMUN (Anti-CMV ELISA (IgM) EI 2570-9601 M dhe Anti-T.gondii ELISA (IgM) EI 2410-9601)

1. 96 mikropuseta që përmabjnë antigenet e *Toxoplasma gondii* të purifikuar dhe të fiksuar. Mikropusetat janë të organizuara në 8 stripe dhe ruhen në temperaturën 2-8°C.
2. Kalibratorët: Janë plasma ose serum human i defibriniluar. Kalibratori përdoret për të kontrolluar ndryshimet ditore të temperaturës dhe kushteve të tjera të testit (0.4 ml).
3. Kontrolli pozitiv: serum human ose plasma e defibriniluar e cila përdoret për të kontrolluar kufijtë pozitiv të testit (0.4 ml).
4. Kontrolli negativ: plasma ose serum human i defibriniluar i cili përdoret për të kontrolluar kufijtë negativ të testit (0.4 ml).
5. Konjugati peroksidazë horseradish (HRP) (16 ml): përmban antitrupa anti-Toxoplasma IgM, proklinë dhe gentamicinë.
6. Diluenti i serumit (2 shishe prej 45 ml secila): përmban antitrupa anti-humanë IgG që përdoren për largimin e antitrupave IgG të serumit, stabilizues proteinash dhe proklinë.
7. Bufer shpëlarës (1 shishe 50 ml): përmban TBS dhe proklinë.
8. Substrati kromogjen tetrametilbenzeni (TMB, 1 shishe 15 ml): duhet të qëndrojë i mbyllur për të mos avulluar.
9. Solucioni frenues i reaksionit enzimatik (1 shishe 15 ml): përmban tretësirë H_2SO_4 1N.
10. Materiale të tjera të kërkuara për zhvillimin e testit janë: një sistem për shpëlarjen e mikropusetave, mikropipeta (10-200µl), cilindër të shkallëzuar, letra filtri, ujë i distiluar, etj. *(EUROIMMUN AG manual, 2011)*

2.4.3. Normat e rezultateve për teknikën ELISA EUROIMMUN

Për të llogaritur rezultatet e mostrave të testuara me teknikën ELISA EUROIMMUN, veprohet si mëposhtë *(EUROIMMUN AG manual, 2011)*:
-Llogaritet vlera e mesatares së densitetit optik të kalibratorit prej dy determinantëve të kalibratorëve.

-Llogaritet një faktor korrektimi që vlerëson luhatjet ditore të testit si pasojë e ndryshimit të temperaturës dhe kohës.

-Llogaritet vlera CutOff e kalibratorit nëpërmjet prodhimit të mesatares së densitetit optik të kalibratorit dhe faktorit të korrektimit.

-Llogaritet vlera e statusit imun të mostrës (ISR) nëpërmjet raportit të vlerës së densitetit optik të mostrës dhe vlerës CutOff të kalibratorit.

Interpretimi i vlerave të përftuara realizohet si më poshtë:

Vlera e ISR-së	Rezultate
≤0.9	Negative
0.91-1.09	E dyshimtë
≥1.1	Pozitive

KREU 3. REZULTATE DHE DISKUTIME

3.1. Rezultatet e matjes së antitrupave anti-Toxoplasma IgM me teknikat ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN.

Rezultatet e matjes së antitrupave anti-Toxoplasma IgM janë paraqitur në mënyrë të përmbledhur në tabelat 3-1 dhe 3-2. Me teknikën ECL rezultatet e mostrave pozitive ishin 100 % të përputhshme me rezultatet e teknikës PCR, ndërsa nga 150 mostra negative që u testuan rezultuan 148 negative, 1 e dyshimtë dhe 1 fals pozitive. Me teknikën ELFA nga 50 mostra pozitive që u testuan rezultuan 43 pozitive, 3 të dyshimta dhe 4 fals negative, ndërsa nga 150 mostrat negative që u testuan rezultuan 146 negative, 2 të dyshimta dhe 2 fals pozitive. Me teknikën ELISA (CHORUS) nga 50 mostrat pozitive që u testuan rezultuan 35 pozitive, 10 të dyshimta dhe 5 fals negative, ndërsa nga 150 mostrat negative që u testuan rezultuan 144 negative, 2 të dyshimta dhe 4 fals pozitive. Me teknikën ELISA EUROIMMUN nga 50 mostrat pozitive që u testuan rezultuan 46 pozitive, 2 të dyshimta dhe 2 fals negative, ndërsa nga 150 mostrat negative që u testuan rezultuan 100 % të përputhshme me rezultatet e teknikës PCR. Duke u bazuar në këto rezultate, vihet re se 179 mostra (89.5 %) patën rezultate të përputhshme me të katër teknikat.

Tabela 3-1: Rezultatet e përmbledhura të teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.

Toxoplasma IgM	PCR	ECL	ELFA	ELISA (CHORUS)	ELISA EUROIMMUN
Pozitive	50	51	45	39	46
Negative		148	150	149	152
E dyshimtë		1	5	12	2

Tabela 3-2: Rezultatet e mostrave pozitive dhe negative për antitrupat anti-Toxoplasma IgM me teknikat ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN.

Nr. i mostrave	COBAS 6000 (ECL) TOXO M		
	Pozitive	**Të dyshimta**	**Negative**
(Pozitive) N=50	**50**	**0**	**0**
(Negative) N=150	**1**	**1**	**148**
	MINI-VIDAS (ELFA) TOXO M		
(Pozitive) N=50	**43**	**3**	**4**
(Negative) N=150	**2**	**2**	**146**
	CHORUS (ELISA) TOXO M		
(Pozitive) N=50	**35**	**10**	**5**
(Negative) N=150	**4**	**2**	**144**
	ELISA EUROIMMUN TOXO M		
(Pozitive) N=50	**46**	**2**	**2**
(Negative) N=150	**0**	**0**	**150**

Tabela 3-3: Rezultatet e ndjeshmërisë dhe specificitetit të teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN, për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.

Toxoplasma IgM	Ndjeshmëria (%)	Specificiteti (%)
ECL (COBAS 6000)	100	99.3
ELFA (MINI-VIDAS)	91.5	98.6
ELISA (CHORUS)	87.5	97.3
ELISA (EUROIMMUN)	95.8	100

Të dhënat e tabelës 3-2 janë përdorur për të llogaritur ndjeshmërinë dhe specificitetin për secilën teknikë (tab 3-3). Në këtë tabelë vihet re se teknika ECL karakterizohet nga ndjeshmëria më e lartë 100 %, ndërsa teknika ELISA (EUROIMMUN) karakterizohet nga specificiteti maksimal 100 %. Gjithashtu vihet re se teknika ELISA (CHORUS) karakterizohet nga vlerat më të ulta të ndjeshmërisë dhe specificitetit, respektivisht 87.5 % dhe 97.3 %.

Tabela 3-4: Rezultatet e analizës së variancës njëdrejtimëshe të teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN, për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.

ANOVA NJËDREJTIMËSHE					
Burimi i Variacionit	Shuma kuadratike	Shkallët e lirisë [df]	Mesatarja kuadratike	Vlera e Fisherit [F]	Sinjifikanca [p]
Midis grupeve	2.517	3	.839	1.422	.235
Brenda grupeve	469.599	796	.590		
Totali	472.117	799			

Në tabelën 3-4 është paraqitur analiza e variancës njëdrejtimëshe për rezultatet e teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN, për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM. Vlera e Fisherit është $F_{0.05[3,796]} = 1.422$ ($p = 0.235$). Meqënëse $p > 0.05$, ndryshimi ndërmjet mesatareve të rezultateve të përftuara nga teknikat e mësipërme nuk është sinjifikant, varianca midis grupeve dhe brenda grupeve vlerësojnë të njëjtën variancë parametrike. Kjo do të thotë që pranohet hipoteza Ho. Pra teknikat e mësipërme nuk paraqesin ndryshime sinjifikative për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.

Tabela 3-5: Rezultatet e korrelacionit ndërmjet teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM

Toxoplasma IgM	Koefiçienti i korrelacionit Pearson	Sinjifikanca [p]
ECL-ELFA	0.882	0
ECL-ELISA (CHORUS)	0.839	0
ECL-ELISA (EUROIMMUN)	0.896	0
ELFA-ELISA (CHORUS)	0.839	0
ELFA-ELISA (EUROIMMUN	0.822	0
ELISA (CHORUS) -ELISA (EUROIMMUN)	0.882	0

Në tabelën 3-5 janë paraqitur rezultatet e korrelacionit (α=0.01) ndërmjet teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM. Vlera e koefiçientit të korrelacionit të produktit të momentit për teknikat ECL dhe ELFA është $r_{ECL\text{-}ELFA}$ =0.882, p = 0 (p< 0.01). Kjo do të thotë që korrelacioni është sinjifikant dhe teknikat ECL dhe ELFA karakterizohen nga një shoqërim i kënaqshëm me njëra-tjetrën por me disa shmangie, që shprehen në skategramën përkatëse (figura 3-1).

Vlera e koefiçientit të korrelacionit të produktit të momentit për teknikat ECL dhe ELISA (CHORUS) është $r_{ECL\text{-}ELISA\ (CHORUS)}$ =0.839, p = 0 (p< 0.01). Kjo do të thotë që korrelacioni është sinjifikant dhe teknikat ECL dhe ELISA (CHORUS) karakterizohen nga një shoqërim i kënaqshëm me njëra-tjetrën me disa shmangie, që shprehen në skategramën përkatëse (figura 3-2).

Vlera e koefiçientit të korrelacionit të produktit të momentit për teknikat ECL dhe ELISA (EUROIMMUN) është $r_{ECL\text{-}ELISA}$ =0.896, p = 0 (p< 0.01). Kjo do të thotë që korrelacioni është sinjifikant dhe teknikat ECL dhe ELISA (EUROIMMUN) karakterizohen nga një shoqërim mjaft i kënaqshëm me njëra-tjetrën me pak shmangie, që shprehen në skategramën përkatëse (figura 3-3).

Vlera e koefiçientit të korrelacionit të produktit të momentit për teknikat ELFA dhe ELISA (CHORUS) është $r_{ELFA\text{-}ELISA\ (CHORUS)}$ =0.839, p = 0 (p< 0.01). Kjo do të thotë që korrelacioni është sinjifikant dhe teknikat ELFA dhe ELISA (CHORUS) karakterizohen nga një shoqërim pak i kënaqshëm me njëra-tjetrën me disa shmangie, që shprehen në skategramën përkatëse (figura 3-4).

Vlera e koefiçientit të korrelacionit të produktit të momentit për teknikat ELFA dhe ELISA (EUROIMMUN) është $r_{ELFA\text{-}ELISA\ (EUROIMMUN)}$ =0.822, p = 0 (p< 0.01). Kjo do të thotë që korrelacioni është sinjifikant dhe teknikat ECL dhe ELISA (EUROIMMUN) karakterizohen nga një shoqërim i mjaftueshëm, por pak i kënaqshëm me njëra-tjetrën me disa shmangie, që shprehen në skategramën përkatëse (figura 3-5).

Vlera e koefiçientit të korrelacionit të produktit të momentit për teknikat ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) është $r_{ELISA\ (c)\text{-}ELISA(e)}$ =0.882, p = 0 (p< 0.01). Kjo do të thotë që teknikat ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) karakterizohen nga një shoqërim i kënaqshëm me njëra-tjetrën me disa shmangie, që shprehen në skategramën përkatëse (figura 3-6).

Tabela 3-6: Rezultatet e analizës së variancës njëdrejtimëshe të teknikave ECL dhe ELFA për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.

ANOVA NJËDREJTIMËSHE (ECL DHE ELFA)					
Burimi i Variacionit	Shuma kuadratike	Shkallët e lirisë [df]	Mesatarja kuadratike	Vlera e Fisherit [F]	Sinjifikanca [p]
Midis grupeve	2.344	1	2.344	2.622	.106
Brenda grupeve	355.824	398	.894		
Totali	358.168	399			

Në tabelën 3-6 është paraqitur analiza e variancës njëdrejtimëshe për rezultatet e teknikave ECL dhe ELFA, për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM. Vlera e Fisherit është $F_{0.05[1,398]}$ = 2.622 (p = 0.106). Meqënëse p > 0.05, ndryshimi ndërmjet mesatareve të rezultateve të përftuara nga teknikat ECL dhe ELFA nuk është sinjifikant, varianca midis grupeve dhe brenda grupeve vlerësojnë të njëjtën variancë parametrike.

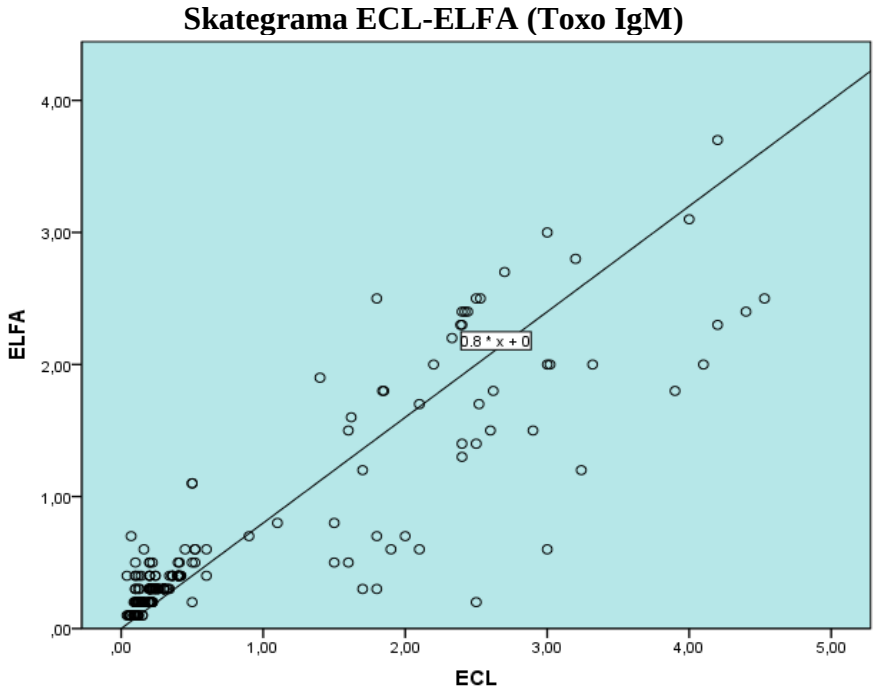


Figura 3-1: Skategrama e teknikave ECL dhe ELFA për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.

Në figurën 3-1 paraqitet skategrama e teknikave ECL dhe ELFA për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM. Vija lineare karakterizohet me ekuacionin y=0.8*x, ndërsa skategrama është lineare, pozitive, me korrelacion jo shumë të fortë (r=0.882) për shkak të disa vlerave, që i shmangen drejtimit linear të skategramës.

Tabela 3-7: Rezultatet e analizës së variancës njëdrejtimëshe të teknikave ECL dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.

ANOVA NJËDREJTIMËSHE (ECL DHE ELISA CHORUS)					
Burimi i Variacionit	Shuma kuadratike	Shkallët e lirisë [df]	Mesatarja kuadratike	Vlera e Fisherit [F]	Sinjifikanca [p]
Midis grupeve	.484	1	.484	.665	.415
Brenda grupeve	289.862	398	.728		
Totali	290.346	399			

Në tabelën 3-7 është paraqitur analiza e variancës njëdrejtimëshe (α=0.05) për rezultatet e teknikave ECL dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM. Vlera e Fisherit është $F_{0.05[1,398]} = 0.665$ ($p = 0.415$). Meqënëse $p > 0.05$, ndryshimi ndërmjet mesatareve të rezultateve të përftuara nga teknikat ECL dhe ELISA (CHORUS) nuk është sinjifikant, varianca midis grupeve dhe brenda grupeve vlerësojnë të njëjtën variancë parametrike.

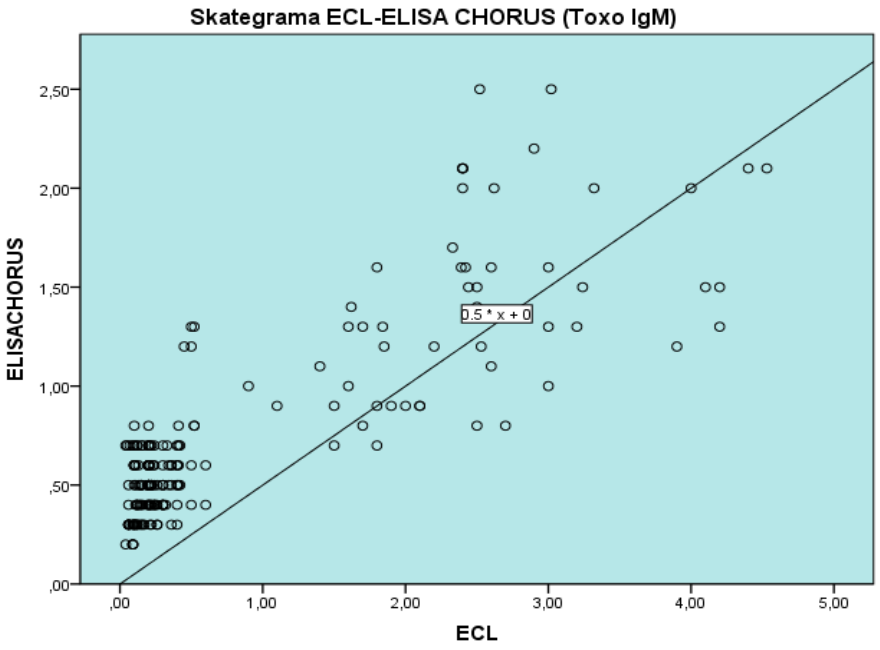


Figura 3-2: Skategrama e teknikave ECL dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.

Në figurën 3-2 paraqitet skategrama e teknikave ECL dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM. Vija lineare karakterizohet me ekuacionin y=0.5*x, ndërsa skategrama është lineare, pozitive, me korrelacion jo shumë të fortë (r=0.839) për shkak të disa vlerave, që i shmangen drejtimit linear të skategramës.

Tabela 3-8: Rezultatet e analizës së variancës njëdrejtimëshe të teknikave ECL dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.

ANOVA NJËDREJTIMËSHE (ECL DHE ELISA EUROIMMUN)					
Burimi i Variacionit	Shuma kuadratike	Shkallët e lirisë [df]	Mesatarja kuadratike	Vlera e Fisherit [F]	Sinjifikanca [p]
Midis grupeve	1.158	1	1.158	1.508	.220
Brenda grupeve	305.530	398	.768		
Totali	306.687	399			

Në tabelën 3-8 është paraqitur analiza e variancës njëdrejtimëshe (α=0.05) për rezultatet e teknikave ECL dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM. Vlera e Fisherit është $F_{0.05[1,398]} = 1.508$ ($p = 0.220$). Meqënëse $p > 0.05$, ndryshimi ndërmjet mesatareve të rezultateve të përftuara nga teknikat ECL dhe ELISA (EUROIMMUN) nuk është sinjifikant, varianca midis grupeve dhe brenda grupeve vlerësojnë të njëjtën variancë parametrike.

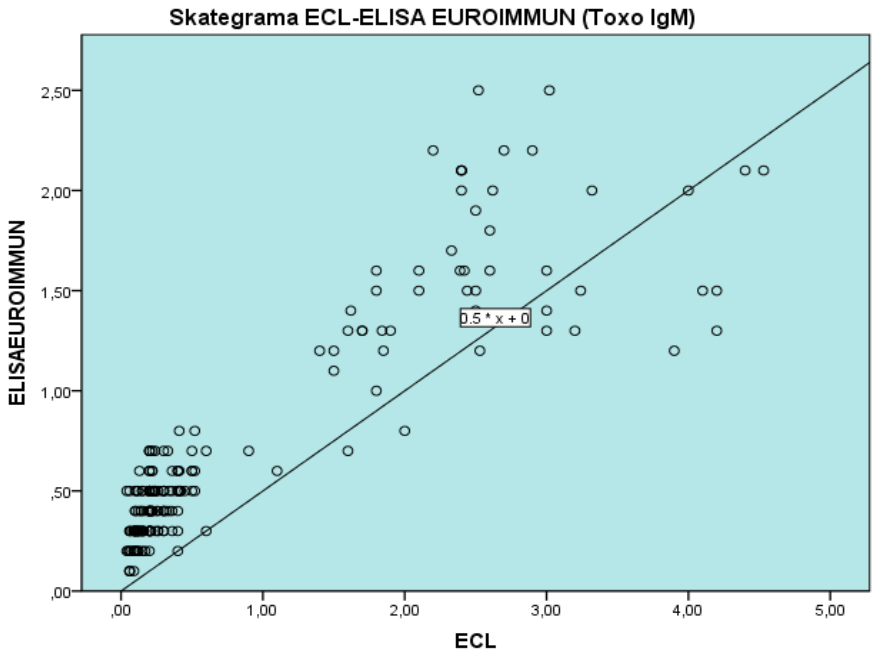


Figura 3-3: Skategrama e teknikave ECL dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.

Në figurën 3-3 paraqitet skategrama e teknikave ECL dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM. Vija lineare karakterizohet me

ekuacionin y=0.5*x, ndërsa skategrama është jolineare, pozitive, me korrelacion jo shumë të fortë (r=0.896) për shkak të disa vlerave, që i shmangen drejtimit të skategramës.

Tabela 3-9: Rezultatet e analizës së variancës njëdrejtimëshe të teknikave ELFA dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.

ANOVA NJËDREJTIMËSHE (ELFA DHE ELISA CHORUS)					
Burimi i Variacionit	Shuma kuadratike	Shkallët e lirisë [df]	Mesatarja kuadratike	Vlera e Fisherit [F]	Sinjifikanca [p]
Midis grupeve	.697	1	.697	1.691	.194
Brenda grupeve	164.070	398	.412		
Totali	164.767	399			

Në tabelën 3-9 është paraqitur analiza e variancës njëdrejtimëshe (α=0.05) për rezultatet e teknikave ELFA dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM. Vlera e Fisherit është $F_{0.05[1,398]}$ = 1.691 (p = 0.194). Meqënëse p > 0.05, ndryshimi ndërmjet mesatareve të rezultateve të përftuara nga teknikat ELFA dhe ELISA (CHORUS) nuk është sinjifikant dhe varianca midis grupeve dhe brenda grupeve vlerësojnë të njëjtën variancë parametrike.

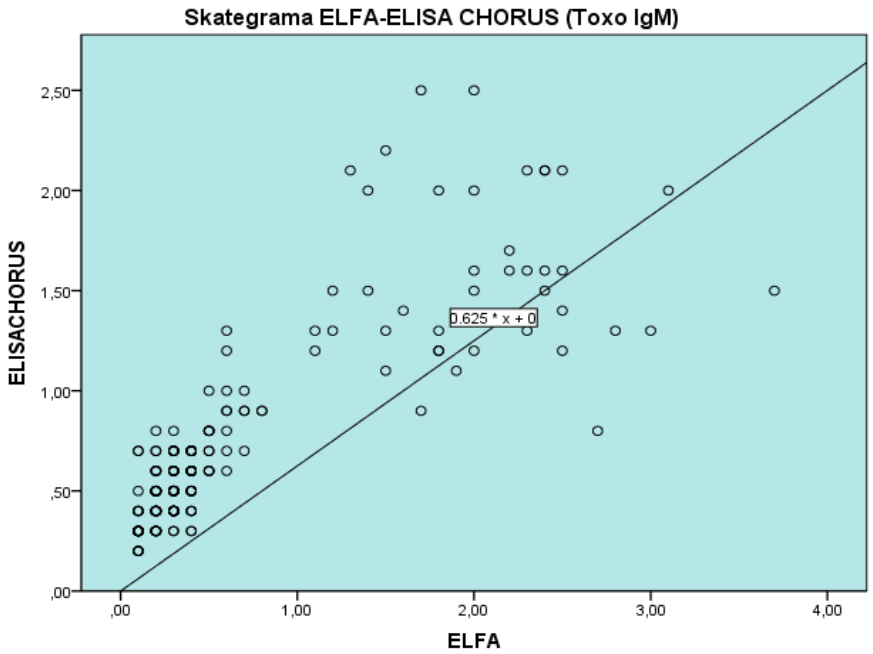


Figura 3-4: Skategrama e teknikave ELFA dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.

Në figurën 3-4 paraqitet skategrama e teknikave ELFA dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM. Vija lineare karakterizohet me ekuacionin

y=0.625*x, ndërsa skategrama është jolineare, pozitive, me korrelacion jo shumë të fortë (r=0.839) për shkak të disa vlerave, që i shmangen drejtimit të skategramës.

Tabela 3-10: Rezultatet e analizës së variancës njëdrejtimëshe të teknikave ELFA dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.

ANOVA NJËDREJTIMËSHE (ELFA DHE ELISA EUROIMMUN)					
Burimi i Variacionit	Shuma kuadratike	Shkallët e lirisë [df]	Mesatarja kuadratike	Vlera e Fisherit [F]	Sinjifikanca [p]
Midis grupeve	.207	1	.207	.458	.499
Brenda grupeve	179.737	398	.452		
Totali	179.944	399			

Në tabelën 3-10 është paraqitur analiza e variancës njëdrejtimëshe (α=0.05) për rezultatet e teknikave ELFA dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM. Vlera e Fisherit është $F_{0.05[1,398]} = 0.458$ ($p = 0.499$). Meqënëse $p > 0.05$, ndryshimi ndërmjet mesatareve të rezultateve të përftuara nga teknikat ELFA dhe ELISA (EUROIMMUN) nuk është sinjifikant, varianca midis grupeve dhe brenda grupeve vlerësojnë të njëjtën variancë parametrike.

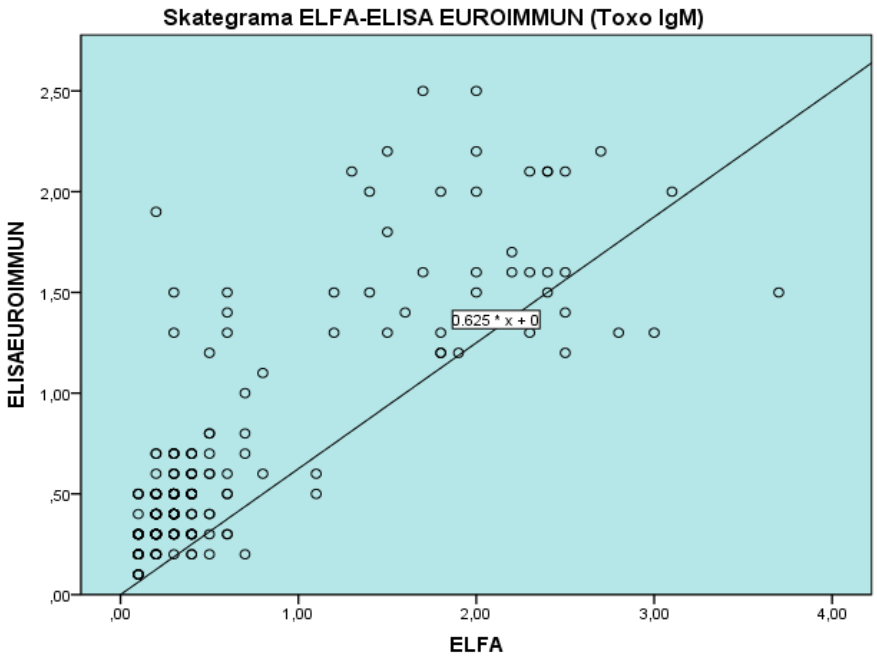


Figura 3-5: Skategrama e teknikave ELFA dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.

Në figurën 3-5 paraqitet skategrama e teknikave ELFA dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM. Vija lineare karakterizohet me ekuacionin

y=0.625*x, ndërsa skategrama është jolineare, pozitive, me korrelacion jo të fortë (r=0.822) për shkak të mjaft vlerave, që i shmangen drejtimit të skategramës.

Tabela 3-11: Rezultatet e analizës së variancës njëdrejtimëshe të teknikave ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.

ANOVA NJËDREJTIMËSHE (ELISA CHORUS DHE ELISA EUROIMMUN)					
Burimi i Variacionit	Shuma kuadratike	Shkallët e lirisë [df]	Mesatarja kuadratike	Vlera e Fisherit [F]	Sinjifikanca [p]
Midis grupeve	.144	1	.144	.505	.478
Brenda grupeve	113.776	398	.286		
Totali	113.920	399			

Në tabelën 3-11 është paraqitur analiza e variancës njëdrejtimëshe (α=0.05) për rezultatet e teknikave ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM. Vlera e Fisherit është $F_{0.05[1,398]}$ = 0.505 (p = 0.478). Meqënëse p > 0.05, ndryshimi ndërmjet mesatareve të rezultateve të përftuara nga teknikat ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) nuk është sinjifikant dhe varianca midis grupeve dhe brenda grupeve vlerësojnë të njëjtën variancë parametrike.

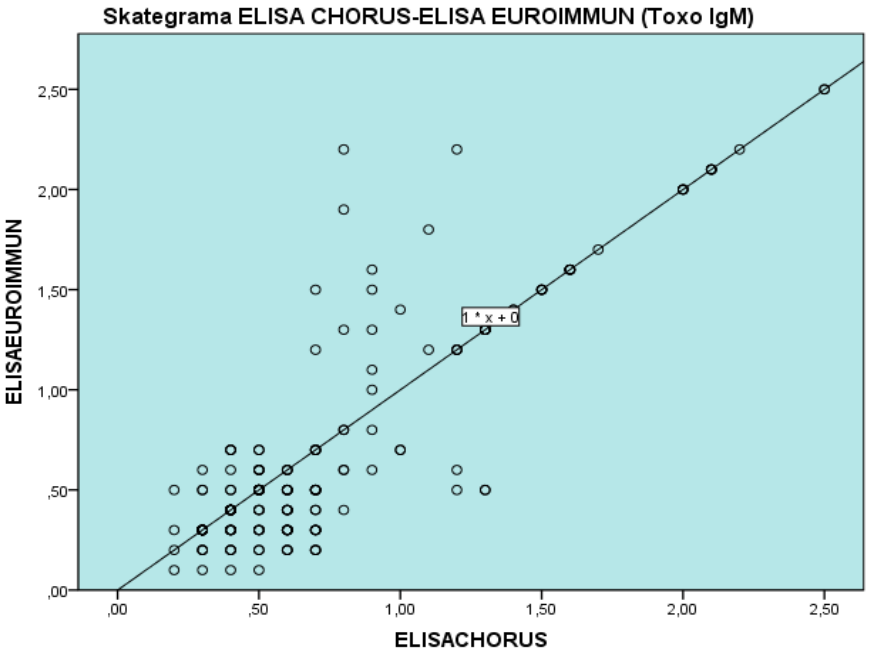


Figura 3-6: Skategrama e teknikave ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.

Në figurën 3-6 paraqitet skategrama e teknikave ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM. Vija lineare karakterizohet me ekuacionin y=1*x, ndërsa skategrama është lineare, pozitive, me

korrelacion jo shumë të fortë (r=0.882) për shkak të disa vlerave, që i shmangen drejtimit linear të skategramës.

3.2. Rezultatet e matjes së antitrupave anti- Citomegalovirus IgM me teknikat ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN.

Rezultatet e matjes së antitrupave anti-Toxoplasma IgM janë paraqitur në mënyrë të përmbledhur në tabelat 3-12 dhe 3-13. Me teknikën ECL nga 50 mostra pozitive që u testuan rezultuan 49 pozitive dhe 1 fals negative ndërsa nga 150 mostra negative që u testuan rezultuan 148 negative 2 fals pozitive. Me teknikën ELFA nga 50 mostra pozitive që u testuan rezultuan 42 pozitive, 3 të dyshimta dhe 5 fals negative, ndërsa nga 150 mostrat negative që u testuan rezultuan 144 negative, 3 të dyshimta dhe 3 fals pozitive. Me teknikën ELISA (CHORUS) nga 50 mostra pozitive që u testuan rezultuan 49 pozitive, 5 të dyshimta dhe 6 fals negative, ndërsa nga 150 mostrat negative që u testuan rezultuan 140 negative, 5 të dyshimta dhe 5 fals pozitive. Me teknikën ELISA (EUROIMMUN) nga 50 mostra pozitive që u testuan rezultuan 46 pozitive, 1 e dyshimtë dhe 3 fals negative, ndërsa nga 150 mostrat negative që u testuan rezultuan 149 negative 1 fals pozitive. Duke u bazuar në këto rezultate, vihet re se 179 mostra (89.5 %) patën rezultate të përputhshme me të katër teknikat.

Tabela 3-12: Rezultatet e përmbledhura të teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.

Toxoplasma IgM	PCR	ECL	ELFA	ELISA (CHORUS)	ELISA EUROIMMUN
Pozitive	50	51	45	44	47
Negative		149	149	146	152
E dyshimtë			6	10	1

Tabela 3-13: Rezultatet e mostrave pozitive dhe negative për antitrupat anti-Citomegalovirus me teknikat ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN.

Nr. i mostrave	ECL (COBAS 6000) CMV M		
	Pozitive	**Të dyshimta**	**Negative**
(Pozitive) N=50	**49**	**0**	**1**
(Negative) N=150	**2**	**0**	**148**
	MINI-VIDAS (ELFA) CMV M		
(Pozitive) N=50	**42**	**3**	**5**
(Negative) N=150	**3**	**3**	**144**
	ELISA (CHORUS) CMV M		
(Pozitive) N=50	**39**	**5**	**6**
(Negative) N=150	**5**	**5**	**140**
	ELISA EUROIMMUN CMV M		
(Pozitive) N=50	**46**	**1**	**3**
(Negative) N=150	**1**	**0**	**149**

Tabela 3-14: Rezultatet e ndjeshmërisë dhe specificitetit të teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN, për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.

Citomegalovirus IgM	Ndjeshmëria (%)	Specificiteti (%)
ECL (COBAS 6000)	98	98.7
ELFA (MINI-VIDAS)	89.4	98
ELISA (CHORUS)	86.7	96.6
ELISA (EUROIMMUN)	93.9	99.3

Të dhënat e tabelës 3-13 janë përdorur për të llogaritur ndjeshmërinë dhe specificitetin për secilën teknikë (tab 3-14). Në këtë tabelë vihet re se teknika ECL karakterizohet nga ndjeshmëria më e lartë 98 %, ndërsa teknika ELISA (EUROIMMUN) karakterizohet nga specificiteti maksimal 99.3 %. Gjithashtu vihet re se teknika ELISA (CHORUS) karakterizohet nga vlerat më të ulta të ndjeshmërisë dhe specificitetit, respektivisht 86.7 % dhe 96.6 %.

Tabela 3-15: Rezultatet e analizës së variancës njëdrejtimëshe të teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.

ANOVA NJËDREJTIMËSHE					
Burimi i Variacionit	Shuma kuadratike	Shkallët e lirisë [df]	Mesatarja kuadratike	Vlera e Fisherit [F]	Sinjifikanca [p]
Midis grupeve	.688	3	.229	.454	.715
Brenda grupeve	402.256	796	.505		
Totali	402.944	799			

Në tabelën 3-15 është paraqitur analiza e variancës njëdrejtimëshe (α=0.05) për rezultatet e teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM. Vlera e Fisherit është $F_{0.05[3,796]}$ = 0.454 (p = 0.715). Meqënëse p > 0.05, ndryshimi ndërmjet mesatareve të rezultateve të përftuara nga teknikat e mësipërme nuk është sinjifikant dhe varianca midis grupeve dhe brenda grupeve vlerësojnë të njëjtën variancë parametrike. Pra, teknikat ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA EUROIMMUN nuk paraqesin ndryshime sinjifikative për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.

Tabela 3-16: Rezultatet e korrelacionit ndërmjet teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.

Citomegalovirus IgM	Koefiçienti i korrelacionit	Sinjifikanca [p]
ECL-ELFA	0.942	0
ECL-ELISA (CHORUS)	0.863	0
ECL-ELISA (EUROIMMUN)	0.873	0
ELFA-ELISA (CHORUS)	0.891	0
ELFA-ELISA (EUROIMMUN	0.809	0
ELISA (CHORUS) -ELISA (EUROIMMUN)	0.792	0

Në tabelën 3-16 janë paraqitur rezultatet e korrelacionit (α=0.01) të teknikave ECL, ELFA ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.
Vlera e koefiçientit të korrelacionit të produktit të momentit për teknikat ECL dhe ELFA është $r_{ECL\text{-}ELFA}$ =0.942, p = 0 (p< 0.01). Kjo do të thotë që teknikat ECL dhe ELFA karakterizohen nga një shoqërim mjaft i kënaqshëm me njëra-tjetrën me pak shmangie, që shprehen në skategramën përkatëse (figura 3-7).

Vlera e koefiçientit të korrelacionit të produktit të momentit për teknikat ECL dhe ELISA (CHORUS) është $r_{ECL\text{-}ELISA(CHORUS)}$ =0.863, p = 0 (p< 0.01). Kjo do të thotë që teknikat ECL dhe ELISA (CHORUS) karakterizohen nga një shoqërim i kënaqshëm me njëra-tjetrën me pak shmangie, që shprehen në skategramën përkatëse (figura 3-8).

Vlera e koefiçientit të korrelacionit të produktit të momentit për teknikat ECL dhe ELISA (EUROIMMUN) është $r_{ECL\text{-}ELISA\ (EUROIMMUN)}$ =0.873, p = 0 (p< 0.01). Kjo do të thotë që teknikat ECL dhe ELISA (EUROIMMUN) karakterizohen nga një shoqërim mjaft i kënaqshëm me njëra-tjetrën me pak shmangie, që shprehen në skategramën përkatëse (figura 3-9).

Vlera e koefiçientit të korrelacionit të produktit të momentit për teknikat ELFA dhe ELISA (CHORUS) është $r_{ELFA\text{-}ELISA(CHORUS)}$ =0.891, p = 0 (p< 0.01). Kjo do të thotë që teknikat ELFA dhe ELISA (CHORUS) karakterizohen nga një shoqërim mjaft i kënaqshëm me njëra-tjetrën me pak shmangie, që shprehen në skategramën përkatëse (figura 3-10).

Vlera e koefiçientit të korrelacionit të produktit të momentit për teknikat ELFA dhe ELISA (EUROIMMUN) është $r_{ELFA\text{-}ELISA\ (EUROIMMUN)}$ =0.809, p = 0 (p< 0.01). Kjo do të thotë që teknikat ELFA dhe ELISA (EUROIMMUN) karakterizohen nga një shoqërim i kënaqshëm me njëra-tjetrën me shmangie, që shprehen në skategramën përkatëse (figura 3-11).

Vlera e koefiçientit të korrelacionit të produktit të momentit për teknikat ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) është $r_{ELISA(CHORUS)\text{-}ELISA(EUROIMMUN)}$

=0.792, p = 0 (p< 0.01). Kjo do të thotë që teknikat ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) karakterizohen nga një shoqërim pak i kënaqshëm me njëra-tjetrën me shmangie, që shprehen në skategramën përkatëse (figura 3-12).

Tabela 3-17: Rezultatet e analizës së variancës njëdrejtimëshe të teknikave ECL dhe ELFA për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.

ANOVA NJËDREJTIMËSHE (ECL DHE ELFA)					
Burimi i Variacionit	Shuma kuadratike	Shkallët e lirisë [df]	Mesatarja kuadratike	Vlera e Fisherit [F]	Sinjifikanca [p]
Midis grupeve	.079	1	.079	.111	.740
Brenda grupeve	284.846	398	.716		
Totali	284.925	399			

Në tabelën 3-17 është paraqitur analiza e variancës njëdrejtimëshe (α=0.05) për rezultatet e teknikave ECL dhe ELFA për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM. Vlera e Fisherit është $F_{0.05[1,398]}$ = 0.111 (p = 0.740). Meqënëse p > 0.05, ndryshimi ndërmjet mesatareve të rezultateve të përftuara nga teknikat e mësipërme nuk është sinjifikant, varianca midis grupeve dhe brenda grupeve vlerësojnë të njëjtën variancë parametrike.

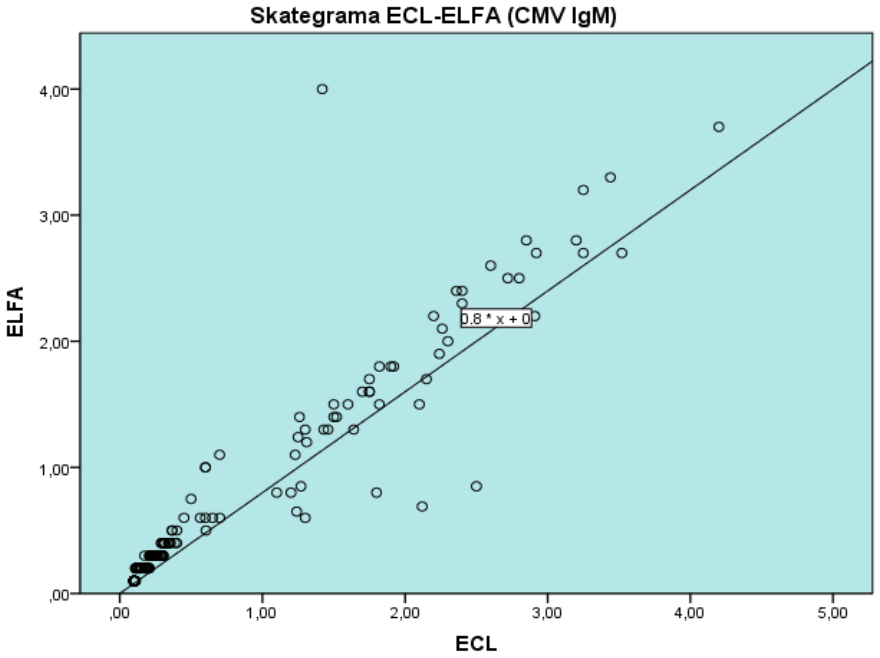


Figura 3-7: Skategrama e teknikave ECL dhe ELFA për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.

Në figurën 3-7 paraqitet skategrama e teknikave ECL dhe ELFA për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM. Vija lineare karakterizohet me ekuacionin y=0.8*x, ndërsa skategrama është jolineare, pozitive, me koefiçient korrelacioni të lartë (r=0.942) por ka disa vlera, që i shmangen shumë drejtimit të skategramës, duke ndikuar në shoqërimin e këtyre teknikave.

Tabela 3-18: Rezultatet e analizës së variancës njëdrejtimëshe të teknikave ECL dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.

ANOVA NJËDREJTIMËSHE (ECL DHE ELISA CHORUS)					
Burimi i Variacionit	Shuma kuadratike	Shkallët e lirisë [df]	Mesatarja kuadratike	Vlera e Fisherit [F]	Sinjifikanca [p]
Midis grupeve	.088	1	.088	.168	.682
Brenda grupeve	208.595	398	.524		
Totali	208.683	399			

Në tabelën 3-18 është paraqitur analiza e variancës njëdrejtimëshe (α=0.05) për rezultatet e teknikave ECL dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM. Vlera e Fisherit është $F_{0.05[1,398]} = 0.168$ ($p = 0.682$). Meqënëse $p > 0.05$, ndryshimi ndërmjet mesatareve të rezultateve të përftuara nga teknikat e mësipërme nuk është sinjifikant, varianca midis grupeve dhe brenda grupeve vlerësojnë të njëjtën variancë parametrike.

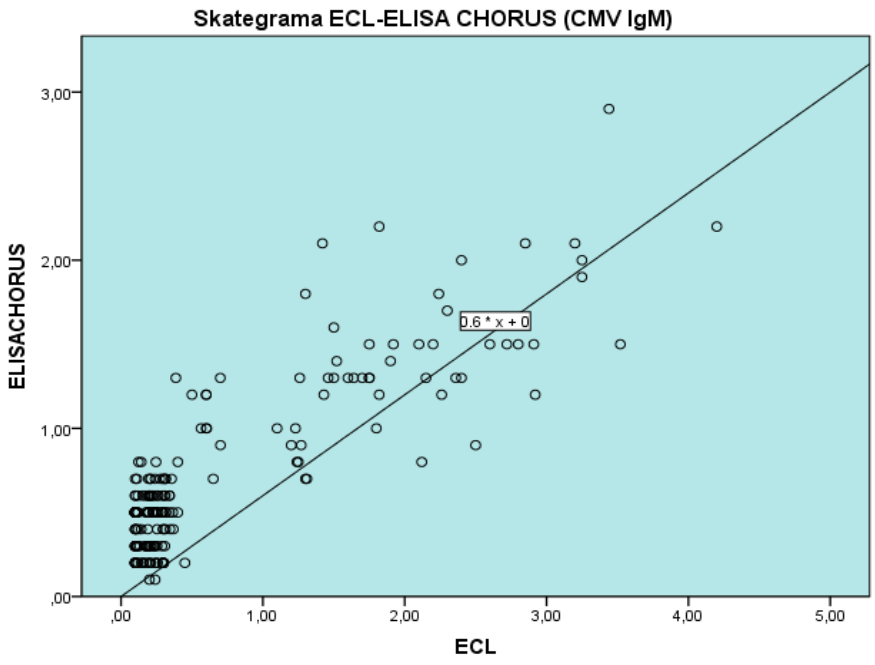


Figura 3-8: Skategrama e teknikave ECL dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.

Në figurën 3-8 paraqitet skategrama e teknikave ECL dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM. Vija lineare karakterizohet me ekuacionin y=0.6*x, ndërsa skategrama është jolineare, pozitive, me korrelacion jo shumë të fortë (r=0.863) për shkak të disa vlerave, që i shmangen drejtimit të skategramës.

Tabela 3-19: Rezultatet e analizës së variancës njëdrejtimëshe të teknikave ECL dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.

ANOVA NJËDREJTIMËSHE (ECL DHE ELISA EUROIMMUN)					
Burimi i Variacionit	Shuma kuadratike	Shkallët e lirisë [df]	Mesatarja kuadratike	Vlera e Fisherit [F]	Sinjifikanca [p]
Midis grupeve	.241	1	.241	.432	.512
Brenda grupeve	222.001	398	.558		
Totali	222.241	399			

Në tabelën 3-19 është paraqitur analiza e variancës njëdrejtimëshe (α=0.05) për rezultatet e teknikave ECL dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM. Vlera e Fisherit është $F_{0.05[1,398]}$ = 0.432 (p = 0.512). Meqënëse p > 0.05, ndryshimi ndërmjet mesatareve të rezultateve të përftuara nga teknikat e mësipërme nuk është sinjifikant, varianca midis grupeve dhe brenda grupeve vlerësojnë të njëjtën variancë parametrike.

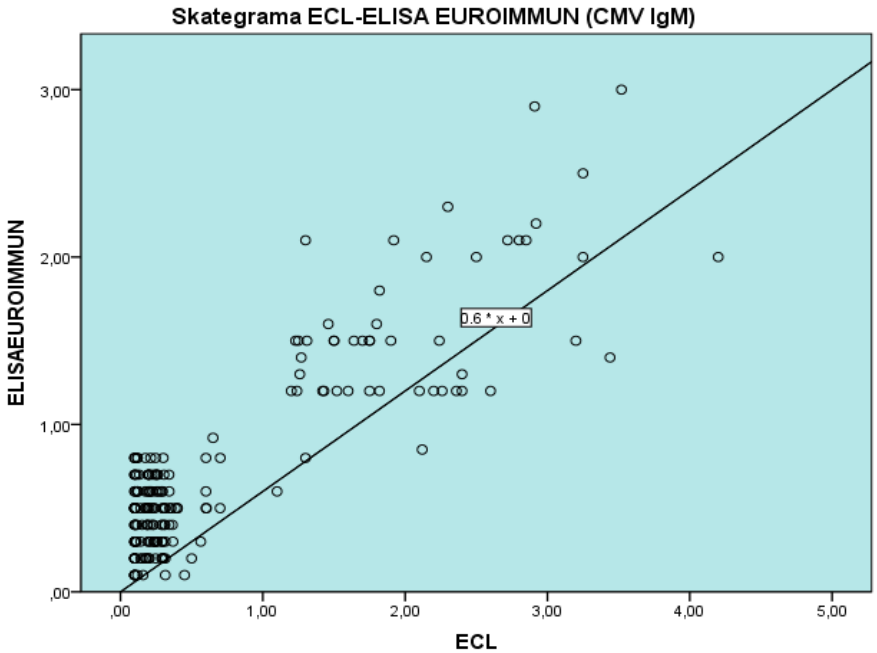


Figura 3-9: Skategrama e teknikave ECL dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.

Në figurën 3-9 paraqitet skategrama e teknikave ECL dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM. Vija lineare karakterizohet me ekuacionin y=0.6*x, ndërsa skategrama është jolineare, pozitive, me korrelacion jo shumë të fortë (r=0.873) për shkak të disa vlerave, që i shmangen drejtimit të skategramës.

Tabela 3-20: Rezultatet e analizës së variancës njëdrejtimëshe të teknikave ELFA dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.

ANOVA NJËDREJTIMËSHE (ELFA DHE ELISA CHORUS)					
Burimi i Variacionit	Shuma kuadratike	Shkallët e lirisë [df]	Mesatarja kuadratike	Vlera e Fisherit [F]	Sinjifikanca [p]
Midis grupeve	.335	1	.335	.739	.391
Brenda grupeve	180.255	398	.453		
Totali	180.590	399			

Në tabelën 3-20 është paraqitur analiza e variancës njëdrejtimëshe (α=0.05) për rezultatet e teknikave ELFA dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM. Vlera e Fisherit është $F_{0.05[1,398]} = 0.739$ ($p = 0.391$). Meqënëse $p > 0.05$, ndryshimi ndërmjet mesatareve të rezultateve të përftuara nga teknikat e mësipërme nuk është sinjifikant, varianca midis grupeve dhe brenda grupeve vlerësojnë të njëjtën variancë parametrike.

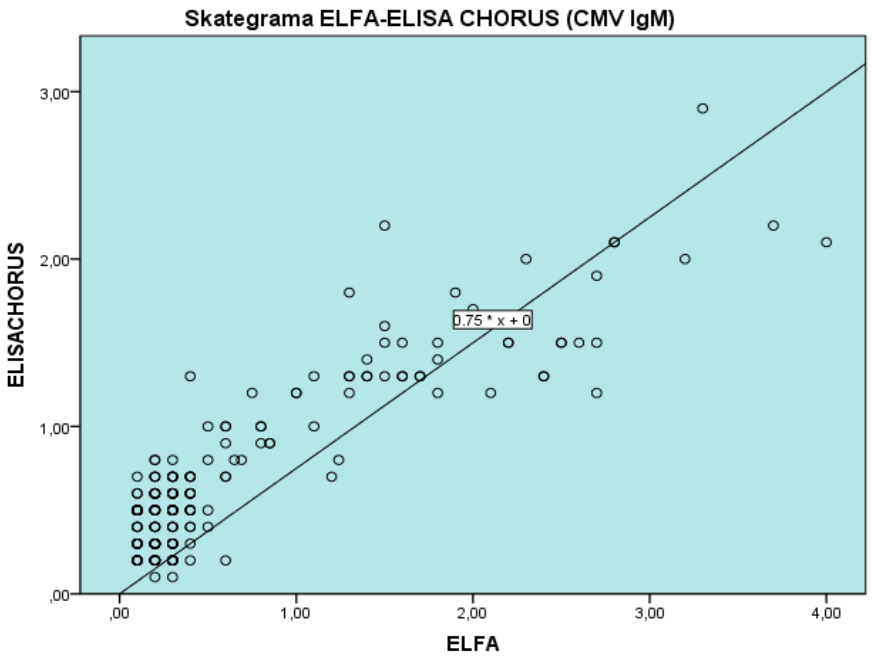


Figura 3-10: Skategrama e teknikave ELFA dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.

Në figurën 3-10 paraqitet skategrama e teknikave ELFA dhe ELISA (CHORUS) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM. Vija lineare karakterizohet me ekuacionin y=0.75*x, ndërsa skategrama është jolineare, pozitive, me korrelacion jo shumë të fortë (r=0.891) për shkak të disa vlerave, që i shmangen drejtimit linear të skategramës.

Tabela 3-21: Rezultatet e analizës së variancës njëdrejtimëshe të teknikave ELFA dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.

ANOVA NJËDREJTIMËSHE (ELFA DHE ELISA EUROIMMUN)					
Burimi i Variacionit	Shuma kuadratike	Shkallët e lirisë [df]	Mesatarja kuadratike	Vlera e Fisherit [F]	Sinjifikanca [p]
Midis grupeve	.596	1	.596	1.225	.269
Brenda grupeve	193.661	398	.487		
Totali	194.257	399			

Në tabelën 3-21 është paraqitur analiza e variancës njëdrejtimëshe (α=0.05) për rezultatet e teknikave ELFA dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM. Vlera e Fisherit është $F_{0.05[1,398]} = 1.225$ ($p = 0.269$). Meqënëse $p > 0.05$, ndryshimi ndërmjet mesatareve të rezultateve të përftuara nga teknikat e mësipërme nuk është sinjifikant, varianca midis grupeve dhe brenda grupeve vlerësojnë të njëjtën variancë parametrike.

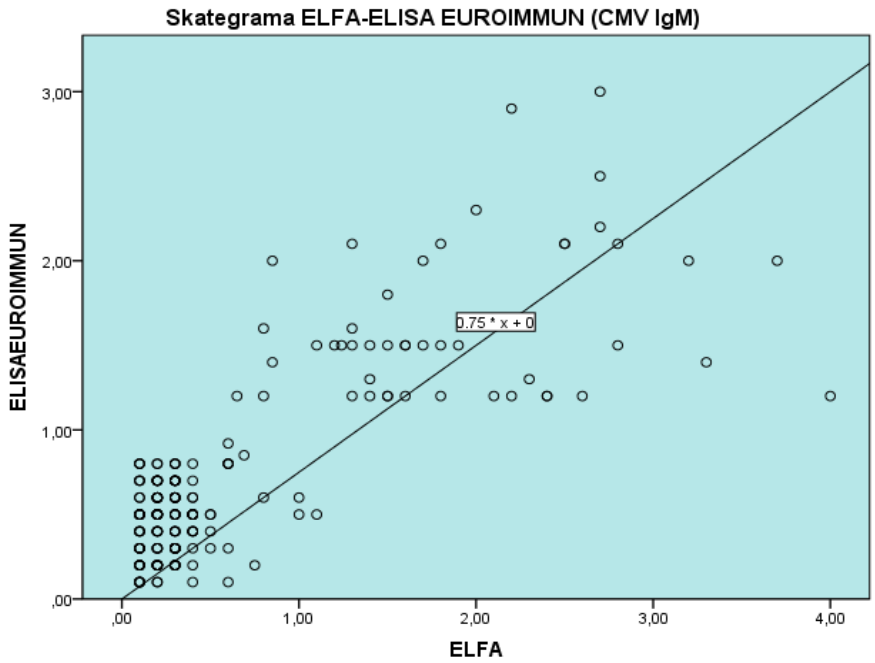


Figura 3-11: Skategrama e teknikave ELFA dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.

Në figurën 3-11 paraqitet skategrama e teknikave ELFA dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM. Vija lineare karakterizohet me ekuacionin y=0.75*x, ndërsa skategrama është jolineare, pozitive, me korrelacion jo të fortë (r=0.809) për shkak të disa vlerave, që i shmangen drejtimit të skategramës.

Tabela 3-22: Rezultatet e analizës së variancës njëdrejtimëshe të teknikave ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.

ANOVA NJËDREJTIMËSHE (ELISA CHORUS DHE ELISA EUROIMMUN)					
Burimi i Variacionit	Shuma kuadratike	Shkallët e lirisë [df]	Mesatarja kuadratike	Vlera e Fisherit [F]	Sinjifikanca [p]
Midis grupeve	.037	1	.037	.127	.722
Brenda grupeve	117.410	398	.295		
Totali	117.447	399			

Në tabelën 3-22 është paraqitur analiza e variancës njëdrejtimëshe (α=0.05) për rezultatet e teknikave ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM. Vlera e Fisherit është $F_{0.05[1,398]} = 0.127$ ($p = 0.722$). Meqënëse $p > 0.05$, ndryshimi ndërmjet mesatareve të rezultateve të përftuara nga teknikat e mësipërme nuk është sinjifikant, varianca midis grupeve dhe brenda grupeve vlerësojnë të njëjtën variancë parametrike.

Në figurën 3-12 paraqitet skategrama e teknikave ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM. Vija lineare karakterizohet me ekuacionin y=1*x, ndërsa skategrama është lineare, pozitive, me korrelacion më të dobët se teknikat e tjera (r=0.792).

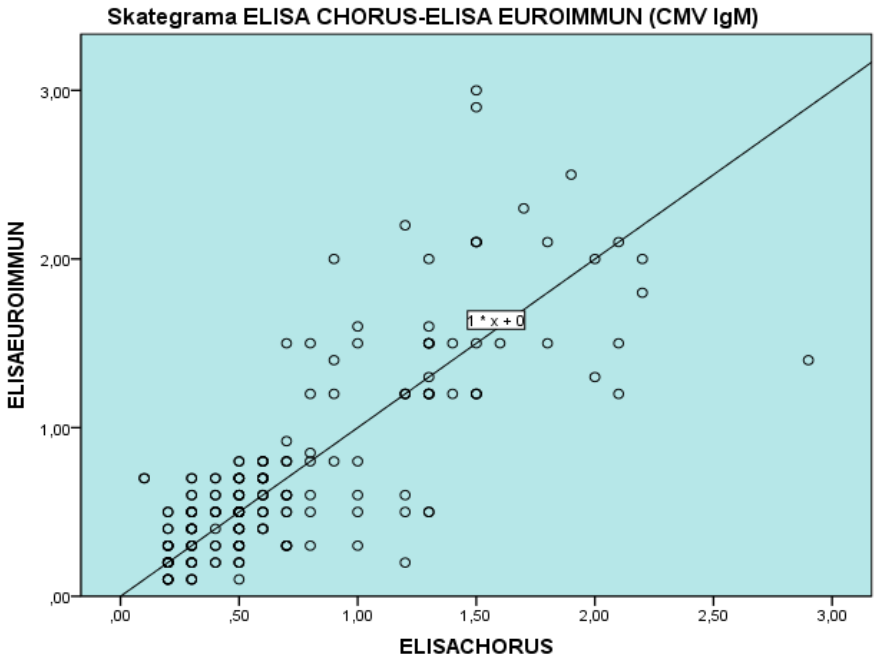


Figura 3-12: Skategrama e teknikave ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.

3.3. Diskutime

Në përfundim të përpunimeve statistikore vëmë re se teknikat që korrelojnë më shumë me njëra-tjetrën për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM janë ECL dhe ELISA (EUROIMMUN) me vlerën e koefiçientit të korrelacionit 0.896, ndërsa për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM janë teknikat ECL dhe ELFA me vlerën e koefiçientit të korrelacionit 0.942. Teknikat që korrelojnë më pak me njëra-tjetrën për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM janë ELFA dhe ELISA (EUROIMMUN) me vlerën e koefiçientit të korrelacionit 0.822, ndërsa, për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM janë teknikat ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) me vlerën e koefiçientit të korrelacionit 0.792. Gjithashtu, vëmë re se korrelacioni ndërmjet teknikave të realizuara më sipër luhatet ndërmjet vlerave 0.792-0.946, i cili tregon një shoqërim të kënaqshëm të teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) me njëra-tjetrën.

Për sa i përket analizës së variancës vëmë re se sinjifikanca ka rezultuar në të gjitha rastet më e madhe se 0.05. Kjo do të thotë që ndryshimi ndërmjet mesatareve të rezultateve të përftuara nga teknikat e mësipërme nuk është sinjifikant, varianca midis grupeve dhe brenda grupeve vlerësojnë të njëjtën variancë parametrike. Pra teknikat e mësipërme nuk paraqesin ndryshime sinjifikative për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM ose anti-Citomegalovirus IgM.

Qëllimi i studimit tonë është krahasimi i ndjeshmërisë dhe specificitetit ndërmjet këtyre teknikave, në kuadër të shumë studimeve të kryera vitet e fundit në shumë shtete të botës, në lidhje me diagnozën serologjike të *Toxoplasma gondii* dhe *Citomegalovirusit*, veçanërisht në lidhje me kërkimin e teknikave rutinë me

ndjeshmëri dhe specificitet të lartë *(Prusa AR, et al, 2010).* Ndër këto studime është përfshirë gjerësisht analizimi i teknikave ECL, ELFA dhe ELISA për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma gondi dhe anti-Citomegalovirus. Në punimin tonë teknika ECL dhe ELISA EUROIMMUN rezultuan me vlerat më të larta të ndjeshmërisë dhe specificitetit për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM dhe anti-Citomegalovirus IgM. Respektivisht, teknika ECL rezultoi me vlerat më të larta të ndjeshmërisë (100%) dhe teknika ELISA (EUROIMMUN) rezultoi me vlerat më të larta të specificitetit (100%) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM, ndërsa për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM teknika ECL rezultoi me vlerat më të larta të ndjeshmërisë (98 %) dhe teknika ELISA (EUROIMMUN) rezultoi me vlerat më të larta të specificitetit (98.7%).

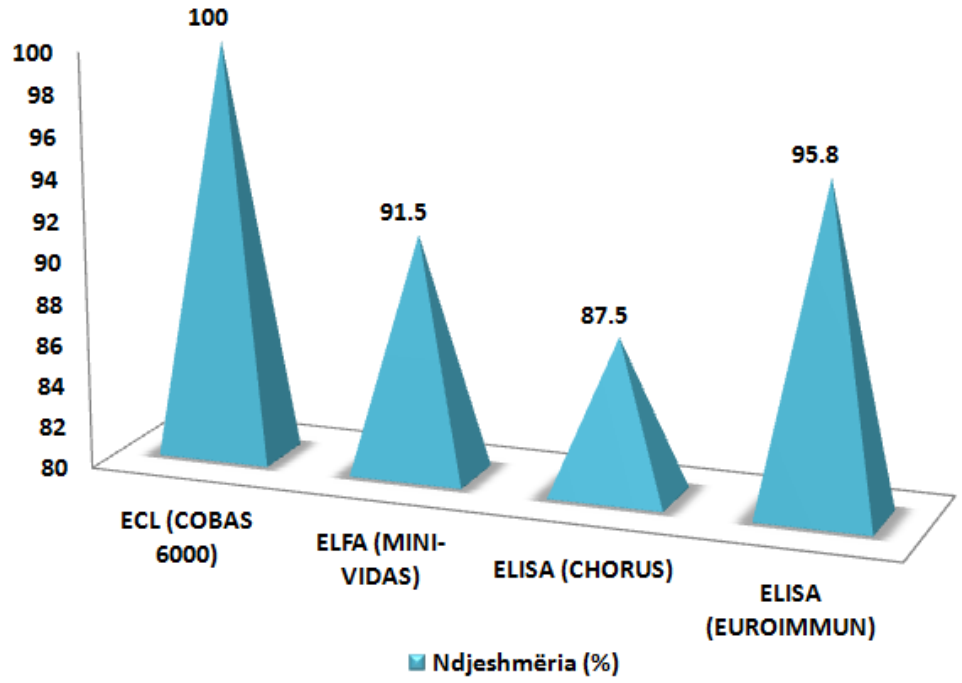


Figura 3-13: Paraqitja grafike e ndjeshmërisë së teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.

Në figurën 3-13 paraqiten vlerat e ndjeshmërisë për secilën prej teknikave për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM, ku vihet re se teknika më pak e ndjeshme është ELISA (CHORUS) me vlerën e ndjeshmërisë 87.5%.

Në figurën 3-14 paraqiten vlerat e specificitetit për secilën prej teknikave, ku vihet re se teknika më pak specifike për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM është ELISA (CHORUS) (97.3%).

Në figurën 3-15 paraqiten vlerat e ndjeshmërisë për secilën prej teknikave për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM, ku vihet re se teknika më pak te ndjeshme është ELISA CHORUS (97.3%).

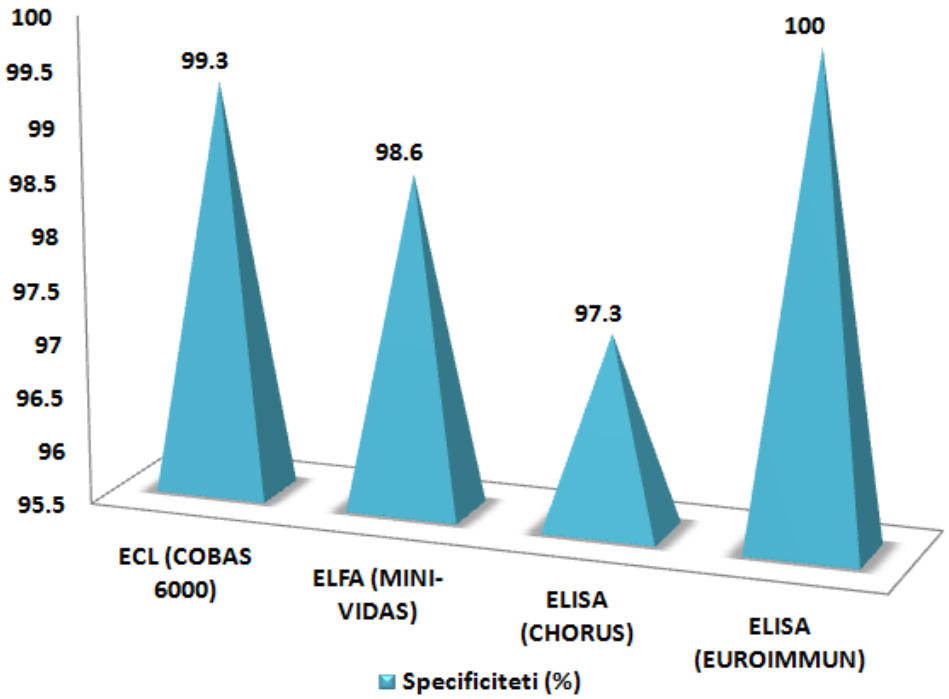


Figura 3-14: Paraqitja grafike e specificitetit të teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.

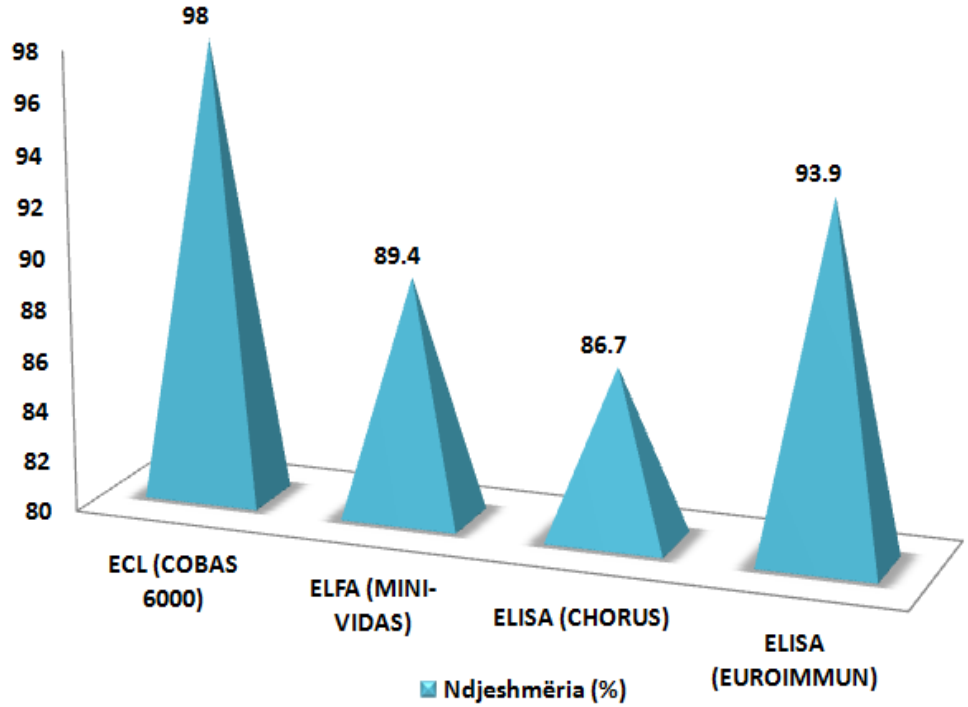


Figura 3-15: Paraqitja grafike e ndjeshmërisë së teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.

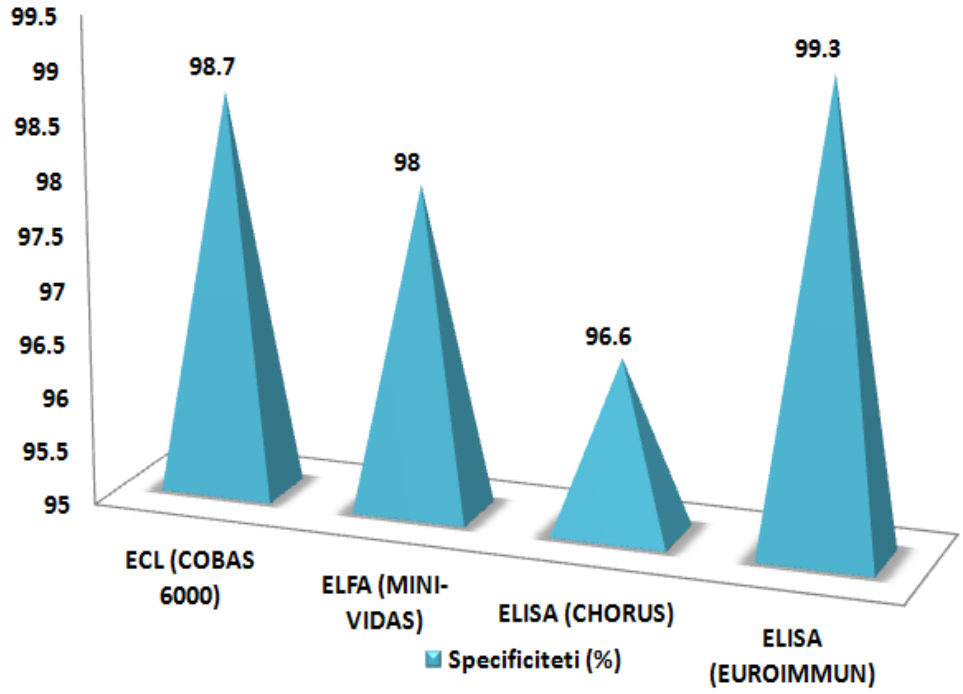


Figura 3-16: Paraqitja grafike e specificitetit të teknikave ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.

Në figurën 3-16 paraqiten vlerat e specificitetit për secilën prej teknikave për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM, ku vihet re se teknika më pak specifike është ELISA CHORUS (96.6 %).

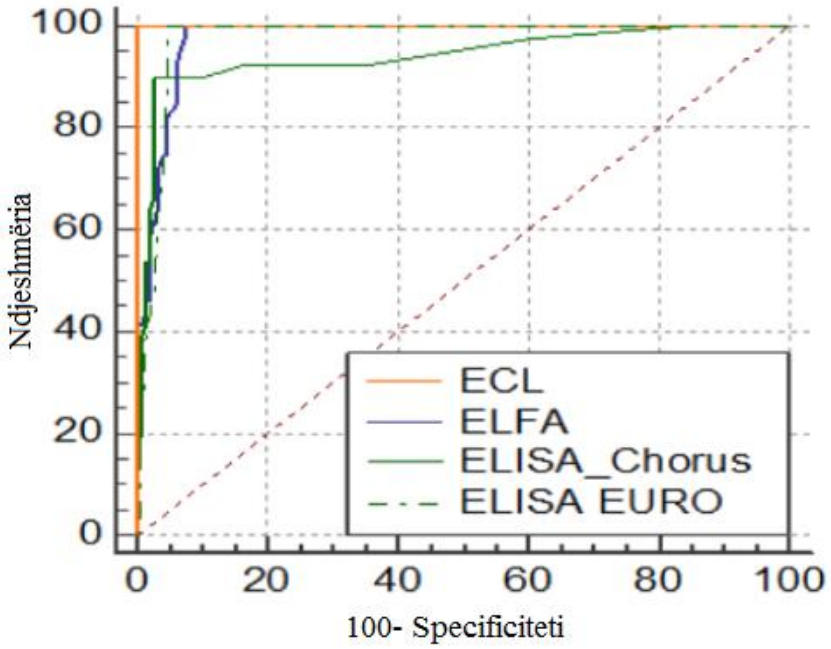


Figura 3-17: Paraqitja e grafikëve ROC të teknikave të përdorura për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM.

Tabela 3-23: Paraqitja e vlerave të koefiçientit AUC për teknikat e përdorura për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM

Teknika	AUC (95 %)
ECL	1,000
ELFA	0,974
ELISA_Chorus	0,941
ELISA_EURO	0,977

Në figurën 3-17 paraqiten grafikët ROC për teknikat ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) të përdorura për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM. Vlerat e koefiçientëve AUC për secilën teknikë janë paraqitur në tabelën 3-23. Meqënëse koefiçienti AUC është një matje e cilësisë së përgjithshme të një testi diagnostikues, mund të krahasojmë përformancën e testeve të ndryshme duke krahasuar koefiçientët AUC të tyre. Gjatë diagnostikimeve të grave shtatëzëna për Toxoplasma gondii ose Citomegalovirusin, është shumë e rëndësishme ndjeshmëria sepse rezultatet fals negative mund të çojnë në pasoja të rënda për fetusin. Të katër teknikat e përdorura për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM kanë rezultuar me koefiçientin AUC > 0.5. Siç vihet re teknika ECL karakterizohet nga vlera maksimale e koefiçientit AUC (1), e shoqëruar nga teknika ELISA EUROIMMUN me vlerën 0.977, teknika ELFA me vlerën 0.974 dhe ELISA CHORUS me vlerën 0.941. Këto rezultate të koefiçientëve AUC reflektohen edhe në figurën 3-17, ku teknika ECL karakterizohet me ndjeshmërinë më të lartë (grafiku me ngjyrë të kuqe), ndërsa teknika ELISA CHORUS (grafiku me ngjyrë të gjelbër) karakterizohet nga ndjeshmëri më e ulët.

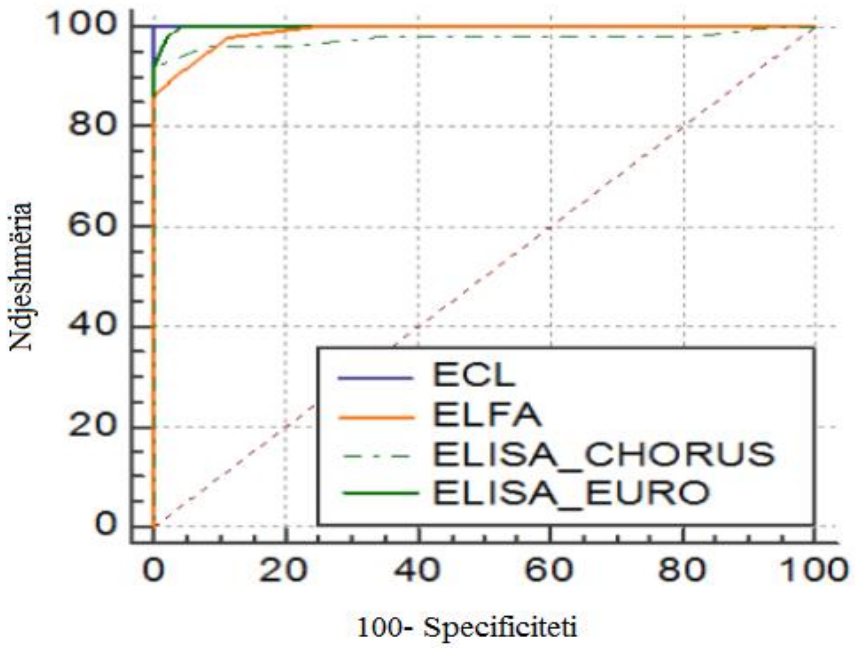


Figura 3-18: Paraqitja e grafikëve ROC të teknikave të përdorura për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM.

Tabela 3-24: Paraqitja e vlerave të koefiçientit AUC për teknikat e përdorura për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM

Teknika	AUC (95 %)
ECL	1,000
ELFA	0,990
ELISA_CHORUS	0,976
ELISA_EURO	0,999

Në figurën 3-18 paraqiten grafikët ROC për teknikat ECL, ELFA, ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN) të përdorura për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM. Vlerat e koefiçientëve AUC për secilën teknikë janë paraqitur në tabelën 3-24. Të katër teknikat e përdorura për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM kanë rezultuar me koefiçientin AUC > 0.5. Siç vihet re teknika ECL karakterizohet nga vlera maksimale e koefiçientit AUC (1), e shoqëruar nga teknika ELISA EUROIMMUN me vlerën 0.999, teknika ELFA me vlerën 0.990 dhe ELISA CHORUS me vlerën 0.976. Këto rezultate të koefiçientëve AUC reflektohen edhe në figurën 3-18, ku teknika ECL karakterizohet me ndjeshmëri maksimale (grafiku me ngjyrë të kaltër), ndërsa teknika ELISA CHORUS karakterizohet me ndjeshmëri më të ulët (grafiku me vija të ndërprera).

Në diagnostikimin e grave shtatëzëna, sidomos në tre mujorin e parë të shtatëzanisë, është shumë e rëndësishme mungesa e rezultateve fals negative për antitrupat IgM ndaj Toxoplasma gondii dhe Citomegalovirusit. Kjo lidhet me faktin se ekzistenca e rezultateve fals negative shoqërohet me mungesë diagnostikimi të infeksioneve akute dhe të trajtimit në kohë të fetusit dhe fëmijës së sapolindur *(Jean-Benjamin Murat et al., 2013)*. Nga studimi jonë del ndjeshmëria shumë e lartë i teknikës ECL 100 % (dhe specificiteti 99.3 %) për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM. Këto vlera të larta të ndjeshmërisë dhe specificitetit të aparatit COBAS 6000 dhe teknikës ECL, i atribuohen disa veçorive të rëndësishme të këtij sistemi si: pajisja e të gjithë reagentëve më barkod dydimensional duke minimizuar gabimet e mundshme, ruajtja dhe kontrolli i vazhdueshëm i kurbës së kalibrimit dhe veçanërisht është shumë e rëndësishme përdorimi i substancave elektrokimikisht aktive, kompleksi i ruteniumit dhe tripropilamina (TPA) në reaksionet që çojnë në emëtimin e dritës. Rëndësia e tyre konsiston në faktin që gjatë matjes TPA-ja ripërdoret por gjendja e kompleksit të ruteniumit rigjenerohet vazhdimisht. Kjo do të thotë që kompleksi i ruteniumit mund të performojë shumë cikle të gjenerimit të dritës gjatë proçesit të matjes. Për këtë arsye shumë fotone mund të krijohen nga një kompleks antigen-antitrup. Kjo tregon një efekt amplifikues i cili kontribuon në ndjeshmërinë e kësaj teknologjie.
Studimi jonë shkon në përputhje me studimin e Van Helden J et al., (2009), i cili ka realizuar studimin e performancës së kiteve Toxo IgG dhe Toxo IgM të prodhuara nga Roche Diagnostics. Ai ka theksuar se këto dy kite zbatojnë testin ECL, e cila është një teknikë automatike shumë e shpejtë, e ndjeshme dhe specifike. Në studimin e tij, Van Helden arriti në përfundimin se Elecsys Toxo IgM karakterizohej nga ndjeshmëri

100% dhe specificitet 99.11%. Në përputhje me këtë studim, ne kemi vetëm një rast fals pozitiv dhe një të dyshimtë me titër të ulët, i cili ul specificitetin dhe kjo i dedikohet ndjeshmërisë shumë të madhe të teknikës ECL. Në studimin kompleks të autorëve Montoya JG et al., (1992), Meek B et al., (2001), Yong SY et al., (1994), Thulliez P et al., (2001), cituar edhe nga Roche theksohet se antigeni glikolipid i *Toxoplasma gondii* nuk është specifik dhe vepron në reaksione të kryqëzuara me antitrupa të origjinave të ndryshme, duke na dhënë rezultate fals pozitive, fals negative ose të dyshimta. Kjo shpjegon ekzistencën e rezultateve fals pozitive në studimin tonë. Gjithashtu, individët që ndodhen në fazën fillestare të një infeksioni akut, mund të mos shfaqin nivele të matshme të antitrupave anti-Toxoplasma IgM. Në disa prej këtyre individëve, mund të gjendet një rezultat pozitiv i ulët i antitrupave anti-Toxoplasma IgG, që shpreh një infeksion akut të hershëm. Në disa individë, antitrupat specifikë anti-Toxoplasma IgM mund të kthehen në nivele jo reaktive brenda disa javëve pas infeksionit me *T.gondii*.

Gjithashtu, *Van Helden J et al., 2009,* kanë realizuar një studim tjetër në lidhje me vlerësimin e teknikës ECL për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgG dhe anti-Citomegalovirus IgM. Ai ka theksuar edhe në këtë rast se teknika ECL CMV-IgM dhe CMV-IgG është një ndër teknikat plotësisht automatike, më të shpejta, të ndjeshme dhe specifike të prodhuar nga Roche Diagnostics që mund të aplikohet në sistemet Roche Elecsys 2010, MODULAR Analytics E170 (Elecsys module), cobas® e 411 dhe cobas e 601. Në këtë studim është realizuar krahasimi i teknikës ECL me teknika të tjera të përdorura në Itali, Gjermani, Francë, Izrael dhe Austri. Të dyja testet rezultuan me specificitet të shkëlqyer veçanërisht CMV IgM 97.0–98.8%. Në përputhje me këtë studim, në punimin tonë kanë rezultuar 1 rast fals pozitiv dhe 2 raste fals negative që ulin specificitetin në 98.7 % dhe ndjeshmërinë në 98 %, për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM. Në përfundim, Van Helden theksoi se teknika ECL dhe kitet e prodhuara nga Roche Diagnostics për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma dhe anti-Citomegalovirus janë shumë të besueshme për diagnostikën rutinë mjekësore. Në studimin tonë, në përputhje edhe me studimin e Van Helden vihet re se teknika ECL nuk karakterizohet nga vlerat maksimale të ndjeshmërisë dhe specificitetit për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM. Kjo mendohet të ndodhë për shkak të interferencave të mundshme që ndodhin gjatë matjes. Mostrat e marra prej pacientëve që karakterizohen prej infeksioneve fillestare të virusit Epstein-Barr, mund të rezultojnë pozitive në testet CMV IgM të sistemit COBAS 6000. Kjo mendohet të ndodhë sepse të dy viruset janë pjesëtarë të familjes së herpesviruseve. Gjithashtu, individët që ndodhen në fazën fillestare të një infeksioni akut, mund të mos shfaqin nivele të matshme të antitrupave anti-Citomegalovirus IgM. Në disa individë, antitrupat specifikë anti-Citomegalovirus IgM mund të kthehen në nivele jo reaktive brenda disa javëve, pas infeksionit me *Citomegalovirus*.
Nisur nga përfundimet dhe literaturat, ne zbatuam, në vijueshmëri teknikat alternative ELFA (MINI-VIDAS 2000), ELISA (CHORUS) dhe ELISA (EUROIMMUN).

Një tjetër studim bashkëkohor, i cili ka të njëjtin objekt si në studimin tonë është studimi i Andrea R et al., 2010, i cili ka arritur në përfundimin se teknika ECL karakterizohet nga ndjeshmëri dhe specificitet respektivisht 97.1% dhe 100.0%. Sistemi COBAS 6000, të cilin kemi përdorur është i përparuar në kohë dhe Roche Diagnostics e ka përfshirë atë në sistemet automatike duke eleminuar rezultatet fals negative. (http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.07.011)

Pra, duke u nisur nga vlerat e larta të ndjeshmërisë dhe specificitetit mund të theksohet se ECL është vlerësuar si teknikë shumë e vlefshme në diagnostikën rutinë mjekësore, veçanërisht për matjen e infeksioneve në gratë shtatëzëna. Megjithatë, Andrea R hedh hipotezën se nëse supozohet ekzistenca e infeksioneve të *T. gondii* ose *Citomegalovirusit* gjatë shtatëzanisë, duhet të realizohen teste të tjera konfirmuese.

Në këtë studim testet ELISA EUROIMMUN janë karakterizuar nga vlera të larta të ndjeshmërisë dhe specificitetit, të krahasueshme me teknikën ECL, respektivisht 93.9 %, 99.3 % për CMV IgM dhe 95.8 %, 100 % për Toxo IgM. Sipas Maria Grazia Revello dhe Giuseppe Gerna, 2002, testi ELISA është shumë i rekomanduar për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM dhe karakterizohet nga specificitet 100 %. Në studimin tonë vihet re se testi ELISA është shumë i mirë për matjen e mostrave fals pozitive, duke rezultuar me specificitet shumë të lartë. Por ky test është mjaft i ndjeshëm ndaj faktorëve interferues, për këtë arsye nevojitet holluesi i serumit, i cili eleminon antitrupat specifikë IgG duke eleminuar rezultatet fals pozitive ose fals negative. Përdoruesi i këtij kiti duhet të lexojë me kujdes paketimin dhe të realizojë pipetime të sakta të reagentëve dhe mostrave të shoqëruara me shpëlarje dhe kohën e duhur të inkubimit. Gjithashtu mostrat që janë të dyshimta edhe pas përsëritjeve të testimit të tyre, duhet të testohen me teste të tjera konfirmuese.
Mungesa e matjes së antitrupave IgM, nuk e përjashton mundësinë e infeksioneve akute. Ekzistenca e antitrupave IgG në serum mund të shkaktojë rezultate fals negative, ndërsa prania e faktorit rheumatoid mund të shkaktojë rezultate fals pozitive *(M.Grazia Revello et al., 1991)*. *M.Grazia Revello et al., 1991*, në studimin e tyre kanë shprehur se specificiteti i testit ELISA zvogëlohej nga 100 % në 98.9 % në pacientët me virusin Epstein Barr, sëmundje autoimune ose me faktor rheumatoid. Gjithashtu, disa antitrupa antinuklearë mund të shkaktojnë reaksione fals pozitive në disa teste ELISA. Maria Grazia Revello dhe Giuseppe Gerna 2002, theksojnë se rezultatet fals pozitive gjatë matjes së antitrupave anti-Citomegalovirus IgM të shkaktuara nga prania e virusit Epstein Barr, janë pasojë e stimulimit të qelizave B plazmatike për prodhimin e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM, e njëjta ndjeshmëri si në teknikën ECL.
Shkaqet e diferencave ndërmjet teknikave të mësipërme për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM dhe anti-Citomegalovirus IgM, janë ende të paqarta. *O Liesenfeld et al., 1997* mendon se këto diferenca janë pasojë e ndryshimeve në përgatitjen e antigeneve dhe në metodën e zgjedhur.

Teknika e tretë që u testua në mostrat tona për Toxoplasmën dhe Citomegalovirusin është ELFA, e zbatuar në aparatin MINI-VIDAS 2000 Bio-Mereux. Nga studimi jonë del ndjeshmëria 91.5 % dhe specificiteti 98.6 % për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM dhe ndjeshmëria 89.4 % dhe specificiteti 98 % për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM. Këto vlera të aparatit MINI-VIDAS i atribuohen kombinimit të teknikës enzimologjike EIA me një lexim fluoreshent, përdorimit të një faze solide SPR, e cila është bazë për reaksionin imunologjik, matjes nga sistemi të çdo ndryshimi kimik që mund të ndodhë në kyvetën optike në sajë të leximit fluorometrik dhe ciklimit të reagentit disa herë jashtë dhe brenda SPR-së duke rritur kinetikën e reaksionit. Por, nëpërmjet kësaj teknike vihet re se për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM kanë rezultuar katër mostra pozitive të cilat janë matur si negative, dy mostra negative janë matur si pozitive dhe 5 mostra nuk kanë

arritur të maten saktë duke rezultuar në vlera të dyshimta. Ndërsa, për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM kanë rezultuar pesë mostra pozitive të cilat janë matur si negative (fals negative), tre mostra negative janë matur si pozitive (fals pozitive) dhe 6 mostra nuk kanë arritur të maten saktë duke rezultuar në vlera të dyshimta.
Sipas F. Vlaspolder, et al 2001, dhe Pal Carrier et al 2010, teknika ELFA vlerësohet me ndjeshmëri dhe specificitet që luhaten ndërmjet vlerave 97 % - 100 %. Ndërsa, sipas Jean-Benjamin Murat, et al., 2013, sistemi VIDAS karakterizohet nga ndjeshmëri 81.8-90.9 % dhe specificitet 100%. Kjo justifikohet me faktin se individët që ndodhen në fazën fillestare të një infeksioni akut, mund të mos shfaqin nivele të detektueshme të antitrupave anti-Toxoplasma IgM ose anti-Citomegalovirus IgM. Për këtë arsye matja e antitrupave ndaj *T.gondii* dhe *Citomegalovirusit* në një mostër të vetme nuk është e mjaftueshme. Justifikimi tjetër është që mund të ndodhë interferencë në disa serume që përmbajnë antitrupa ndaj përbërësve të reagentëve. Në disa individë antitrupat specifikë anti-Toxoplasma IgM ose anti-Citomegalovirus IgM mund të kthehen në nivele jo reaktive brenda disa javëve, pas infeksionit me *T.gondii* ose *Citomegalovirus.*

Në sistemin MINI-VIDAS ekziston një interferencë që lidhet me specificitetin e antigeneve të *T.gondii* dhe *Citomegalovirusit*, e përmendur edhe për sistemin COBAS 6000. Antigeni glikolipid i *Toxoplasma gondii* nuk është specifik dhe vepron në reaksione të kryqëzuara me antitrupa të origjinave të ndryshme, duke na dhënë rezultate fals positive, fals negative ose të dyshimta. Gjithashtu, mostrat e marra prej pacientëve që karakterizohen prej infeksioneve fillestare të virusit Epstein-Barr, mund të rezultojnë pozitive në testet CMV IgM të sistemit MINI-VIDAS 2000. Kjo mendohet të ndodhë sepse të dy viruset janë pjesëtarë të familjes së herpesviruseve.
Për arsyet e përmendura më sipër, mund të themi se sistemi MINI-VIDAS është një sistem i thjeshtë në diagnostikën rutinë mjekësore, që karakterizohet nga një korrelacion i kënaqshëm i rezultateve me sistemin COBAS 6000, nga ndjeshmëri dhe specificitet të kënaqshëm, por rezultatet duhet të interpretohen në përputhje me rezultatet e testeve të tjera diagnostikuese, si ECL dhe PCR. *O Liesenfeld et al., 1997* rekomandon përsëritjen e matjeve mbas një përiudhe kohore trejavore.

Teknika e katërt që u testua në mostrat tona për Toxoplasmën dhe Citomegalovirusin është ELISA (e zbatuar në aparatin CHORUS DIESSE). Nga studimi jonë del ndjeshmëria 87.5 % dhe specificiteti 97.3 % për matjen e antitrupave anti-Toxoplasma IgM dhe ndjeshmëria 86.7 % dhe specificiteti 96.6 % për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM. Është një test që ofron leverdi dhe lehtësi në zbatimin e tij pasi, CHORUS është një aparat i automatizuar multiparametrik në të cilin mjafton hedhja e mostrës me pipetë dhe aparati realizon vetë të gjitha proçedurat e tjera (hollime, inkubime, shpëlarje, lexime fotometrike, etj), stripet janë të gatshme dhe secili është i pajisur me barkod që lexohet nga aparati me anë të një skanimi. Gjithashtu, programi i këtij aparati realizon kontroll të dyfishtë të testeve të rregjistruara për të shmangur gabime të mundshme. Por, nëpërmjet matjeve të realizuara në aparatin CHORUS për antitrupat anti-Toxoplasma IgM, kanë rezultuar 5 raste pozitive që janë matur si negative (fals negative), 4 raste negative që janë matur si pozitive (fals pozitive) dhe 12 raste që nuk kanë arritur të maten duke na dhënë rezultate të dyshimta. Ndërsa, për matjen e antitrupave anti-Citomegalovirus IgM

kanë rezultuar 6 raste fals negative, 5 raste fals pozitive dhe 10 raste që nuk kanë arritur të maten duke na dhënë rezultate të dyshimta.

Për këtë arsye mund të themi se ky test mund të përdoret në diagnostikën mjekësore në testime të rasteve urgjente por jo në gra shtatëzëna. Nëse përdoret në to, rezultatet e tij duhet të krahasohen me ato të një testi tjetër, me teknika më të ndjeshme siç janë PCR dhe ECL. Kjo konfirmohet edhe nga punime të tjera *(Bobic B et al., 1991)*, ku theksohet se për testin ELISA që zhvillohet në sistemin CHORUS ekziston edhe një interferencë. Mostrat e pacientëve që gjenden në fazë të hershme ose të vonshme të infeksionit prej *Toxoplasma gondii* ose *Citomegalovirusit* mund të japin rezultate negative të përsëritshme. Në raste të tilla, rekomandohet konfirmimi i rezultatit nëpërmjet testimit të të njëjtit pacient 7-10 ditë pas testimit të parë. Rezultatet e testeve të realizuara në aparatin CHORUS duhet të interpretohen me kujdes dhe në lidhje me informacionin e marrë nga vlerësimi klinik dhe të dhëna të tjera diagnostikuese për çdo pacient.

PËRFUNDIME

1. Aparati COBAS 6000 Roche Hitachi dhe teknika ECL që zbatohet në të karakterizohen nga vlerat më të larta të ndjeshmërisë.

2. Teknika ELISA (EUROIMMUN) karakterizohet nga vlerat më të larta të specificitetit dhe vlera të ndjeshmërisë të krahasueshme me teknikën ECL.

3. Saktësia maksimale, për matjen e antitrupave IgM ndaj Toxoplasma gondit dhe Citomegalovirusit arrihet nëpërmjet testimit me dy teknikat e mësipërme, të cilat plotësojnë njëra-tjetrën meqënëse ECL ka ndjeshmërinë më të lartë dhe ELISA (EUROIMMUN) ka specificitetin më të lartë.

4. Teknika ELFA, e zbatuar në aparatin MINI-VIDAS 2000 Bio-Mereux karakterizohet nga vlera të kënaqshme të ndjeshmërisë dhe specificitetit, por më të ulta se teknikat ECL dhe ELISA (EUROIMMUN).

5. Aparati CHORUS DIESSE nuk mund të renditet ende përkrah simotrave të tij COBAS 6000, MINI-VIDAS 2000 dhe ELISA (EUROIMMUN). Kjo ndodh sepse teknika, që zbatohet në këtë aparat karakterizohet nga vlerat më të ulta të ndjeshmërisë dhe specificitetit.

6. Nisur nga katër pikat e mësipërme arrijmë në përfundimin se aparati CHORUS nuk mund të përdoret në diagnostikë, sidomos në rastin e grave shtatëzëna. Ai mund të përdoret në testimet e popullatës dhe të urgjencës (të cilat janë orientuese), por përsëri kërkohet konfirmimi i rezultateve.

Rekomandim

Rekomandohet diagnostikimi i tremujorit të parë të shtatëzanisë për faktorët infektivë me teknikat me ndjeshmëri dhe specificitet të lartë si ECL dhe ELISA EUROIMMUN.

FALENDERIME

Gjej rastin të falenderoj përzemërsisht të gjithë personat që më kanë ndihmuar në realizimin e këtij punimi:

- *Mirënjohje e thellë dhe shumë falenderime i drejtohen Prof. As. Anila Mitre, për ndihmën si udhëheqëse shkencore, këshillat dhe mbështetjen që më ka dhënë.*
- *Drejtuesit dhe ish kolegët e mi të Laboratorit Mjekësor Intermedika, Tiranë, në veçanti Blerta Dardha dhe Hysnela Marra për gadishmërinë e pakursyer që kanë treguar për mbledhjen e mostrave dhe zhvillimin e studimit.*
- *Fakultetin e Shkencave të Natyrës, për grantin e dhënë për reagentët e nevojshëm për zhvillimin e teknikës ECL në aparatin COBAS 6000.*
- *Kompaninë CHORUS për grantin e dhënë për realizimin e matjeve në aparatin CHORUS, në kuadër të testimit të këtij aparati në Shqipëri.*

Këtë studim ua kushtoj familjes time: prindërve, vëllait, motrës dhe në veçanti bashkëshortit tim që më ka mbështetur shumë gjatë këtij studimi.

LITERATURA

1. A. Maudry, G. Chene, R. Chatelain *et al.* (2009). Bicentric evaluation of six anti-toxoplasma immunoglobulin G (IgG) automated immunoassays and comparison to the Toxo II IgG Western blot. Clin Vaccine Immunol, 16, pp. 1322–1326
2. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pillai, S. (2007). Cellular and Molecular Immunology. (6th edn.), Saunders Elsevier.
3. ANDERSSON J. (1990): Cytomegalovirus Infection in Pregnancy Scand. J. Infect. Dis., Suppl. 71, 67-70.
4. Andrea-Romana Prusa[a], Michael Hayde[a], Lukas Unterasinger[a], Arnold Pollak[a], Kurt R. Herkner[a, b], David C. Kasper[a, b]. (Dec 2010). Evaluation of the Roche Elecsys Toxo IgG and IgM electrochemiluminescence immunoassay for the detection of gestational *Toxoplasma* infection. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease; Volume 68, Issue 4, pg 352-357.
5. Andrea-Romana Prusa[a], Michael Hayde[a], Arnold Pollak[a], Kurt R. Herkner[b] and David C. Kasper[b]. (November 2012). Evaluation of the Liaison Automated Testing System for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. Clin Vaccine Immunol; vol. 19 no. 111859-1863.
6. Antoine Bénard, Eskild Petersen. (Apr 2008). Survey of European programmes for the epidemiological surveillance of congenital toxoplasmosis. Euro Surveill; 13(15).
7. Ariel Many and Gideon Koren. (2006). Life cycle of *Toxoplasma gondii*. Can Fam Physician; 52(1): 29-32.
8. Bastien, P., E. Jumas-Bilak, E. Varlet-Marie, and P. Marty. (2007). Three years of multi-laboratory external quality control for the molecular detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid in France. Clin. Microbiol. Infect. 13:430-433.
9. Bastien, P., G. W. Procop, and U. Reischl. (2008). Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR. J. Clin. Microbiol. 46:1897-1900.
10. Beghetto, E., H. V. Nielsen, P. Del Porto, W. Buffolano, S. Guglietta, F. Felici, E. Petersen, and N. Gargano. (2005). A combination of antigenic regions of *Toxoplasma gondii* microneme proteins induce protective immunity against oral infection with parasite cysts. J. Infect. Dis. 191:637-645.
11. Berth, M., and E. Bosmans. 2010. Comparison of three automated immunoassay methods for the measurement of Epstein-Barr virus-specific immunoglobulin M. Clin. Vaccine Immunol. 17:559-563.
12. Bessieres, M. H., A. Berrebi, S. Cassaing, J. Fillaux, J. P. Cambus, A. Berry, C. Assouline, J. M. Ayoubi, and J. F. Magnaval. (2009). Diagnosis of congenital toxoplasmosis: prenatal and neonatal evaluation of methods used in

Toulouse University Hospital and incidence of congenital toxoplasmosis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104:389-392.

13. BIOMERIEUX SA. Vidas Manual instrument, Version B. VIDAS CMV IgM. REF 30205.

14. BIOMERIEUX SA. Vidas Manual instrument, Version B. VIDAS TOXO IgM. REF 30205.

15. Bobic, B., D. Sibalic, and O. Djurkovic-Djakovic. (1991). High levels of IgM antibodies specific for*Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary toxoplasma infection. Gynecol. Obstet. Investig.31:182-184.

16. Branko Bobić, Ivana Klun, Marija Vujanić, Aleksandra Nikolić, Vladimir Ivović, Tijana Živković and Olgica Djurković-Djaković. (March 2009). Comparative evaluation of three commercial *Toxoplasma*-specific IgG antibody avidity tests and significance in different clinical settings. J Med Microbiol vol. 58 no. 3 358-364.

17. Brenier-Pinchart, M. P., V. Morand-Bui, H. Fricker-Hidalgo, V. Equy, R. Marlu, and H. Pelloux. (2007). Adapting a conventional PCR assay for *Toxoplasma gondii* detection to real-time quantitative PCR including a competitive internal control. Parasite 14:149-154

18. Buffolano, W., Beghetto, E., Del Pezzo, M., Spadoni, A., Di Cristina, M., Petersen, E., Gargano, N. (2005). Use of Recombinant Antigens for Early Postnatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5916-5924.

19. Buffolano, W., M. Lappalainen, L. Hedman, F. Ciccimarra, M. Del Pezzo, R. Rescaldani, N. Gargano, and K. Hedman. (2004). Delayed maturation of IgG avidity in congenital toxoplasmosis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 23:825-830.

20. C. Jost, F. Touafek and L. Paris Clin (Nov 2011). Utility of Immunoblotting for Early Diagnosis of Toxoplasmosis Seroconversion in Pregnant Women. Vaccine Immunol; 18(11): 1908–1912.

21. Carlier P[1], Harika N, Bailly R, Vranken G. **(**2010 Nov**).** Laboratory evaluation of the new Access ® cytomegalovirus immunoglobulin IgM and IgG assays. J Clin Virol. ;49(3):192-7. doi: 10.1016/j.jcv.2010.07.024.

22. Cassaing, S., M. H. Bessieres, A. Berry, A. Berrebi, R. Fabre, and J. F. Magnaval. (2006). Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. J. Clin. Microbiol. 44:720-724.

23. Centonze AR, Tonolli E, Fontana R. Performance characteristics of current-generation Immulite 2000 TORCH Assays. *Clin. Vaccine Immunol*. 20(1), 122–126 (2013).

24. Chabbert, E., L. Lachaud, L. Crobu, and P. Bastien. (2004). Comparison of two widely used PCR primer systems for detection of toxoplasma in amniotic fluid, blood, and tissues. J. Clin. Microbiol. 42:1719-1722.

25. Cheeran, M. C.-J., Lokensgard, J. R., and Schleiss, M. R. (2009).

Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: Disease mechanisms and prospects for intervention. Clinical Microbiology Reviews, 22(1):99–126.

26. Chou S., et al. (1987): "Immunoglobulin M to Cytomegalovirus in primary and reactivation infections in renal transplant recipients". Journal of Clinical Microbiology. 25. 52-55.
27. Clemens Busse, Andreas Strubel, Paul Schnitzler. (2008). Combination of native and recombinant cytomegalovirus antigens in a new ELISA for detection of CMV-specific antibodies. Journal of Clinical Virology; 43(2):137-41. DOI:10.1016/j.jcv.2008.05.011.
28. Dannemann, B. R., W. C. Vaughan, P. Thulliez, and J. S. Remington. (1990): Differential agglutination test for the diagnosis of recently acquired infection with *Toxoplasma gondii*. J. Clin. Microbiol. 28:1928-1933.
29. Davide Abate, Alda Saldan, Carlo Mengoli, Marta Fiscon, Cristina Silvestre, Loredana Fallico, Marta Peracchi, Lucrezia Furian, Riccardo Cusinato, Luciana Bonfante, Barbara Rossi, Francesco Marchini, Dino Sgarabotto, Paolo Rigotti, and Giorgio Palù. (2013): Comparison of Cytomegalovirus (CMV) Enzyme-Linked Immunosorbent Spot and CMV Quantiferon Gamma Interferon-Releasing Assays in Assessing Risk of CMV Infection in Kidney Transplant Recipients. J. Clin. Microbiol; 51:8 2501-2507.
30. DIESSE Diagnostica manual. (2011). CHORUS Trio Operating Manual CHORUS Cytomegalovirus IgM. REF 81011.
31. DIESSE Diagnostica manual. (2011). CHORUS Trio Operating Manual CHORUS Toxoplasma IgM. REF 81041.
32. Drew WL. (2007). Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infection and disease in immunocompromised patients. *Current opinion in infectious diseases* 20(4)**:**408-411.
33. Dubey, JP; Ferreira, LR; Martins, J; Jones, JL (2011 Oct). "Sporulation and survival of Toxoplasma *gondii* oocysts in different types of commercial cat litter". *The Journal of parasitology* 97 (5): 751–4.
34. Duff P. A (2007): Thoughtful algorithm for the accurate diagnosis of primary CMV infection in pregnancy. Am J Obstet Gynecol;196:196-197.
35. Edvinsson, B., M. Lappalainen, and B. Evengård. (2006). Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. Clin. Microbiol. Infect. 12:131-136.
36. EUROIMMUN AG manual (2011). Anti-CMV ELISA (IgM) EI 2570-9601 M.
37. EUROIMMUN AG manual (2011). Anti-T.gondii ELISA (IgM) EI 2410-9601 M.
38. F. Leslé, F. Touafek, A. Fekkar, D. Mazier, L. Paris. (Oct 2011). Discrepancies between a new highly sensitive *Toxoplasma gondii* ELISA

assay and other reagents: interest of Toxo IgG Western blot. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases; Volume 30, Issue 10, pp 1207-1212.

39. F. Vlaspolder, P. Singer, and R. J. A. Diepersloot (May 2001). Comparison of Immulite with Vidas for Detection of Infection in a Low-Prevalence Population of Pregnant Women in The Netherlands. Clin Diagn Lab Immunol; 8(3): 552-555.

40. Fekkar, A., B. Bodaghi, F. Touafek, P. Le Hoang, D. Mazier, and L. Paris. (2008). Comparison of immunoblotting, calculation of the Goldmann-Witmer coefficient, and real-time PCR using aqueous humor samples for diagnosis of ocular toxoplasmosis. J. Clin. Microbiol. 46:1965-1967.

41. Fernando de Oryl, Maria Eulalia Guisasola, Juan Carlos Sanz and Isabel Garcia-Berjemo. (Mar 2011). Evaluation of Four Commercial Systems for the Diagnosis of Epstein-Barr Virus Primary Infections. Clin Vaccine Immunol; vol. 18, no 3, 444-448.

42. Florence Robert-Gangneux and Marie-Laure Dardé (July 2012). Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev; 25(2): 264-296.

43. Flori P., Chene G., Varlet M. N., Sung R. T. 2009. Toxoplasma gondii serology in pregnant woman: characteristics and pitfalls. Ann. Biol. Clin. (Paris) 67:125–133.

44. Flori, P., Bellete, B., Crampe, C., Maudry, A., Patural, H., Chauleur, C., Hafid, J., Raberin, H. & Tran Manh Sung, R. (2008). A technique for dating toxoplasmosis in pregnancy and comparison with the VIDAS anti-toxoplasma IgG avidity test. *Clin Microbiol Infect* 14, 242–249.

45. G. B. Wisdom. (1976). Enzyme Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243.

46. Genser B, Truschnik-Wilders M, Stunzner D, et al. (2001): Evaluation of Five Commercial Enzyme Immunoassays for the Detection of Human Cytomegalovirus-Specific IgM Antibodies in the Absence of a Commercially Available Gold Standart. Clin Chem Lab Med;39(1): 62-70.

47. Gentile M[1], Galli C, Pagnotti P, Di Marco P, Tzantzoglou S, Bellomi F, Ferreri ML, Selvaggi C, Antonelli G. (Aug 2009). Measurement of the sensitivity of different commercial assays in the diagnosis of CMV infection in pregnancy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis.;28(8):977-81. doi: 10.1007/s10096-009-0738-0.

48. Gorgievski-Hrisoho, M., D. Germann, and L. Matter. (1996). Diagnostic implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*. J. Clin. Microbiol. 34:1506-1511.

49. Guenael Freire de Souza[a], Darlene Carvalho[a], William Pedrosa[a], Jacqueline Franck[b], Renaud Piarroux[b]. (November–December 2012). Analytical validation of anti-toxoplasma IgG immunoassays. The Brazilian Journal of

Infectious Diseases; Volume 16, Issue 6, Pages 574–576. http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2012.07.014

50. Guerra B, Simonazzi G, Banfi A, et al. (2007): Impact of diagnostic and confirmatory tests and prenatal counseling on the rate of pregnancy termination among women with positive cytomegalovirus immunoglobulin M antibody titers. Am J Obstet Gynecol;196:221-223.
51. Hierl, T., U. Reischl, P. Lang, H. Hebart, M. Stark, P. Kyme, and I. Autenrieth. (2004). Preliminary evaluation of one conventional nested and two real-time PCR assays for the detection of *Toxoplasma gondii* in immunocompromised patients. J. Med. Microbiol. 53:629-632.
52. Ho M. (2008). The history of cytomegalovirus and its diseases. *Medical microbiology and immunology* , **197**(2)**:**65-73.
53. Hohlfeld, P., F. Daffos, J. M. Costa, P. Thulliez, F. Forestier, and M. Vidaud. (1994). Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase chain reaction test on amniotic fluid. N. Engl. J. Med. 331:695-699.
54. J A Brandt, J D Kettering, and J E Lewis (1984). Immunity to human cytomegalovirus measured and compared by complement fixation, indirect fluorescent antibody, indirect hemagglutination and enzyme linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol; 19(2): 147–152.
55. J C Booth, G Hannington, T M Bakir, H Stern, H Kangro, P D Griffiths, and R B Heath (1982). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, radioimmunoassay, complement fixation, anticomplement immunofluorescence and passive haemagglutination techniques for detecting cytomegalovirus IgG antibody. J Clin Pathol; 35(12): 1345–1348.
56. Jean-Benjamin Murat, Céline Dard, Hélène Fricker Hidalgo, Marie-Laure Dardé, Marie-Pierre, Brenier-Pinchart and Hervé Pelloux (Aug 2013). Comparison of the Vidas system and two recent fully automated assays for diagnosis and follow up of toxoplasmosis in pregnant woman and newborn. Clin Vaccine Immunol; 20(8): 1203–1212.
57. Jose G. Montoya, Oliver Liesenfeld and Jack S. Remington. (2002 Jul).VIDAS Test for Avidity of *Toxoplasma*-Specific Immunoglobulin G for Confirmatory Testing of Pregnant Women. Journal of clinical microbiology; 40:7 pg 2504-8.
58. K Lagrou, M Bodeus, M Van Ranst, P Goubau. (2009). Evaluation of the new architect cytomegalovirus immunoglobulin M (IgM), IgG, and IgG avidity assays. Journal of clinical microbiology; 47(6):1695-9. DOI:10.1128/JCM.02172-08.
59. Kaiser, K., A. M. Van Loon, H. Pelloux, J. Ferrandiz, S. Picot, P. Wallace, and F. Peyron. (2007). Multicenter proficiency study for detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid by nucleic acid amplification methods. Clin. Chim Acta 375:99-103.

60. Kenneson, A. and Cannon, M. J. (2007). Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (cmv) infection. Reviews in Medical Virology, 17(4):253–276.

61. Kodym P, Machala L, Rohácová H, Sirocká B, Malý M. (2007).Evaluation of a commercial IgE ELISA in comparison with IgA and IgM ELISAs, IgG avidity assay and complement fixation for the diagnosis of acute toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 13(1), 40–47.

62. L. Grangeot-Keros, C. Vauloup-Fellous. (2012 Mar-Apr): A comparative analysis on five different fully automated anti-Rubella IgG immunoassays reporting results in IU/mL. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, London; Poster P997.

63. Lanari M, Lazzarotto T, Venturi V, Papa I, Gabrielli L, Guerra B, et al. (2006): Neonatal citomegalovirus blood load and risk of sequele in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. Pediatric ;117:76-83.

64. Lazzarato T, Gabrielli L, Lanari M, et al. (2004): Congenital Cytomegalovirus Infection: Recent Advances in the Diagnosis of Maternal Infection. Hum Immunol; 65:410-415.

65. Lazzarotto T[1], Guerra B, Lanari M, Gabrielli L, Landini MP. (Mar 2008). New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. J Clin Virol.;41(3):192-7.

66. Leung J, Cannon MJ, Grosse SD, Bialek SR. (2012, Dec): Laboratory testing for cytomegalovirus among pregnant women in the United States: a retrospective study using administrative claims data. BMC Infect Dis; 12:334.

67. Ljungman P. (2004): Risk of cytomegalovirus transmission by blood products to immunocompromised patients and means for reduction. Brit J Haematol;125:107-116.

68. M Wilson, J S Remington, C Clavet, G Varney, C Press and D Ware (1997). Evaluation of six commercial kits for detection of human immunoglobulin M antibodies to Toxoplasma gondii. The FDA Toxoplasmosis Ad Hoc Working Group. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35(12):3112.

69. M. J. Binnicker and M. E. Espy. (November 2013): Comparison of Six Real-Time PCR Assays for Qualitative Detection of Cytomegalovirus in Clinical Specimens. J. Clin. Microbiol; 51:11 3749-3752.

70. M.Grazia Revello[1], Elena Percivalle[1], Marco Zannino[2], Valdano Rossi[2], Giuseppe Gerna (December 1991). Development and evaluation of a capture ELISA for IgM antibody to the human cytomegalovirus major DNA binding protein Journal of Virological Methods Volume 35, Issue 3, Pages 315–329.

71. Maria Grazia Revello and Giuseppe Gerna (2002). Diagnosis and Management of Human Cytomegalovirus Infection in the Mother, Fetus, and Newborn Infant. **doi:** 10.1128/CMR.15.4.680-715**.** Clin. Microbiol. Rev. vol. 15 no. 4 680-715.

72. Meek, B., T. van Gool, H. Gilis, and R. Peek. (2001). Dissecting the IgM antibody response during the acute and latent phase of toxoplasmosis. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 41:131-137.

73. Menotti, J., Y. J. Garin, P. Thulliez, M. C. Serugue, J. Stanislawiak, P. Ribaud, N. de Castro, S. Houze, and F. Derouin. (2010). Evaluation of a new 5'-nuclease real-time PCR assay targeting the *Toxoplasma gondii* AF146527 genomic repeat. Clin. Microbiol. Infect. 16:363-368.

74. Meroni V., Genco F. 2008. Toxoplasmosis in pregnancy: evaluation of diagnostic methods. Parassitologia. 50:51–53.

75. Meropi Nassikas, George Tsaples (May-July, 2013). Epidemiology of Cytomegalovirus 31st International Conference of the System Dynamics Society.

76. Mirela Lika dhe Kristaq Gërxholi. (2004). Imunologjia. ISBN 99927-0-317-2

77. MODULAR ANALYTICS E170, Elecsys 2010 and cobas e analyzers. Roche Diagnostics, Operator's manual, Version1,0. (2011). CMV IgM. REF 04784618.

78. MODULAR ANALYTICS E170, Elecsys 2010 and cobas e analyzers. Roche Diagnostics, Operator's manual, Version1,0. (2011). Toxo IgM. REF 04618858.

79. Mohamed F. Elshal, Ph.D. and J. Philip McCoy, Jr., PhD. (Apr 2006). Multiplex Bead Array Assays: Performance Evaluation and Comparison of Sensitivity to ELISA. Methods (San Diego); 38(4): 317-323.

80. Montoya, J. G., and O. Liesenfeld. 2004. Toxoplasmosis. Lancet 363:1975-1976.

81. Munro. SC, Hall b, Whybin LR, et al. (2005): Diagnosis of and screening for Cytomegalovirus infection in pregnant women. J Clin Microbiol; 65:410-415.

82. Mynyr Koni (2005). Biostatistika. ISBN 99927-845-8-X.

83. Nielsen, H. V., Schmidt, D. R., Petersen, E. (2005). Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis by Two-Dimensional Immunoblot Differentiation of Mother and Child Immunoglobulin G Profiles. *J. Clin. Microbiol.* 43: 711-715

84. O Liesenfeld, C Press, J G Montoya, R Gill, J L Isaac-Renton, K Hedman and J S Remington (1997). False-positive results in immunoglobulin M (IgM) toxoplasma antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test. *J. Clin. Microbiol.* 35(1):174.

85. Ondriska F, Catar G, Vozarova G. (2003): The significance of complement fixation test in clinical diagnosis of toxoplasmosis. Bratisl Lek Listy; 104 (6):189-96.

86. Paolo Maggi1, Anna Volpe1, Valentina Carito1, Nicola Schinaia2, Silva Bino3, Mimoza Basho3, Pietro Dentico1. (2009). Surveillance of toxoplasmosis in pregnant women in Albania. NEW MICROBIOLOGICA, 32, 89-92, 2.

87. Pelloux H., et al. 2006. Detection of anti-toxoplasma IgM in pregnant women. Ann. Biol. Clin. (Paris) 64:95.

88. Peter D Burbelo1[*], Alexandra T Issa1, Kathryn H Ching1, Maurice Exner2, W Lawrence Drew3, Harvey J Alter 4 and Michael J Iadarola1. Highly quantitative serological detection of anti-cytomegalovirus (CMV) antibodies (2009). *Virology Journal* 2009, **6**:45 doi:10.1186/1743-422X-6-45.

89. Pol Carlier, Nawal Harika, Ronald Bailly, Guido Vranken. (2010). Laboratory evaluation of the new Access ® cytomegalovirus immunoglobulin IgM and IgG assays.Journal of clinical virology; 49(3):192-7. DOI:10.1016/j.jcv.2010.07.024.

90. Pol Carlier, Nawal Harika, Ronald Bailly, Guido Vranken. (2010). Laboratory evaluation of the new Access ® cytomegalovirus immunoglobulin IgM and IgG assays. Journal of clinical virology; 49(3): 192-197.

91. Press C, Montoya JG, Remington JS. 2005. Use of a single serum sample for diagnosis of acute toxoplasmosis in pregnant women and other adults. J. Clin. Microbiol. **43**:3481–3483.

92. Prusa AR, Hayde M, Unterasinger L, Pollak A, Herkner KR, Kasper DC. (Dec 2010). Evaluation of the Roche Elecsys Toxo IgG and IgM electrochemiluminescence immunoassay for the detection of gestational Toxoplasma infection. Diagnostic microbiology and infectious disease 68:4 pg 352-7.

93. R. T. Hayden, M. D. Shahbazian, A. Valsamakis, J. Boonyaratanakornkit, L. Cook, X. L. Pang, J. K. Preiksaitis, E. R. Schönbrunner, and A. M. Caliendo. (2013): Multicenter Evaluation of a Commercial Cytomegalovirus Quantitative Standard: Effects of Commutability on Interlaboratory Concordance J. Clin. Microbiol; 51:11 3811-3817.

94. R. Ziegalmaier et al. (1980). ELISA, la Ricerca. Clin. Lab. 10:83

95. Remington JS, Mc Leod R & Desmonts G (2001), Toxoplasmosis, , in J.S. Remington & J.O. Klein (ed.), Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant, 5th ed. W.B. Saunders, Philadelphia, Pa: 205-346.

96. Revello MG, Gerna G. (2002): Diagnosis and Management of Human Cytomegalovirus Infection in the Mother, Fetus and Newborn Infant. Clin Microbiol Rev;15(4):680-715.

97. Revello MG, Gorini G, Gerna G. (2004): Clinical evaluation of a chemiluminescence immunoassay for determination of immunoglobulin G avidity to human cytomegalovirus. Clin Diagn Lab Immunol ;11:801–5.

98. Romand, S., M. Chosson, J. Franck, M. Wallon, F. Kieffer, K. Kaiser, H. Dumon, F. Peyron, P. Thulliez, and S. Picot. (2004). Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*. Am. J. Obstet Gynecol. 190:797-802.

99. Ross SA, Novak Z, Pati S, Boppana SB. (2011): Overview of the diagnosis of cytomegalovirus infection. Infect Disord Drug Targets; 11(5):466-74.

100. Rothe M, Hamprecht K, Lang D, Vornhagen R, Hinderer W, Sonneborn H, et al.(2006): Diagnostic differentiation of primary versus secondary/recurrent infection of human cytomegalovirus by using recombinant gB ELISA. Biotest Bulletin; 6:147-158

101. Seferi, Irena; Xhumari, Pal; Burazeri, Genc. (Oct 2009). Prevalence of cytomegalovirus in paid and unpaid blood donor population in Tirana**.** International Journal of Health Science; Vol. 2 Issue 4, p261-265.

102. Sensini A. 2006. Toxoplasma gondii infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. Clin. Microbiol. Infect. 12:504–512.

103. Seong Ho Park, Jin Mo Goo and Chan-Hee Jo. (2004). Receiver operating characteristic (ROC) curve: practical review for radiologists. Korean J Radiol; 5(1): 11–18.

104. Silvia B, Angelica T, Angelo S, Laura D and Luisa M. (2011): Cytomegalovirus infection in pregnancy. J PrenaT Med; 5(1): 1-8.

105. Stagno S, Ritt B, Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Baker CJ. (2006): Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant, 6th edn. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; pp. 740e–81.

106. Sterkers, Y., E. Varlet-Marie, P. Marty, and P. Bastien et al. (2 November 2009): Diversity and evolution of methods and practices for the molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis in France: a four years survey. Clin. Microbiol. Infect.

107. T. D. Ly, S. Gonzalo. (2012 Mar-Apr): Evaluation of a new chemiluminescent assay for detection of Mycoplasma pneumoniae infections. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, London; Poster P1001.

108. T. Lazzarotto, A. Ripalt and M. P. Landini. (Nov 1998). Development of a New Cytomegalovirus (CMV) Immunoglobulin M (IgM) Immunoblot for Detection of CMV-Specific IgM. J. of Clin Microb. 36(11): 3337-3341.

109. Talabani, H., M. Asseraf, H. Yera, E. Delair, T. Ancelle, P. Thulliez, A. P. Brezin, and J. Dupouy-Camet. (2009). Contributions of immunoblotting, real-time PCR, and the Goldmann-Witmer coefficient to diagnosis of atypical toxoplasmic retinochoroiditis. J. Clin. Microbiol. 47:2131-2135.

110. Tania Crough and Rajiv Khanna. (2009): Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. Clin. Microbiol. Rev; vol 22, no. 1, 76-98.

111. Tara Wahab, Benjamin Edvinsson, Daniel Palm, and Johan Lindh. (February 2010): Comparison of the AF146527 and B1 Repeated Elements, Two Real-Time PCR Targets Used for Detection of *Toxoplasma gondii*. J. Clin. Microbiol. 48:591-592.

112. Thalib L., L. Gras, S. Romand, A. Prusa, M.H. Bessieres, E. Petersen, and R. E. Gilbert. (2005). Prediction of congenital toxoplasmosis by polymerase chain reaction analysis of amniotic fluid. Br. J. Obstet. Gynaecol. 112:567-574.

113. Van Helden J. (2009). Performance of Elecsys toxo IgG and IgM immunoassays. Clinical laboratory; 55:7-8 pg 267-73.

114. Van Helden J., Grangeot-Keros L., Lazzarotto T., Revello M.G., Dickstein Y., Mühlbacher A., Pfaffenrot E., Van der Helm W. (May 2009). Evaluation of fully automated assays for the detection of Cytomegalovirus IgM and IgG antibodies on the Elecsys immunoassays system. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Helsinki, Finland; P1927.

115. Voler, A., J.E. Bidwell, et al. (1985). Manual of clinical immunology. Chapter 69. Rose, N. and Friedman, H. eds. Am. Soc. Microbiol. p.506.

116. Wilson, M., J. S. Remington, C. Clavet, G. Varney, C. Press, D. Ware, and the FDA Toxoplasmosis Ad Hoc Working Group. (1997): Evaluation of six commercial kits for detection of human immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*. J. Clin. Microbiol. 35:3112-3115.

117. Yera, H., D. Filisetti, P. Bastien, T. Ancelle, P. Thulliez, and L. Delhaes. (2009). Multicentre comparative evaluation of five commercial methods for *Toxoplasma* DNA extraction from amniotic fluid. J. Clin. Microbiol. 47:3881-3886.

118. Yinon Y, Farine D, Yudin MH. (2010 Nov): Screening, diagnosis, and management of cytomegalovirus infection in pregnancy. Obstet Gynecol Surv; 65(11):736-43.

119. Yvon Sterkers, Emmanuelle Varlet-Marie, Sophie Cassaing,Marie-Pierre Brenier-Pinchart, Sophie Brun, Frédéric Dalle, Laurence Delhaes, Denis Filisetti, Hervé Pelloux, Hélène Yera, and Patrick Bastien. (2010 Sep): Multicentric Comparative Analytical Performance Study for Molecular Detection of Low Amounts of *Toxoplasma gondii* from Simulated Specimens. Journal of Clinical Microbiology; p. 3216-3222, Vol. 48, No. 9.

PËRMBLEDHJE

Çdo ditë e më tepër vihet re një rritje e sëmundshmërisë nga faktorët infektivë, vendin kryesor mes të cilëve e zenë infeksionet virale dhe bakteriale, mjaft e ndjeshme në nënat shtatëzëna, infektimi i të cilave në tre mujorin e parë sjell probleme për fetusin që është duke u formuar. Për këtë arsye objekti i studimit tonë ishin gratë shtatëzëna dhe infektimi i tyre me *Citomegalovirusin* dhe *Toxoplasma gondii*. Testimi i tyre u realizua vetëm për antitrupat IgM me aparaturat COBAS 6000, MINI-VIDAS, CHORUS dhe ELISA EUROIMMUN. Në tregun e diagnostikës mjekësore, gjithmonë e më tepër hidhen aparatura të reja të cilat tërheqin klientët edhe për shkak të kostos dhe shpejtësisë së diagnostikimit, por që specificiteti dhe ndjeshmëria e tyre janë të ndryshme. Në rastin e infeksioneve të toxoplasmës dhe citomegalovirusit, situata është më e komplikuar për shkak të reaksioneve të kryqëzuara që shfaqin antitrupat kundrejt epitopeve të ngjashme antigjenike. Në këtë studim janë analizuar 400 mostra me teknikat e mësipërme, rezultatet janë përpunuar nga ana statistikore dhe u arrit në përfundimin se teknika më e përshtatshme për diagnostikimin e infeksioneve të toxoplasmës dhe citomegalovirusit në gratë shtatëzëna është ECL në kombinim me teknikën ELISA EUROIMMUN. Ndërsa, aparati CHORUS nuk e arrin një cilësi të tillë dhe nuk rekomandohet për testime të grave shtatëzëna, por rezultatet e tij duhet të verifikohen me teste të tjera alternative si ECL dhe ELISA EUROIMMUN.

Fjalë kyçe: *Ndjeshmëri, specificitet, antitrupa, COBAS 6000, MINI-VIDAS, ELISA EUROIMMUN, ELISA CHORUS.*

ABSTRACT

Nowdays it is noticed an increase in morbidity from infectious factors, among which the principal place is occupied by viral and bacterial infections. This is quite sensitive in pregnant women, whose infection in the first trimester causes malformation of the fetus that is being formed. For this reason the aim of our study were pregnant women and their infection with *Cytomegalovirus* and *Toxoplasma gondii*. Their screening is conducted only for IgM antibodies with Cobas 6000, MINI-VIDAS, CHORUS and ELISA EUROIMMUN instruments. In medical diagnostics market, more and more new devices are added which also attract customers because of the cost and speed of diagnosis, but their specificity and sensitivity differ. This is more complicated in cases of *Toxoplasma gondii* and *Cytomegalovirus* because of cross reactions that exhibit their antibodies against similar antigenic epitopes. In this study, 400 samples were analyzed with the above techniques, the results are statistically processed and it was concluded that the most appropriate techniques for the diagnosis of *Cytomegalovirus* and *Toxoplasma gondii* infections in pregnant women is ECL in combination with ELISA EUROIMMUN technique. While, CHORUS instrument does not reach such quality and is not recommended for screening of pregnant women, so its results should be confirmed with other tests such as ECL and ELISA EUROIMMUN.

Key words: *Sensitivity, specificity, antibodies, COBAS 6000, MINI-VIDAS, ELISA EUROIMMUN, ELISA CHORUS*

LISTA E PUBLIKIMEVE

Në kuadër të këtij studimi janë publikuar 4 artikuj dhe është realizuar pjesëmarrja në 6 konferenca:

Artikuj të botuar:

1. **B. LAZE**, A. MITRE, B. DARDHA. "Krahasimi i Testit të Fiksimit të Komplementit dhe Elektrokemilumineshencës për detektimin e antitrupave të *Citomegalovirusit* dhe *Toxoplasma gondii* në fazën akute të infeksionit". Buletini i Shkencave të Natyrës, Nr 16 (2013): ISSN 2305-882X, fq 139-144.
2. **B. LAZE**, A. MITRE. "Comparison of two fully automated immunoassays: ELISA (CHORUS) and ELFA". International Journal of Ecosystems and Ecology Science, Volume 4 / 1 (2014): ISSN 2224-4980, fq 123-126 (https://sites.google.com/site/injournalofecosystems/template).
3. **B. LAZE**, A. MITRE. "Preliminary evaluation of CHORUS system in comparison with MINI-VIDAS system for detection of Cytomegalovirus-IgM antibodies". International Journal of Research in Applied Natural and Social Sciences, Volume 2, Issue 1 (Janar 2014): ISSN 2321-8851, fq 1-6 (www.impactjournals.us).
4. **B. LAZE,** A. MITRE. "Preliminary evaluation of CHORUS system in comparison with COBAS 6000 system for detection of anti-Toxoplasma IgM antibodies". Journal of International Academic Research for Multidisiplinary; Volume 2, Issue 2 (Mars 2014): ISSN 2320-5083, fq 105-110. A global society for multidisciplinary research (www.jiarm.com)

Konferenca:

1. **B. LAZE**, A. MITRE, B. DARDHA. "Comparison of sensitivity and specificity between CHORUS (ELISA) and IMMUNOFLUORESCENCE test for detection of *Mycoplasma pneumoniae* IgG and IgM antibodies". 3rd International Students Congress for Medical Sciences- KISCOMS III, Struga, Macedonia, 9-13 May, 2012. Abstract book, pg 54-55.
2. **B. LAZE**, A. MITRE, B. DARDHA. "Krahasimi i sensitivitetit dhe specificitetit të dy teknikave imunologjike për detektimin e antitrupave anti-cytomegalovirus dhe anti-toxoplasma". Konferenca shkencore "Fakulteti i Shkencave të Natyrës në 100 vjetorin e pavarësisë", Tiranë, 22-23 Nëntor, 2012. Libri i abstrakteve, fq 25.
3. **B. LAZE**, A. MITRE, B. DARDHA. A comparative analysis on three different fully automated anti-toxoplasma IgM immunoassays. The 1-st International Conference "Research and Education challenges Towards the Future", Shkodër, Albania, 24-25 May 2013. Proceeding book ISBN: 2308-0825, (http://icrae2013.unishk.edu.al/icraecd2013/).
4. **B. LAZE**, A. MITRE, H. MARRA. "Evaluation of Complement Fixation test and Immunofluorescence for detection of *Mycoplasma pneumonia* antibodies". 3rd International Conference of Ecosystems, Tirana, Albania, May 31- June 5, 2013. Abstract book ISBN: 978-9928-4068-6-6, fq 149 dhe Proceeding book ISBN: 978-9928-4068-7-3, fq 864-867.
5. **B. LAZE,** A. MITRE. A comparative analysis on two different fully automated anti-cytomegalovirus IgM immunoassays, (ECL-ELFA). 2nd International

Conference Research and Education in Natural Sciences, Shkodër, Albania, November 15-16 (2013). Proceedings book, volume 1, ISBN: 978-9928-4135-5-0, fq 349-354.

6. **B. LAZE,** A. MITRE. A comparative analysis on two different fully automated anti-cytomegalovirus IgM immunoassays. V International Symposium of Ecologists of the Republic of Montenegro, Tivat, Montenegro, 02-05.10.2013. Abstract book ISBN: 978-86-908743-4-7, fq 28.

PËRMBLEDHJE

Çdo ditë e më tepër vihet re një rritje e sëmundshmërisë nga faktorët infektivë, vendin kryesor mes të cilëve e zenë infeksionet virale dhe bakteriale, mjaft e ndjeshme në nënat shtatëzëna, infektimi i të cilave në tre mujorin e parë sjell probleme për fetusin që është duke u formuar. Për këtë arsye objekti i studimit tonë ishin gratë shtatëzëna dhe infektimi i tyre me Citomegalovirusin dhe Toxoplasma gondii. Testimi i tyre u realizua vetëm për antitrupat IgM me aparaturat COBAS 6000, MINI-VIDAS, CHORUS dhe ELISA EUROIMMUN. Në tregun e diagnostikës mjekësore, gjithmonë e më tepër hidhen aparatura të reja të cilat tërheqin klientët edhe për shkak të kostos dhe shpejtësisë së diagnostikimit, por që specificiteti dhe ndjeshmëria e tyre janë të ndryshme. Në rastin e infeksioneve të toxoplasmës dhe citomegalovirusit, situata është më e komplikuar për shkak të reaksioneve të kryqëzuara që shfaqin antitrupat kundrejt epitopeve të ngjashme antigjenike. Në këtë studim janë analizuar 400 mostra me teknikat e mësipërme, rezultatet janë përpunuar nga ana statistikore dhe u arrit në përfundimin se teknika më e përshtatshme për diagnostikimin e infeksioneve të toxoplasmës dhe citomegalovirusit në gratë shtatëzëna është ECL në kombinim me teknikën ELISA EUROIMMUN. Ndërsa, aparati CHORUS nuk e arrin një cilësi të tillë dhe nuk rekomandohet për testime të grave shtatëzëna, por rezultatet e tij duhet të verifikohen me teste të tjera alternative si ECL dhe ELISA EUROIMMUN.

Fjalë kyçe: Ndjeshmëri, specificitet, antitrupa, COBAS 6000, MINI-VIDAS, ELISA EUROIMMUN, CHORUS.

ABSTRACT

Nowdays it is noticed an increase in morbidity from infectious factors, among which the principal place is occupied by viral and bacterial infections. This is quite sensitive in pregnant women, whose infection in the first trimester causes malformation of the fetus that is being formed. For this reason the aim of our study were pregnant women and their infection with Cytomegalovirus and Toxoplasma gondii. Their screening is conducted only for IgM antibodies with Cobas 6000, MINI-VIDAS, CHORUS and ELISA EUROIMMUN instruments. In medical diagnostics market, more and more new devices are added which also attract customers because of the cost and speed of diagnosis, but their specificity and sensitivity differ. This is more complicated in cases of Toxoplasma gondii and Cytomegalovirus because of cross reactions that exhibit their antibodies against similar antigenic epitopes. In this study, 400 samples were analyzed with the above techniques, the results are statistically processed and it was concluded that the most appropriate techniques for the diagnosis of Cytomegalovirus and Toxoplasma gondii infections in pregnant women is ECL in combination with ELISA EUROIMMUN technique. While, CHORUS instrument does not reach such quality and is not recommended for screening of pregnant women, so its results should be confirmed with other tests such as ECL and ELISA EUROIMMUN.

Key words: Sensitivity, specificity, antibodies, COBAS 6000, MINI-VIDAS, ELISA EUROIMMUN CHORUS