

WYKRYWANIE DNA *TOXOPLASMA GONDII* W ŁOŻYSKU LUDZKIM METODĄ POLIMERAZOWEJ REAKCJI ŁAŃCUCHOWEJ A OCENA HISTOPATOLOGICZNA ŁOŻYSKA W PROCESIE ROZPOZNAWANIA TOKSOPLAZMOZY WRODZONEJ

DOROTA NOWAKOWSKA¹, ELŻBIETA GOŁĄB², EWA CZICHOS³,
MICHAŁ KREKORA¹ I JAN WILCZYŃSKI¹

¹ Klinika Medycyny Matczyno-Płodowej, ICZMP, ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź;

² Zakład Parazytologii Lekarskiej, PZH, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa;

³ Zakład Patomorfologii Klinicznej, ICZMP, ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź

ABSTRACT. Detection of *Toxoplasma gondii* in human placenta by PCR and placental histologic findings. Since isolation of *Toxoplasma gondii* from human placenta strongly correlates with fetal infection, the aims of the study were: to detect fragments of *T. gondii* B1 gene in human placentae by PCR and to evaluate their pathology. 36 placentae included in three groups were obtained: group I (n = 7) from pregnancies with prenatal diagnosis of fetal toxoplasmosis; II (n = 17) from women with serologic features of primary infection during pregnancy; III (n=13) from pregnancies with fetal *T. gondii* infection based on clinical signs. *T. gondii* DNA was found in 2/4 samples from the I group and in 1/14 from the II group. *Villitis* was identified in 3/15 other placentae from the II group. In the III group we did not recognize neither *T. gondii* DNA nor *villitis*. We consider PCR and pathologic evaluations of placentae as the two complementary methods. PCR can be especially helpful in pregnancies not screened against *T. gondii* as positive result in placenta can confirm mother's primary infection.

Key words: congenital toxoplasmosis, histopathology, placenta, PCR.

WSTĘP

Metody wykrywania *Toxoplasma gondii* w łożysku są pomocne w diagnostyce toksoplazmozy wrodzonej, istnieje bowiem ścisła korelacja pomiędzy zarażeniem płodu a izolacją pasożyta (Bessieres i wsp. 2000). Wyizolowanie pasożyta z łożyska potwierdza rozpoznanie pierwotnego zarażenia u kobiet, które nie były monitorowane w trakcie ciąży. W takich przypadkach może być jedynym dowodem matczynej serokonwersji i podstawą do wnikliwych badań noworodka.

Prawdopodobieństwo przezłożyskowej transmisji *T. gondii* i rozwoju infekcji wrodzonej wzrasta w kolejnych trymestrach ciąży, wynosząc odpowiednio 14, 29 i 59%. Przyjmuje się, że przyczyną tego zjawiska jest rozwój i wzrost przepływu krwi przez łożysko (Chatterton 1992). Zarażenie płodu może mieć

miejsce w trakcie parazytemii u matki lub być opóźnione w stosunku do matczynej serokonwersji nawet do 4 miesięcy (Remington i wsp. 1995). Przyjmuje się więc, że placentopatia poprzedza fetopatię (Bessieres 1998).

Według wielośrodkowych badań, leczenie zastosowane w okresie ciąży nie wpływa na ryzyko przezłożyskowej transmisji pasożyta do płodu, istotnie zmniejsza jednak ryzyko odległych następstw choroby (Foulon i wsp. 1999). Stwierdzono, że najważniejszym czynnikiem mającym wpływ na ryzyko zarażenia płodu jest wiek ciążowy, w którym doszło do inwazji *T. gondii* (Foulon i wsp. 1999). Istotne znaczenie ma także nasilenie matczynej parazytemii oraz pasaż pasożyta przez barierę łożyskową (Bessieres 1998). Odsetek izolacji pierwotniaka z łożyska wzrasta wraz z długością trwania ciąży (Remington i wsp. 1995). Z drugiej strony, u leczonych ciężarnych stwierdzano niższy odsetek izolacji pasożyta z łożysk, w porównaniu z grupą kobiet z pierwotnym zarażeniem *T. gondii* w ciąży, u których nie zastosowano terapii farmakologicznej (Remington i wsp. 1995).

Badanie histopatologiczne rzadko umożliwia bezpośrednie wykrycie cyst *T. gondii*, znacznie częściej pozwala jednak na stwierdzenie cech zapalenia popłodu w przypadkach podejrzewanych o inwazję (Remington i wsp. 1995). Zastosowanie metody PCR celem identyfikacji fragmentu genomu *T. gondii* w badanym łożysku, umożliwia szybkie określenie czynnika etiologicznego zarażenia.

Celem pracy było wykrycie inwazji *T. gondii* łożysk ludzkich metodą polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR) oraz ocena zmian histopatologicznych w łożyskach, pobranych w trakcie porodów noworodków z toksoplazmozą wrodzoną, pochodzących od ciężarnych z cechami pierwotnej toksoplazmozy, u których nie wykryto zarażenia płodu oraz uzyskanych w przypadkach podejrzenia toksoplazmozy wrodzonej u płodu, wyłącznie na podstawie objawów klinicznych. W pracy dokonano próby porównania wartości diagnostycznej obu metod.

MATERIAŁ I METODY

Badaniem objęto 36 łożysk pobranych podczas porodu od kobiet hospitalizowanych w Klinice Medycyny Matczyno-Płodowej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki (ICZMP) w Łodzi w latach 1999–2001.

Zbadano 7 łożysk (grupa I) pochodzących z porodów noworodków, u których zarażenie *T. gondii* *in utero* potwierdzono za pomocą: (1) prenatalnych badań płynu owodniowego lub/i płynu mózgowo-rdzeniowego metodą PCR lub/i próby biologicznej; (2) lub/oraz postnatalnych badań serologicznych i klinicznych noworodków.

Siedemnaście łożysk (grupa II) uzyskano od rodzających, które w trakcie ciąży wykazywały serologiczne cechy pierwotnej toksoplazmozy tj. znamienne przyrost miana przeciwciał IgG anty-*T. gondii* między kolejnymi badaniami,

niską awidność IgG, obecność swoistych immunoglobulin klasy M i/lub A w surowicy krwi matki.

Pozostałe 12 łożysk (grupa III) pobrano w przypadkach podejrzenia toksoplazmozy wrodzonej u płodu w oparciu o objawy kliniczne, tj. wodogłowie wrodzone u płodu ($n = 9$), obrzęk uogólniony płodu ($n = 3$), obumarcie wewnątrzmaciczne płodu ($n = 1$). U żadnego z noworodków w tej grupie, w surowicy krwi nie wykryto swoistych immunoglobulin klasy M i/lub A.

Diagnostyka parazytologiczna została przeprowadzona w Zakładzie Parazytologii Lekarskiej PZH w Warszawie. Oceny histopatologicznej łożysk dokonano w Zakładzie Patomorfologii Klinicznej ICZMP w Łodzi.

Badanie histopatologiczne 34 z 36 analizowanych łożysk (w grupie I – 7/7; II – 15/17; III – 12/12) obejmowało ocenę makroskopową i mikroskopową. Fragmentów genu B1 *T. gondii* poszukiwano stosując metodę PCR w 28 próbkach łożysk (w grupie I – 4/7; II – 14/17; III – 10/12).

Metoda PCR. Próbkę łożyska o masie 12–20 g miksowano, a następnie trawiono w 0,15% roztworze pepsyny HCl o pH 1,5 w temp. 37°C przez 1 godzinę. Mieszaninę uzyskaną po trawieniu sączono przez gazę młyńską i wirowano przy 5000 × g, a powstały osad płukano trzykrotnie w PBS, a następnie zawieszano w 1 ml H₂O. Tak przygotowany materiał dzielono na próbki o objętości 200 µl i trawiono w roztworze o składzie: 2 mg/ml proteinazy K, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,1 mg/ml żelatyna, 0,5% Tween 20, w temp. 55°C przez 1 godz. Po inaktywacji proteinazy K poprzez ogrzewanie w temp. 95°C w czasie 15 min, próbki wirowano przy 10 000 × g przez 10 min, a powstały supernatant wykorzystywano w reakcji PCR.

W reakcji **nested PCR** wykorzystano startery dla genu B1 *T. gondii* określające fragment zewnętrzny: 5'-GGAACATGCATCCCGTTCATGAG-3' (pozycja 694-714), 5'TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-3' (pozycja 887-868) i startery dla fragmentu wewnętrznego: 5'-TGCATAGGTTGCAGTCACTG-3' (pozycja 757-776), 5'-GGCGACCAATCTGCGAATACACC-3' (pozycja 853-831). Amplifikowano sekwencje DNA o wielkości 191 pz i 96 pz. Po 40 cyklach (94°C przez 1,5 min, 57°C przez 1,5 min, 72°C przez 2 min) 1 µl produktu reakcji PCR poddawano kolejnemu procesowi składającemu się z 35 cykli (94°C przez 1,5 min, 62°C przez 1,5 min, 72°C przez 2 min). Zarówno PCR jak i nested PCR poprzedzano 15 min okresem inkubacji w temp. 95°C wymaganym dla uaktywnienia polimerazy (HotStarTaq™ DNA Polymerase). Wyniki reakcji odczytywano w świetle UV po przeprowadzeniu elektroforezy w 2% żelu agarozowym.

Ocena histopatologiczna. Przez całą grubość łożyska prowadzono równoległe przekroje uzyskując pasy tkankowe grubości około 1 cm. Zmiany makroskopowe oceniano na przekrojach każdego pasa.

Do badań histopatologicznych pobierano wycinki z wyżej opisanych pasów tkankowych, przez całą grubość łożyska: jeden z okolicy pod nasadą pępowiny,

po jednym z obwodów łożyska, po dwa – ze środków pasów. Ponadto pobierano dodatkowe wycinki ze stwierdzonych makroskopowo zmian patologicznych. Uzyskane wycinki opracowywano w sposób standardowy.

Jakościowa ocena mikroskopowa łożyska sprowadzała się do określenia stopnia zmian zapalnych, dojrzałości kosmków, nasilenia zmian zwyrodnieniowych (obfitość włókniaka międzykosmkowego) i zaburzeń w krążeniu, a także do potwierdzenia charakteru patologii stwierdzanych zmian makroskopowych. Szczególną uwagę zwracano na obecność morfologicznych wykładników zapalenia w kosmkach (*villitis*), pod postacią nacieków złożonych z komórek jednojądrowych w zazwyczaj obrzękniętym i/lub zwłókniałym zrębie kosmków. Każdorazowo brano pod uwagę możliwość obecności cyst *T. gondii* w łożysku.

WYNIKI

Zastosowane metody diagnostyczne pozwoliły na wykrycie DNA *T. gondii* w 10,7% (3/28) fragmenów łożysk oraz na stwierdzenie w 8,8% (3/34) z nich cech zapalenia kosmków (*villitis*), z obecnością nacieków limfocytarnych i włóknieniem kosmków. Obecności DNA *T. gondii* w łożyskach nie towarzyszyły cechy zapalenia kosmków, podobnie w przypadkach *villitis* nie wykryto fragmentów DNA pasożyta. Szczegółowe dane przedstawiono w Tabeli 1.

W żadnym ze zbadanych fragmentów łożysk nie wykryto cyst *T. gondii*. Wśród wszystkich łożysk 29,4% (10/34) wykazywało prawidłową budowę histopatologiczną.

DNA *T. gondii* wykryto w 50% (2/4) fragmentów łożysk pochodzących od płodów zarażonych *in utero* (grupa I). W ocenie histopatologicznej tych łożysk nie wykazano obecności typowych zmian zapalnych. W jednym przypadku odnotowano zwapnienia.

Cech zapalenia kosmków (*villitis*) nie stwierdzono w grupie I łożysk pobranych w trakcie porodów noworodków, u których wewnątrzmaciczne zarażenie *T. gondii* potwierdzono za pomocą badań prenatalnych lub/ oraz postnatalnych badań serologicznych i klinicznych. W 28,6% (2/7) łożysk z tej grupy wykryto ogniskowe zwapnienia, w 28,6% (2/7) obrzęk kosmków, któremu w jednym przypadku (14,3%) towarzyszyło ich włóknienie (1/7). Prawidłową budowę histopatologiczną stwierdzono w 28,6% (2/7) próbek łożysk.

W grupie II łożysk uzyskanych od rodzących z serologicznymi cechami pierwotnej toksoplazmozy w trakcie ciąży, DNA *T. gondii* wykryto w jednym z nich (1/14). Łożysko, z którego pobrano próbkę miało prawidłową budowę histopatologiczną.

Wszystkie przypadki zapalenia kosmków występowały w grupie II. Łącznie, 20% (3/15) łożysk z tej grupy cechowały nacieki limfocytarne z włóknieniem kosmków oraz w jednym przypadku liczne zwapnienia. We fragmentach łożysk z cechami *villitis* nie stwierdzono obrzęku kosmków.

Tabela 1. Ocena łożyska za pomocą PCR i badania histopatologicznego, w trzech badanych grupach kobiet: I – potwierdzoną toksoplazmozą wrodzoną u płodu lub noworodka; II – serologicznymi cechami pierwotnej inwazji *T. gondii* w ciąży; III – klinicznym podejrzeniem toksoplazmozy u płodu

Grupa	Nr	PCR	Ocena histopatologiczna łożysk										
			<i>villitis</i>	Inne zmiany makro- i mikroskopowe									
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	
I n = 7	1	 dodatni											
	2	ujemny											
	3	 dodatni											
	4	nie badano											
	5	ujemny											
	6	nie badano											
	7	nie badano		+									
II n = 17	8	ujemny											
	9	ujemny											
	10	ujemny		+									
	11	ujemny		++									
	12	ujemny	++	++									
	13	 dodatni											
	14	ujemny	++	++									
	15	ujemny											
	16	ujemny											
	17	ujemny											
	18	nie badano											
	19	ujemny											
	20	ujemny											
	21	ujemny											
	22	ujemny	+										
	23	nie badano		++									
	24	nie badano		++									
III n = 12	25	ujemny		+									
	26	ujemny		++									
	27	ujemny		+	+								
	28	ujemny											
	29	ujemny											
	30	ujemny											
	31	ujemny											
	32	ujemny		++									
	33	ujemny											
	34	ujemny											
	35	nie badano											
	36	nie badano											

Zmiany makro- i mikroskopowe łożyska: 1 – złoży włóknika, 2 – wylewy krwi, 3 – zawały, 4 – zwapnienia, 5 – włóknienie kosmków, 6 – obrzęk zrębu kosmków, 7 – mikrozawały kosmków, 8 – zastój krwi w przestrzeni międzykosmkowej, 9 – zaburzenia dojrzewania autonomicznego unaczynienia kosmków. + – niewielki stopień nasilenia, ++ – znaczny stopień nasilenia, puste pole – brak zmian.

Razem w grupie II w 40% łożysk stwierdzono liczne złoży włóknika w przestrzeni międzykosmkowej, w 40% zwapnienia często, o dużym stopniu nasilenia, w 46,7% zastój krwi w przestrzeni międzykosmkowej, w 26,7% mikrozawały kosmków, w 20% włóknienie kosmków, a w 13,3% ich obrzęk. Prawidłową budowę histopatologiczną w tej grupie wykazywało 20% (3/15) zbadanych łożysk.

W łożyskach zaliczonych do grupy III ($n = 12$), pobranych w przypadkach podejrzenia toksoplazmozy wrodzonej u płodu w oparciu o objawy kliniczne, nie wykryto DNA *T. gondii* oraz nie stwierdzono cech zapalenia kosmków w badaniu histopatologicznym. Budowę w 41,7% (5/12) z tych łożysk opisano jako prawidłową, w pozostałych fragmentach stwierdzano głównie obrzęk kosmków (71,4%), złoży włóknika (33,3%) i mikrozawały (33,3%).

DYSKUSJA

Zastosowanie metody PCR dla wykrycia fragmentów genomu *T. gondii* w łożysku, może umożliwić szybką identyfikację czynnika etiologicznego zarażenia. We Francji, w specjalistycznych laboratoriach zajmujących się diagnostyką toksoplazmozy wrodzonej, badanie łożyska metodą PCR poparte jest dodatkowo wykonaniem próby biologicznej (Bessieres 1998).

Opublikowane w 1991 roku wskazania do badania popłodu (Kaplan i wsp. 1991) oraz opracowane w ICZMP wytyczne, uwzględniają konieczność oceny popłodu u wszystkich ciężarnych z cechami pierwotnej toksoplazmozy.

W badaniach własnych, metodę PCR dla wykrycia fragmentów DNA *T. gondii* uzupełniono oceną makro- i mikroskopową łożysk. Podjęto także próbę porównania wartości diagnostycznej obu metod i ich roli na etapie wczesnej pourodzeniowej diagnostyki wrodzonej toksoplazmozy.

Łožysko pochodzące zarówno z porodu fizjologicznego jak z ciąży powikłanej, charakteryzuje się polimorfizmem zmian. Do często spotykanych cech łożysk fizjologicznych należą zmiany naczyniowe i ich następstwa, nasilenie zmian wstecznych i rozrostowych trofoblastu, zakrzepica międzykosmkowa, nadmierne odkładanie się włóknika i zwapnienia. Zmiany te często stwierdzano również w materiale własnym. Ponadto dla odróżnienia stanów patologii położniczych, istotne znaczenie ma nie tylko stwierdzenie którejkolwiek ze zmian wyłącznie jakościowo lecz ich ocena ilościowa (Driscoll i Langston 1991, Kaplan i wsp. 1991).

Zarażenie *T. gondii* jest przyczyną swoistego zapalenia przewlekłego łożyska, tzw. *chronic placentitis* (Redline 2002), rozprzestrzenia się ono bowiem drogą krwiopochodną od strony płyty podstawowej i dotyczy samej kosmkówki (Michałkiewicz i wsp. 1973, Remington i wsp. 2001). W pozostałych elementach strukturalnych łożyska spotykane jest wyjątkowo rzadko.

Na podstawowy obraz przewlekłego zapalenia łożyska w przebiegu toksoplazmozy składa się zapalenie kosmków z zatarciem ich struktury, włók-

nieniem lub/i obecnością zwapnień (Redline 2002). W badaniu mikroskopowym obok częstych zmian włóknistych występują zlepy zmienionych kosmków z obecnością nacieków zapalnych, składających się głównie z limfocytów i innych komórek jednojądrowych (Michałkiewicz i wsp. 1973, Benirschke i Driscoll 1967). Zmiany zapalne łożyska w zarażeniu *T. gondii* występujące w całym łożysku, tzw. *panplacentitis* (Redline 2002), nie mają jednorodnego charakteru. Rzadko stwierdza się zmiany makroskopowe, chociaż opisano obrzęk łożyska towarzyszący zarażeniu płodów wykazujących kliniczne cechy obrzęku uogólnionego (Remington i wsp. 2001). W takich przypadkach, w badaniu mikroskopowym przeważają obrzękowe kosmki z bogatokomórkowym podścieliskiem (Michałkiewicz i wsp. 1973).

Zastosowanie polimerazowej reakcji łańcuchowej do badania łożyska w procesie rozpoznawania toksoplazmozy wrodzonej może dostarczać cennych informacji. Wobec braku screeningu serologicznego w kierunku zarażenia *T. gondii* u ciężarnych, pozytywny wynik badania łożyska metodą PCR, już po upływie 24 godzin może stanowić potwierdzenie zarażenia w trakcie trwania ciąży. Negatywny wynik badania łożyska metodą PCR nie wyklucza jednak wrodzonej toksoplazmozy u noworodka, dlatego każde dziecko matki z serologicznymi cechami pierwotnej inwazji pasożytniczej w ciąży, powinno być objęte opieką zespołu specjalistów.

Analiza własnych wyników potwierdza to spostrzeżenie, bowiem w badaniu dwóch łożysk z porodów noworodków zarażonych *in utero*, u których postnatalnie potwierdzono toksoplazmozę wrodzoną, nie wykryto DNA pasożyta. Warto podkreślić, że w żadnym z łożysk, pochodzących z ciąży, w trakcie której doszło do transmisji dopłodowej pasożyta, nie stwierdzono cech zapalenia kosmków, co więcej w dwóch przypadkach budowę łożyska określono jako prawidłową, nawet wtedy gdy wynik PCR był pozytywny. W oparciu o te obserwacje stwierdzić należy, że nawet w przypadku skojarzenia metody PCR i oceny histopatologicznej negatywny wynik badania (brak DNA *T. gondii* lub/i *villitis*) nie wyklucza zarażenia łożyska.

Chociaż w naszej pracy grupa łożysk pochodzących od zarażonych *in utero* płodów była nieliczna, aż w połowie z nich wykryto DNA pasożyta. W doświadczeniach Bessieres i wsp. (2001), w diagnostyce wrodzonej toksoplazmozy, czułość izolacji *T. gondii* z łożysk wyniosła 60%, a Robert-Gangneux i wsp. (1999), badając łożyska pochodzące z porodów zarażonych noworodków osiągnęli czułość 50% zarówno dla metody PCR jak i dla próby biologicznej.

Zastosowanie PCR jako jedynej metody do oceny łożyska jest obciążone błędem wynikającym z wykorzystania tylko niewielkiego fragmentu tego narządu. Jednakże wykazano, że wprowadzenie tej metody PCR do badania łożyska zwiększa szanse rozpoznania zarażenia noworodka. W 3 z 33 przypadków dzieci zarażonych *in utero*, wykrycie DNA *T. gondii* w łożyskach było jedynym argumentem wskazującym na możliwość inwazji wrodzonej (Fricker-Hidalgo i wsp. 1998). Również w badaniach Bessieres i wsp. (2001) w 18%

przypadków wrodzonej toksoplazmozy, tylko wyizolowanie pasożyta z łożyska sugerowało możliwe zarażenie *in utero*.

W badaniach własnych DNA pasożyta wykryto także w jednym z łożysk pobranych od kobiet z serologicznymi cechami pierwotnej toksoplazmozy w ciąży, u których prenatalnie oraz w oparciu o badanie serologiczne noworodka nie stwierdzono inwazji wrodzonej. Ponadto wszystkie przypadki zapalenia kosmków rozpoznano we fragmentach innych łożysk z tej grupy. Może to wskazywać na istnienie bariery łożyskowej utrudniającej transmisję pasożyta do płodu i ograniczającej proces chorobowy wyłącznie do tego narządu (Bessieres i wsp. 2001). Przed „erą diagnostyki prenatalnej”, spotykane zmiany histopatologiczne w płodzie dopiero w powiązaniu z danymi klinicznymi noworodka przyjmowano jako wykładnik zarażenia *in utero* (Michałkiewicz i wsp. 1973). Przedstawione badania są tylko jednym z elementów diagnostyki toksoplazmozy wrodzonej, a negatywny wynik nie wyklucza zarażenia *in utero*. Bez znajomości wyników badań serologicznych noworodka oraz dziecka podczas pierwszego roku życia nie można z całą pewnością stwierdzić, że w grupie II badaliśmy próbki łożysk pochodzące z ciąży, w których nie doszło do wewnątrzmacicznego zarażenia płodu. Kwalifikacja kobiet do tej grupy oparta była na wynikach dostępnych badań serologicznych.

W grupie łożysk pochodzących z ciąży, w których u płodów podejrzewano w oparciu o objawy kliniczne toksoplazmozę wrodzoną, nie wykryto DNA *T. gondii* oraz nie stwierdzono zapalenia kosmków. Ewentualne wystąpienie *villitis* w tej grupie nie powinno jednak dziwić, bowiem izolowane wodogłowie, obrzęk uogólniony, czy obumarcie wewnątrzmaciczne płodu często wiążą się z zakażeniami płodu o innej etiologii.

Wyniki własne wskazują, że zastosowanie metody PCR i ocena histopatologiczna łożyska stanowią uzupełniające się metody diagnostyczne. Obie mogą dostarczać klinicyście istotnych informacji, szczególnie w przypadkach kobiet nieobjętych badaniami serologicznymi w czasie ciąży, u których podejrzewamy zarażenie płodu.

LITERATURA

- Benirschke K., Kaufmann P. 1995. Pathology of the human placenta, 3rd Edition, Springer – Verlag, 537–623.
- Bessieres M.H. 1998. La Toxoplasmose. Dans: *Infectiologie, Tome V, Collection le Moniteur Internat*, Groupe Liasons S.A., 427–446.
- Bessieres M.H., Berrebi A., Roques C., Cassaing S., Bloom M.C., Rolland M. 2000. Toxoplasmose et grossesse, Dans: *Maladies Infectieuses Courantes à Transmission Materno-Foetale* (Eds: A. Berrebi, C. Assouline and M. Rolland), Group Liasons S.A., 245–286.
- Bessieres M.H., Berrebi A., Rolland M., Bloom M.C., Roques C., Cassaing S., Courjault C., Seguela J.P. 2001. Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests. *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology* 94: 37–45.

- Chatterton J.M.W. 1992. Pregnancy. In: *Human Toxoplasmosis* (Eds. D.O. Ho-Yen and A.W.L. Joss), Oxford University Press, 144–183.
- Driscoll S.G., Langston C. 1991. College of American Pathologists Conference XIX on the Examination of the Placenta: Report of the Working Group on Methods for Placental Examination. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 115: 704–708.
- Foulon W., Villena I., Stray-Pedersen B., Decoster A., Lappalainen M., Pinon J.M., Jenum P.A., Hedman K., Naessens A. 1999. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 180: 410–415.
- Fricke-Hidalgo H., Pelloux H., Racinet C., Grefenstette I., Bost-Bru C., Goullier-Fleuret A., Ambroise-Thomas P. 1998. Detection of *Toxoplasma gondii* in 94 placentae from infected women by polymerase chain reaction, *in vivo*, and *in vitro* cultures. *Placenta* 19: 545–549.
- Kaplan C., Lowell D. M., Salafia C. 1991. College of American Pathologists Conference XIX on Examination of the Placenta: Report of the Working Group on the Definition of Structural Changes Associated With Abnormal Function in the Maternal/Fetal/Placental Unit in the Second and Third Trimester. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 115: 709–716.
- Michałkiewicz W., Bręborowicz H., Pisarski T. 1973. Histoklinika Poptodu, PZWL, Warszawa.
- Redline R.W. 2002. Placental Pathology In: *Neonatal-Perinatal Medicine* (Eds: A.A. Fanaroff and R.J. Martin) Vol I, 7th Edition, Mosby Inc. London, 393–402.
- Remington J.S., McLeod R., Desmonts G. 1995. Toxoplasmosis, In: *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. (Eds. J.S. Remington. and J.O. Klein) 4th Ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 140–243.
- Remington J.S., McLeod R., Thulliez P., Desmonts G. 2001. Toxoplasmosis, In: *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. (Eds. J.S. Remington and J.O. Klein) 5th Ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 207–320.
- Robert-Gangneux F., Gavinet M.F., Ancelle T., Raymond J., Tourte-Schaefer C., Dupouy-Camet J. 1999. Value of prenatal diagnosis and early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: retrospective study of 110 cases. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 2893–2898.