

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Марија Ж. Вујанић

МОЛЕКУЛАРНА ДЕТЕКЦИЈА  
И ГЕНОТИПИЗАЦИЈА СОЈЕВА  
ПАРАЗИТА *Toxoplasma gondii*  
ИЗОЛОВАНИХ У СРБИЈИ

докторска дисертација

Београд, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Marija Ž. Vujanić

MOLECULAR DETECTION AND  
GENOTYPING OF *Toxoplasma gondii*  
STRAINS ISOLATED IN SERBIA

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

**МЕНТОРИ:**

**Др Владимир Ивовић**, виши научни сарадник

Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду

**Др Душанка Савић Павићевић**, ванредни професор

Биолошки факултет, Универзитет у Београду

**ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ ЗА ОДБРАНУ:**

**Др Олгица Ђурковић-Ђаковић**, научни саветник

Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду

Датум одбране: \_\_\_\_\_

Ова докторска дисертација је у целини урађена у Националној референтној лабораторији за токсоплазмозу ИНСТИТУТА ЗА МЕДИЦИНСКА ИСТРАЖИВАЊА Универзитета у Београду, у оквиру пројеката Министарства просвете и науке Републике Србије: *Инфекције интрацелуларним микроорганизмима растућег значаја трансмисија, однос патоген-домаћин, молекуларна епидемиологија и клинички значај* (ОИ145002) и *Контрола инфекције Апикомплексним патогенима: од нових места деловања лека до предикције* (ИИИ41019), којима је руководила / руководи Др Олгица Ђурковић-Ђаковић, научни саветник.



## ЗАХВАЛНИЦА

Овим путем желим да се захвалим Др Владимиру Ивовићу, вишем научном сараднику, на пруженом знању, великом пријатељству, несебичној подршци и стрпљењу у току докторских студија и израде ове дисертације.

Посебну захвалност дугујем Др Олгици Ђурковић-Ђаковић, научном саветнику, на пренетом знању, стрпљивом праћењу мога рада и великој подршци у изради ове тезе.

Захваљујем се Проф. Др Душанки Савић-Павићевић на стручној помоћи и корисним сугестијама током финалне израде ове докторске дисертације.

Колегама из лабораторије Др Александри Николић, Др Бранку Бобићу, Др Ксенији Славић, Мр Ивани Клун, Тијани Живковић, Витомиру Ђокићу и Јорданки Ђуровић искрено се захваљујем на стручној помоћи, корисним саветима и пријатељској подршци током израде ове тезе.

На крају, велику захвалност дугујем мојој породици на помоћи, разумевању и љубави коју су ми пружили.

***РЕЗИМЕ***

Молекуларна детекција и генотипизација сојева паразита  
*Toxoplasma gondii* изолованих у Србији

**РЕЗИМЕ**

Токсоплазмоза, обољење које изазива паразит *Toxoplasma gondii*, једна је од најраспрострањенијих зооноза у свету, и процењује се да је чак једна трећина човечанства инфицирана овим паразитом. Иако серолошки тестови представљају примарну методу у рутинској дијагностици токсоплазмозе, интерпретација резултата серолошких анализа у неким клиничким случајевима може бити компликована и дуготрајна, а неретко и недовољно информативна. Због тога је увођење молекуларних метода које иначе одликује велика осетљивост и помоћу којих је могуће добити резултате у кратком временском периоду, од великог значаја за дијагностику токсоплазмозе. Отуда је циљ овог истраживања био увођење молекуларне дијагностике токсоплазмозе по први пут у Србији, као и генотипизација изолованих сојева *T. gondii*.

Овом студијом је обухваћено 160 узорака пореклом од 127 пацијената серолошки суспектних на токсоплазмозу, код којих је присуство *T. gondii* анализирано PCR-ом у реалном времену и биолошким огледом. Показано је да успешност доказивања ДНК *T. gondii* у материјалу хуманог порекла зависи како од типа материјала тако и од укупне запремине материјала од којег се узима узорак. Тако је PCR у реалном времену био позитиван у 30,8% узорака периферне крви, у 33,3% узорака крви из пупчаника, у 35,7% узорака плодних вода, у 57,1% узорака ликвора и у 60% узорака очних водица. У односу на изолацију паразита биолошким огледом, показана је знатно виша стопа детекције ДНК *T. gondii*, и то и у узорцима крви од пацијената суспектних на акутну токсоплазмозу тако и у онима пореклом од фетуса и новорођенчади суспектних на конгениталну токсоплазмозу. Добијени резултати указују пре свега на велики потенцијал и практични значај молекуларне дијагностике као и на потребу увођења ове методе као дела стандардног протокола за дијагностику токсоплазмозе.

*T. gondii* има веома широк спектар домаћина који укључује све топлокрвне животиње, те су у другом делу овог истраживања молекуларне методе за детекцију токсоплазмозе примењене на материјалу животињског порекла, и то конкретно од глодара. Због њихове потенцијално значајне улоге као карике у епидемиолошком ланцу токсоплазмозе у оквиру ове студије испитано је и 156 узорак пореклом од 144 браон пацова (*Rattus norvegicus*) и 12 кућних мишева (*Mus musculus*). ДНК *T. gondii* је детектована у мозгу 10,4% пацова и код чак 83,3% кућних мишева. Релативно висока стопа позитивних налаза код пацова и мишева сакупљених у Београду указује на контаминираност наше средине паразитом *T. gondii* која представља ризик за јавно здравље.

Последњи део овог рада се односи на прва и попуно оригинална филогенетска истраживања популационе структуре *T. gondii*. Наиме, скорашња истраживања у свету указују на постојање клонске популационе структуре коју карактеришу три широко распрострањена главна клонска типа (I, II и III), од којих су типови I и II преобладајући у Европи и Северној Америци. Постоје такође и рекомбинантни и атипични сојеви који су углавном присутни у Јужној Америци и Африци. У овом истраживању одређивање клонског типа, чиме су добијени и први подаци о популационој структури *T. gondii* у Србији, вршено је коришћењем PCR-RFLP методе. Анализирано је укупно 22 узорка и то 19 хуманог порекла и 3 пореклом од пацова. Успешно је генотипизирано пет узорака пореклом од људи, за које се показало да четири припадају типу II а један типу I. Сојеви типа II су изоловани из клиничких узорака болесника са конгениталном токсоплазмозом, токсоплазмозом стеченом у трудноћи и реактивацијом инфекције услед пост-трансплантационе имunosупресије, док је сој типа I изолован из једног узорка пореклом од конгенитално инфицираног новорођенчета. Ови резултати, први за читаво подручје Југоисточне Европе, показују да је и у нашој земљи, као и у већем делу Европе, преобладајући пре свега генотип II.

Кључне речи: *Toxoplasma gondii*, токсоплазмоза, дијагностика, молекуларна детекција, PCR, PCR-RFLP, хумани материјал, глодари, генотипизација, сојеви паразита

Научна област: Паразитологија

Ужа научна област: Молекуларна биологија

УДК број: 577.2: [636.8:593.19]

## ***SUMMARY***

## SUMMARY

Toxoplasmosis, infection caused by the parasite *Toxoplasma gondii*, is one of the most widespread zoonoses in the world and it has been estimated that up to one third of the global human population is infected with this parasite. Although serological tests are the primary method in the routine diagnosis of toxoplasmosis, interpretation of the results can be not only difficult and time-consuming, but they can be inconclusive. Therefore, the introduction of highly sensitive molecular methods, by which results can be obtained within a day, into the diagnosis of toxoplasmosis is of great importance. The aim of this research was the introduction of molecular methods into the diagnosis of toxoplasmosis for the first time in Serbia, as well as genotypization of the isolated *T. gondii* strains.

This study included 160 human biological samples from 127 patients serologically suspected of toxoplasmosis in which the presence of *T. gondii* was analyzed by PCR and by bioassay in mice. It was found that the detection of *T. gondii* DNA in human biological materials depends on the type of sample as well as on the initial volume. Real-time PCR was positive in 30.8% of peripheral blood samples, 33.3% of cord blood samples, 35.7% of amniotic fluid samples, 57.1% of CSF samples and 60% of humor aqueous samples. The detection rate of *T. gondii* by molecular methods was higher than by bioassay, in both blood samples from adults suspected of acute toxoplasmosis and samples from fetuses and newborns suspected of congenital toxoplasmosis. The results of this study emphasize the huge practical importance and potential of molecular diagnostics and show the benefit of introducing this method as part of the standard protocol for the diagnosis of toxoplasmosis.

*T. gondii* has a wide range of host organisms, including all warm-blooded animals, so that in the second part of this research molecular methods for the detection of this parasite were applied in animal material, rodents specifically. Rodents were chosen because of their potentially important role as a link in the transmission chain of *T. gondii* infection. A total of 156 brain samples from 144 brown rats (*Rattus norvegicus*) and 12 house mice (*Mus musculus*) were analyzed. *T. gondii* DNA was

detected in 10.4% of rats and in as many as 83.3% of house mice. The rate of positive findings in rats and mice collected in Belgrade is an indicator of the degree of contamination of the urban environment with *T. gondii*, reflecting a considerable public health risk.

Finally, this research provides the very first and original phylogenetic data on *T. gondii* population structure in Serbia. Recent studies performed world-wide indicate the existence of a clonal population structure characterized by three main, widespread clonal lineages (I, II and III), of which types I and II are predominant in Europe and North America. There are also recombinant and atypical strains that are mainly present in South America and Africa. In this study, the identification of the *T. gondii* clonal type was performed in 22 samples, 19 from humans and three from rats, using the PCR-RFLP method. Genotyping was successful in five human samples of which four isolates originating from cases of congenital toxoplasmosis, toxoplasmosis in pregnancy and bone marrow transplantation were type II, while one isolate from a case of congenital toxoplasmosis was type I. These results, first for the Southeastern Europe, indicate the predominance of genotype II in our country, as well as in most of the Europe.

Key words: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis, diagnostics, molecular detection, PCR, PCR-RFLP, human material, rodents, genotyping, parasite strains

Area: Parasitology

Subarea: Molecular biology

UDK number: 577.2: [636.8:593.19]



## ***САДРЖАЈ***

## Садржај

ЗАХВАЛНИЦА.....	i
РЕЗИМЕ.....	ii
SUMMARY .....	v
1. УВОД.....	1
1.1. ЖИВОТНИ ОБЛИЦИ ПАРАЗИТА <i>T. gondii</i> .....	3
1.1.1. ТАХИЗОИТ.....	3
1.1.2. БРАДИЗОИТ.....	5
1.2. ЖИВОТНИ ЦИКЛУС ПАРАЗИТА <i>T. gondii</i> .....	7
1.3. ТРАНСМИСИЈА.....	11
1.4. ТОКСОПЛАЗМОЗА КОД ЉУДИ.....	12
1.4.1. Клиничке карактеристике инфекције <i>T. gondii</i> .....	13
1.4.1.1. Сечена токсоплазма .....	13
1.4.1.2. Конгенитална токсоплазма .....	14
1.5. ТОКСОПЛАЗМОЗА КОД ЖИВОТИЊА.....	15
1.5.1. Токсоплазма код глодара .....	16
1.6. ДИЈАГНОСТИКА ТОКСОПЛАЗМОЗЕ .....	17
1.7. МОЛЕКУЛАРНА ДЕТЕКЦИЈА И ГЕНОТИПИЗАЦИЈА .....	20
2. ЦИЉ РАДА.....	27
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	28
3.1. МАТЕРИЈАЛ.....	28
3.1.1. МАТЕРИЈАЛ ХУМАНОГ ПОРЕКЛА .....	28
3.1.2. МАТЕРИЈАЛ ЖИВОТИЊСКОГ ПОРЕКЛА .....	29
3.2. МЕТОДЕ.....	29
3.2.1. СЕРОЛОШКА ИСПИТИВАЊА.....	31
3.2.1.1. Комерцијални тестови .....	31
3.2.1.2. Тест модификоване директне аглутинације .....	34
3.2.1.3. Имуносорбентни аглутинациони тест.....	35
3.2.2. Биолошки оглед.....	37

3.2.3. ОБОГАЋИВАЊЕ .....	38
3.2.4. МОЛЕКУЛАРНЕ МЕТОДЕ .....	38
3.2.4.1. Екстракција .....	38
3.2.4.2. PCR у реалном времену .....	40
3.2.4.3. Генотипизација .....	47
4. РЕЗУЛТАТИ.....	56
4.1. РЕЗУЛТАТИ rtPCR-а У МАТЕРИЈАЛУ ХУМАНОГ ПОРЕКЛА .....	56
4.1.1. Анализа успешности доказивања ДНК <i>T. gondii</i> у односу на серолошки налаз.....	59
4.1.1.1. Анализа успешности доказивања ДНК <i>T. gondii</i> у односу на авидитет специфичних IgG антитела.....	59
4.1.1.1.a. Налаз rtPCR-а у узорцима крви која су садржала специфична IgG антитела ниског авидитета .....	59
4.1.1.1.б. Налаз rtPCR-а у узорцима крви која су садржала специфична IgG антитела граничног авидитета.....	60
4.1.1.1.в. Налаз rtPCR-а у узорцима крви која су садржала специфична IgG антитела високог авидитета.....	61
4.1.1.2. Анализа успешности доказивања ДНК <i>T. gondii</i> у узорцима код којих није испитиван авидитет специфичних IgG антитела .....	61
4.1.1.3. Анализа успешности доказивања ДНК <i>T. gondii</i> у односу на налаз специфичних IgM антитела .....	62
4.1.2. Анализа успешности доказивања ДНК <i>T. gondii</i> у односу на тип материјала .....	63
4.1.2.1. Периферна крв .....	64
4.1.2.2. Плодова вода.....	69
4.1.2.3. Фетална крв.....	70
4.1.3. Анализа успешности доказивања ДНК <i>T. gondii</i> из биолошког огледа (индиректни rtPCR).....	71
4.2. РЕЗУЛТАТИ rtPCR-а У МАТЕРИЈАЛУ ЖИВОТИЊСКОГ ПОРЕКЛА .....	73
4.3. ГЕНОТИПИЗАЦИЈА .....	76
5. ДИСКУСИЈА.....	82
6. ЗАКЉУЧАК.....	97

7. ЛИТЕРАТУРА.....	100
8. ПРИЛОЗИ.....	111
БИОГРАФИЈА .....	130

## ***УВОД***

Почетком XX века, у лабораторији Пастеровог Института у Тунису Nicolle и Manceaux су 1908. године током истраживања лајшманиозе код *Ctenodactylus gundi* из крви, јетре и слезине овог глодара изоловали протозоу за коју је Nicolle првобитно мислио да се ради о пироплазми, па потом о лајшманији али убрзо је схватио да је открио нову врсту коју је назвао *Toxoplasma gondii*. Име рода је изведено из грчких речи *toxon* што значи лук и односи се на морфолошки изглед паразита, и *plasma* што значи живот, док је име врсте дато по домаћину из кога је изолован паразит (Nicolle и Manceaux, 1908; Nicolle и Manceaux, 1909). Истовремено, али у Бразилу, Splendore је изоловао из зеца истог паразита али га није детерминисао (Splendore, 1908).

У следећих 30 година налажени су паразити налик на токсоплазму код различитих домаћина, док је вијабилан паразит по први пут изолован тек 1937. године (Sabin и Olitsky, 1937). Први пут је 1965. године откривено присуство паразита у фецесу мачке, као и могућност да се паразитима из фецеса могу инфицирати мишеви оралним путем (Hutchison, 1965), док је 1969. године изолован и окарактерисан стадијум ооцисте (Work и Hutchison, 1969 а, б). Годину дана касније описан је комплетан животно циклус *T. gondii* открићем сексуалне фазе за коју је утврђено да се одиграва у цревном епителу мачке (Hutchison и сар., 1969; Dubey и сар., 1970 а, б; Frenkel и сар., 1970).

*T. gondii* је облигатно интрацелуларни паразит који припада разделу Арисоплекса (Слика 1). Иако *T. gondii* има космополитско распрострањење и вероватно најшири опсег домаћина од свих паразита, постоји само једна врста овог рода чија се старост процењује на око 12 милиона година (Su и сар., 2003).

Раздео:	Apicomplexa, Levine, 1970
Класа:	Sporozoa, Leuckart, 1879
Подкласа:	Coccidiasina, Leuckart, 1879
Ред:	Eimeriorina, Leger, 1911
Фамилија:	Toxoplasmatidae, Biocca, 1956
Род:	Toxoplasma, Nicolle and Manceaux, 1909

**Слика 1.** Таксономска класификација *Toxoplasma sp.*

*T. gondii* је убиквитерна протозоа која може да инфицира и да се умножава у свакој нуклеисаној ћелији сисара и птица укључујући и човека. Инфекција изазвана овим паразитом, токсоплазмоза, једна је од најраспрострањенијих зооноза у свету, због чега има посебан значај како у хуманој тако и у ветеринарској медицини. Процењује се да је чак једна трећина човечанства инфицирана овим паразитом.

Успешност *T. gondii* резултат је флексибилности животног циклуса овог паразита који има две фазе, сексуалну и асексуалну. Сексуални циклус се одвија искључиво у домаћинима из фамилије *Felidae* и као резултат има продукцију инфективних ооциста. Асексуални циклус се одиграва у свим другим, отуда прелазним домаћинима, и њега карактеришу брзоделећи тахизоити који изазивају акутну инфекцију, и спороделећи брадизоити који формирају цисте и изазивају хроничну инфекцију. Интерконверзија тахизоита и брадизоита је најважнији механизам у патогенези инфекције, а имунски одговор домаћина у њеној контроли (Ђурковић-Ђаковић, 1998). У клиничком смислу најугроженији су фетус, код кога инфекција овим паразитом може довести до потенцијално опасног обољења, конгениталне токсоплазмозе, као и особе са компромитованим имунским системом (нпр оболели од сиде и пацијенти на дуготрајној терапији са имunosупресивним ефектом).

## 1.1. ЖИВОТНИ ОБЛИЦИ ПАРАЗИТА *T. gondii*

У развоју *T. gondii* постоје три облика: вегетативни – брзоделећи - тахизоит, цистични – спороделећи - брадизоит и ооциста. Сва три облика паразита инфективна су и за сталне и за прелазне домаћине. Стални домаћини *T. gondii* су животиње из породице *Felidae* а прелазни све остале топлокрвне као и неке хладнокрвне животиње. Код мачака као сталних домаћина се у интестиналном епителу одвија сексуална фаза животног циклуса, док се у екстраинтестиналним ткивима, као и код свих прелазних домаћина, одвија асексуална фаза, која резултира настанком ткивних циста (Dubey, 1977, 1997 а).

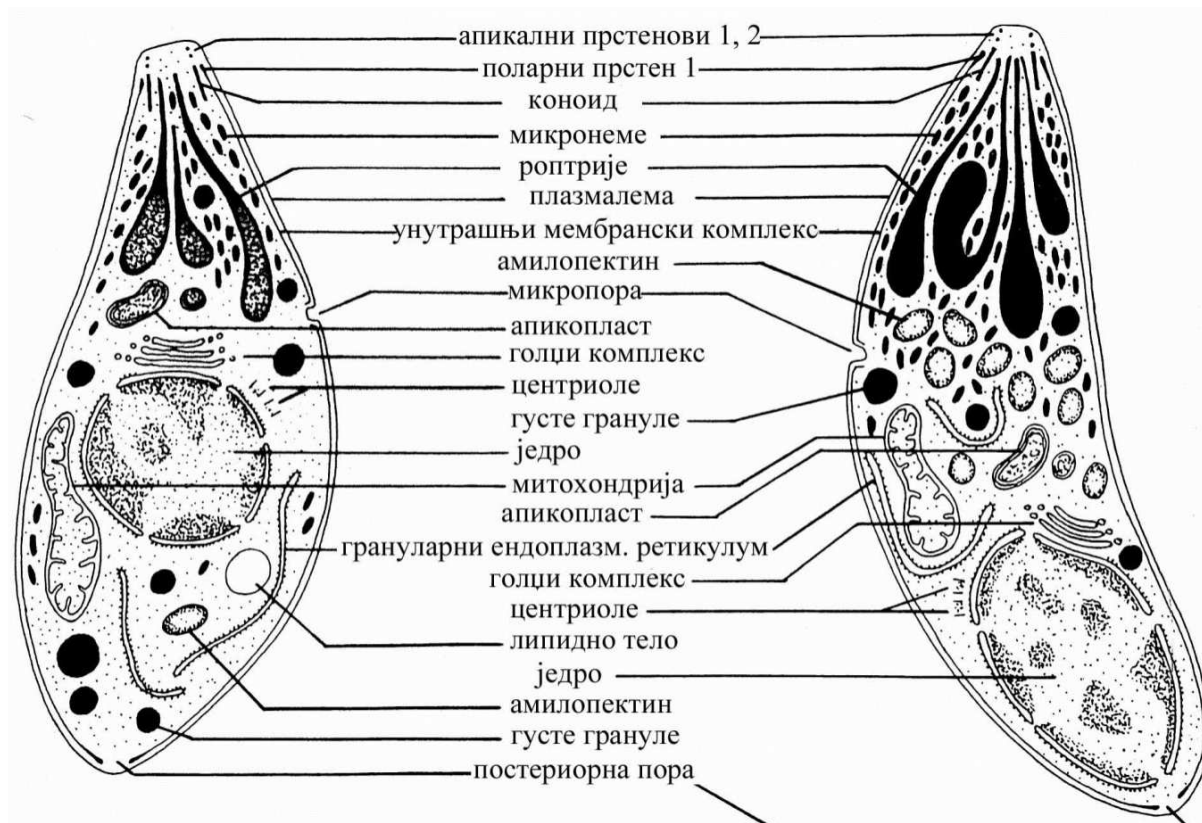
Током највећег дела животног циклуса, изузев током сексуалне деобе, у једру *T. gondii* налази се хаплоидан број хромозома (Cornelissen и сар., 1984). Хаплоидни геном садржи 14 хромозома и 7793 гена. Укупна величина генома је 63,495,144 базна пара (бп), при чему величина појединих хромозома међу различитим сојевима не варира више од 20% (Khan и сар., 2007). Екстрахромозомска ДНК се састоји од циркуларних молекула величине 36 килобазна (кб) пара чија функција није позната (Borst и сар., 1984).

### 1.1.1. ТАХИЗОИТ

Тахизоит (тахос = брзина на грчком) је стадијум који одликује способност брзе деобе у било којој ћелији прелазног домаћина као и у интестиналним епителним ћелијама сталног домаћина. У литератури се среће и под називима трофозоит, пролиферативна форма и ендозоит. У организму домаћина се налази током акутне фазе инфекције или током реактивације инфекције. Полумесечастог је облика, око 6  $\mu\text{m}$  дуг и 2  $\mu\text{m}$  широк, са зашиљеним антериорним и заобљеним постериорним крајем и састоји се од бројних органела и инклузионих тела (Слика 2) (Dubey и сар., 1998; Ferguson и Dubremetz, 2007). Специфичност у грађи свих чланова филума Apicomplexa (изузев *Cryptosporidium spp.*) је присуство апикопласта, органеле налик хлоропласту биљака. Апокипласт представља везу протозоа са биљним царством и указује на заједничког претка протозоа и зелених

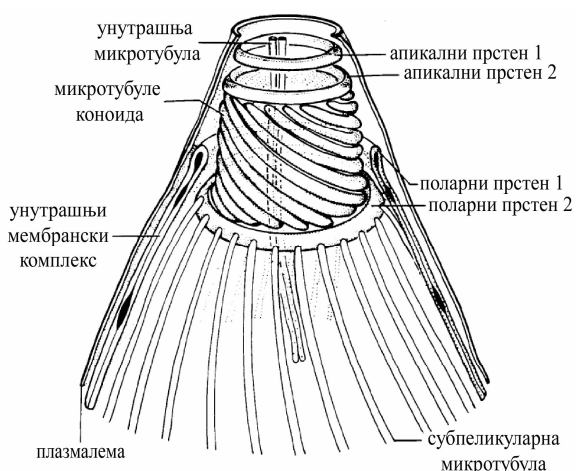


алги. Пошто је нема у другим еукариотским организмима, данас се изучава као потенцијално циљно место деловања нових лекова.

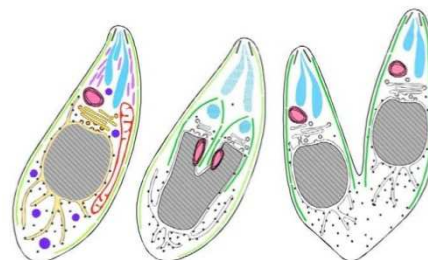


**Слика 2.** Схематски приказ тахизоита (лево) и брадизоита (десно) *T. gondii* (Dubey и сар., 1998)

Цитоскелетна мрежа омогућава кретање паразита по површини ћелије домаћина и секрецију протеина који олакшавају пенетрацију паразита у ћелију домаћина (Слика 3). Пенетрација се одвија великом брзином тако да је довољно највише 30 секунди да паразит уђе у ћелију у којој бива брзо окружен мембраном која потиче од плазмалеме ћелије домаћина. На тај начин се формира паразитофорна вакуола чији се волумен може увећати више пута у року од 24 часа.



Слика 3. Цитоскелет *T. gondii* (Dubey и сар., 1998)



Слика 4. Ендодиогенија (Nishi и сар., 2008)

Токсоплазма, као и већина сличних интрацелуларних паразита, поседује механизме који јој омогућавају преживљавање унутар ћелија домаћина а који се заснивају на блокади ацидификације фагозома што онемогућава спајање вакуоле са лизозомима ћелије, односно не долази до ензимске деградације паразита (Sibley и сар., 1985; Joiner и сар., 1990). На овај начин су створени услови да се унутар вакуоле несметано одиграва ендодиогенија, и тако настали агрегати активно делећих тахизоита ограничени паразитофорном вакуолом, називају се псеудоцисте. Ендодиогенија представља специфичан облик репродукције у којој се две ћерке ћелије формирају у родитељском паразиту који на крају процеса бива у потпуности асимилиран (Слика 4) (Goldman и сар., 1958; Sheffield и Melton, 1968; Jacobs, 1974, Nishi и сар., 2008). Већина тахизоита је унутар ћелије насумично распоређена услед асинхроног циклуса ендодиогеније мада се понекад могу уочити розете које настају услед синхроне деобе. Када више не може да издржи притисак великог броја тахизоита ћелијска мембрана пуца.

### 1.1.2. БРАДИЗОИТ

**Брадизоит** (бради = спор на грчком) је спороделећи стадијум паразита, карактеристичан за хроничну фазу инфекције, који се налази у ткивним цистама. Како се брадизоити деле, такође ендодиогенијом, ткивне цисте расту али остају

интрацелуларне. Младе цисте могу бити величине од 5  $\mu\text{m}$  у дијаметру и садрже само два брадизоита док их код старијих циста може бити и више од хиљаду. Зид ткивне цисте је еластичан, дебљине око 0.5  $\mu\text{m}$  и окружује брадизоите полумесечастог облика који могу бити 5-8.5  $\mu\text{m}$  дужине и 1-3  $\mu\text{m}$  ширине (Mehlhorn и Frenkel, 1980). Ткивне цисте се развијају у цитоплазми ћелије домаћина у оквиру паразитофорне вакуоле, која се иначе ретко може видети код старијих циста. Дебљина и структура зида цисте варира зависно од старости паразита и ћелија домаћина. Неки брадизоити показују одређени степен дегенерације и то најчешће код старијих циста код којих је такође примећено и смањење интезитета ендодиогеније.

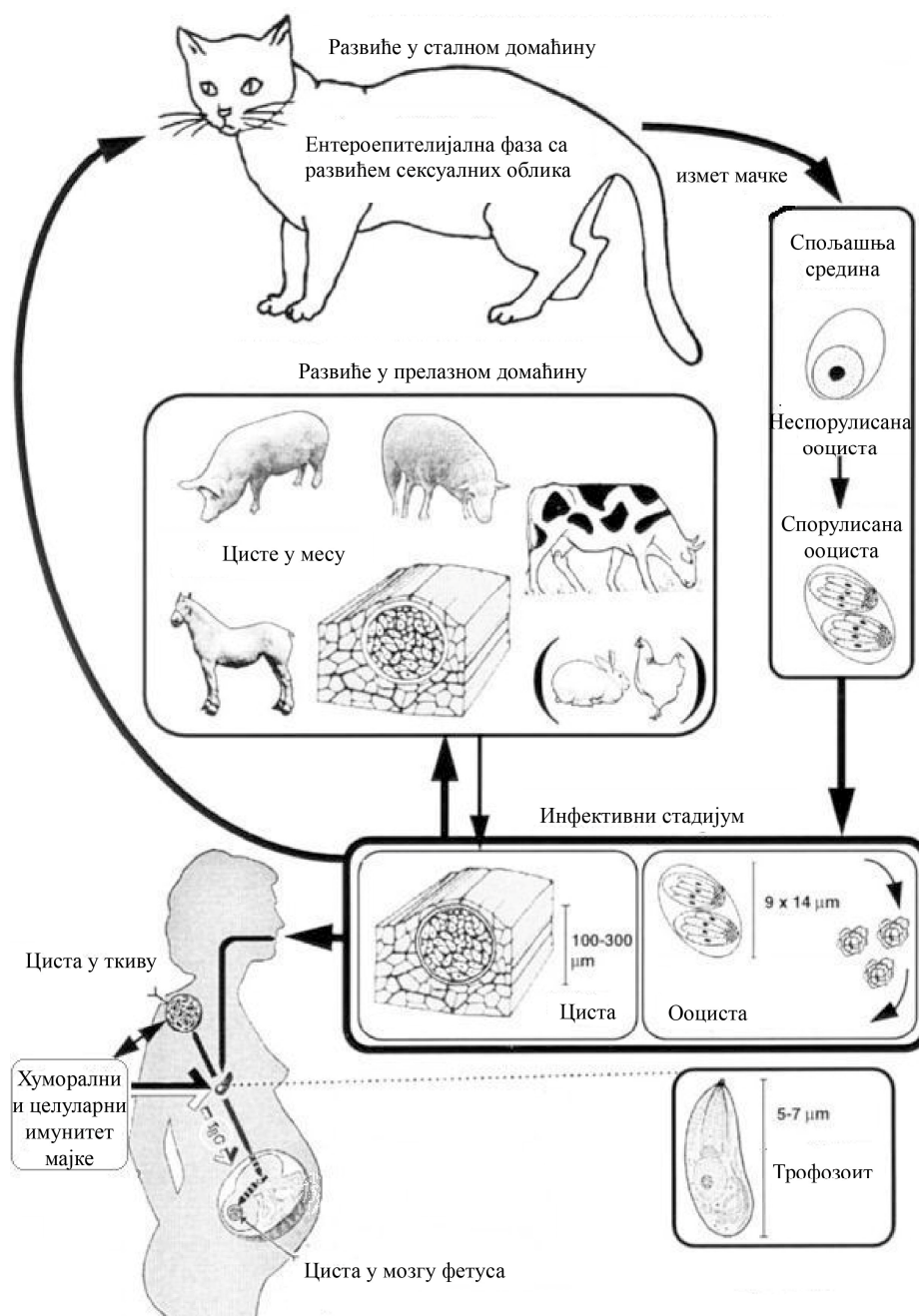
Брадизоити се структурно мало разликују од тахизоита. Имају једро које се налази ближе задњем крају, док је код тахизоита лоцирано више ка центру (Слика 2). Такође, садрже неколико амилопектинских гранула које су или слабо присутне или одсутне код тахизоита. Брадизоити су тањи од тахизоита и имају више микронема које се налазе постериорно од једра, метаболички су мање активни и сходно томе, мање подложни деструкцији протеолитичким ензимима него тахизоити (Jacobs и сар., 1960).

**Ткивне цисте** се могу развити у висцералним органима, као што су плућа, јетра и бубрези, али се чешће налазе у централном нервном систему и мишићном ткиву, и то у мозгу, очима, скелетним мишићима и срцу. Цисте су углавном сферичног облика, иако могу попримити облик ћелије у којој се налазе као што је то случај са издуженим мишићним ћелијама.

Код имунокомпетентног домаћина цисте остају дормантне (s. латентне) али вијабилне доживотно. Међутим, у стањима имуносупресије, може доћи до реактивације латентне инфекције, односно до деструкције зида цисте и ослобађања брадизоита и њихове конверзије у тахизоите.

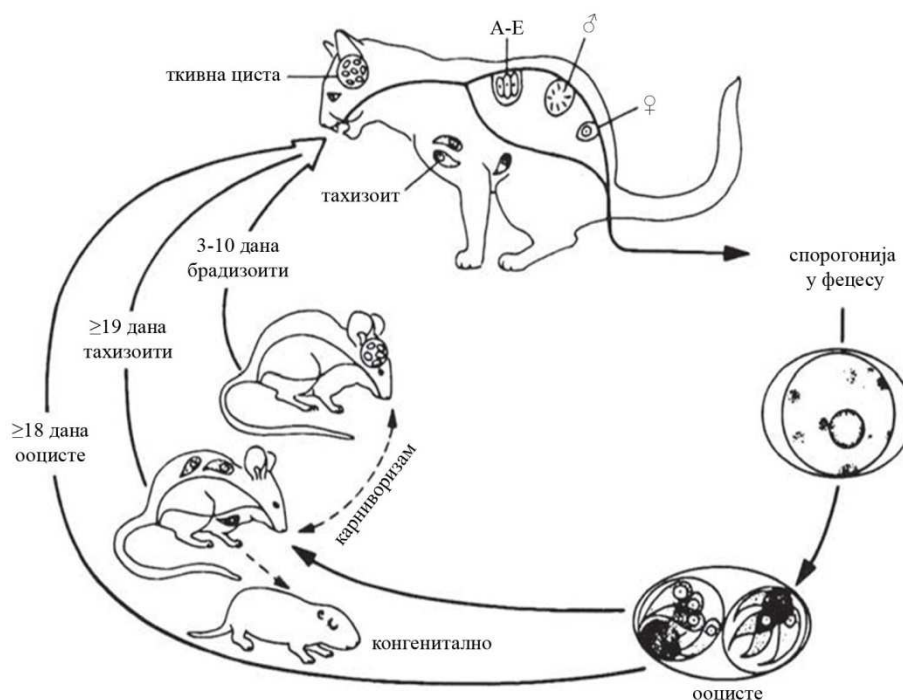
## 1.2. ЖИВОТНИ ЦИКЛУС ПАРАЗИТА *T. gondii*

Животни циклус *T. gondii* састоји се од сексуалне или ентероепителијалне фазе која се одвија само код животиња из фамилије *Felidae* и асексуалне или екстраинтестиналне фазе која се одвија код свих домаћина (Слика 5).



Слика 5. Животни циклус *Toxoplasma gondii*

Код мачака сексуална фаза животног циклуса *T. gondii* одвија се кроз фазе шизогоније, гаметогоније и спорогоније. Мачка може да се инфицира било којим од три инфективна стадијума паразита (тахизоит, брадизоит и ооциста), и да потом избаци ооцисте. Тачно време од инфекције до излучивања ооциста и фреквенца излучивања варира од стадијума паразита којим се мачка инфицирала (Слика 6) (Dubey и Frenkel, 1976; Freyre и сар., 1989; Dubey, 1996).

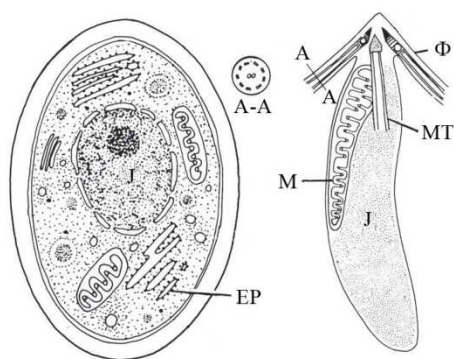


**Слика 6.** Животни циклус *T. gondii* код мачке (Dubey, 2010)

После ингестије тквивних циста мачка почиње да избацује ооцисте после 3 до 10 дана. Када је инфекција проузрокована спорозоитима из ооциста избацивање ооциста започиње после више од 18 дана, док је у случају инфекције тахизоитима почетак избацивања ооциста варијабилан али најчешће почиње око 19ог дана (Слика 6) (Frenkel и сар., 1970; Dubey, 1996; Dubey и сар., 1998; Dubey, 2010). Мање од 50% мачака излучује ооцисте после ингестије тахизоита или ооциста, док скоро све мачке излучују ооцисте после ингестије тквивних циста (Dubey и Frenkel, 1976; Freyre и сар., 1989; Dubey, 1996, 2001, 2002). Како се после

примоинфекције мачке имунизују, могу да стварају и затим избацују ооцисте само једном током живота.

После ингестије ткивне цисте код мачака долази до деградације зида цисте под дејством протеолитичких ензима у стомаку и танком цреву. Ослобођени брадизоити пробијају епителне ћелије танког црева где се потом одвија бесполна фаза развоја – шизогонија (Dubey и Frenkel, 1972). Шизогонија је процес који представља поделу једра, два или више пута, без поделе цитоплазме и још увек није познато да ли формирање ћерки ћелија паразита почиње после настанка четири или више једара. После неколико деоба, којима се многоструко увећава број паразита, долази до гаметогоније. У илеуму се 3-15 дана након инфекције могу уочити гамонти од којих се формирају микро- и макрогамети. Грађу макрогамета (зрели женски гамет) карактеришу микропоре, гранулисани и глатки ендоплазматични ретикулум, бројне митохондрије, везикуле са дуплом мембраном као и вакуоле које учествују у формирању ћелијског зида (*Wall Forming Bodies*) (Слика 7).



**Слика 7.** Шематски приказ макрогамета (лево) и микрогамета (десно):

А-А - поперечни пресек флагелума;  
 Ф - флагелум; МТ - микропоруле;  
 М - митохондрија; J - једро;  
 ЕР - ендоплазматични ретикулум (Dubey, 2010)

Микрогамети (зрели мушки гамети) су издуженог облика чији се садржај у највећој мери састоји од једарног материјала. Из базалних тела која се налазе на предњем крају микрогамета формирају се два флагелума помоћу којих се микрогамети крећу, пенетрирају и оплођују зреле макрогамете. После оплодње формира се зигот, величине 10 x 12  $\mu\text{m}$ , који је обавијен чврстом опном и представља неспорулсану ооцисту која се кратко задржава у епителној ћелији

црева, затим пуца и ослобађа ооцисте у лумен црева. Инфицирана мачка фецесом избацује ооцисте у спољашњу средину где се одвија спорулација. Једно неспорулисано ооцисте (зигота) се дели два пута при чему настају 4 једра која се налазе на периферији зигота. На овом ступњу се формира друга мембрана, долази до поделе цитоплазме и формирају се два сферична споробласта, сваки са по два једра. Потом се споробласти издужују, свако једро се подели још једном и формирају се две спороцисте са по четири спорозоице. Тако настају спорулисано ооцисте, величине 11 x 13  $\mu\text{m}$  у пречнику (Ferguson и сар., 1979; Dubey и сар., 1998).

Период спорулације, у зависности од фактора спољашње средине, као што су концентрација кисеоника, температура, влага и рН, може трајати од један до пет дана. Експериментално је показано да на температури од 25 °C спорулација траје 1-2 дана, на 15 °C 5-8 дана, а на 11 °C око 21 дан, док на температурама испод 4 °C и изнад 37 °C не долази до спорулације (Dubey и сар., 1970 б). Спорулисано ооцисте су високо инфективне а веома отпорне на услове спољашње средине тако да и под неповољним условима могу да преживе у земљишту и до 18 месеци (Frenkel и сар., 1975).

Иако су сва три стадијума *T. gondii* инфективна и за прелазне домаћине, до инфекције најчешће долази уношењем хране (као што је воће и поврће које расте ниско при земљи) или воде контаминирано спорулисано ооцистама, као и конзумацијом меса заражених животиња. Када се прелазни домаћини инфицирају ооцистама оралним путем, дигестивни сокови разграђују зид ооцисте и ослобођени спорозоити инфицирају епител танког црева. Ту долази до њихове трансформације у тахизоите који рапидно пролиферишу. Време потребно за један циклус деобе варира, тако да код вирулентног RH соја износи 6-8 сати док је нешто дуже код авирулентних сојева. После 6 до 7 деоба, када се 64 до 128 паразита акумулира у ћелији, долази до механичке руптуре ћелије домаћина. Дисеминација паразита у све ћелије организма се одиграва путем крвотока и лимфотока (макрофагима и лимфоцитима), а сама фаза паразитемије траје једну до две недеље.

У случају када се прелазни домаћини инфицирају ткивним цистама у дигестивном тракту долази до разарања зида цисте и ослобађања брэдизоита који

потом доспевају у зид црева где се трансформишу у тахизоите. Потом следи фаза асексуалног циклуса када долази до формирања ткивних циста.

Код имунокомпетентних домаћина елиминација највећег броја тахизоита и заустављање њихове репликације се дешава услед активације механизма неспецифичног, а затим и специфичног, имунског одговора. У таквим условима, у ћелијама циљних ткива, тахизоити се претварају у брадизоите а затим формирају ткивне цисте у којима су заштићени од литичког дејства имунског система.

Ткивне цисте токсоплазме су веома отпорне, тако да тек термичком обрадом инфицираног меса на температури од најмање 67°C (Dubey и сар., 1990) или замрзавањем на -13°C (Kotula и сар., 1991), као и излагањем у зрачењу од 0.4 килорада (Dubey и Thayer, 1994) долази до уништавања циста. Показано је да ткивне цисте у хомогенату мозга миша после 24 односно 48 часова излагања температури од -20°C могу изазвати инфекцију, док након 72 часа губе инфективност (Djurković- Djaković и Milenković, 2000). На температури од 4-6°C ткивне цисте могу преживети и до 2 месеца (Jacobs и сар., 1960).

### 1.3. ТРАНСМИСИЈА

Путеви ширења инфекције, односно преношења паразита, зависе од више фактора, а пре свега од начина живота, климатских услова и присуства мачака. У економски развијенијим земљама главни пут трансмисије је конзумација недовољно термички обрађеног меса. Тако је серопреваленца *T. gondii* у Француској висока управо због њихове навике да у исхрани користе крваво месо. Конзумирање недовољно термички обрађеног меса један је од главних фактора ризика за инфекцију људи овим паразитом. Значај овог фактора показан је и у Србији, што потврђују резултати епидемиолошких студија које су рађене у нашој земљи (Vobić и сар.,1998; Vobić и сар.,2003; Vobić и сар.,2007). С друге стране, да животиње чије се месо користи у исхрани представљају значајан резервоар инфекције људи код нас показује висока преваленце инфекције код животиња чије се месо користи у људској исхрани (Klun и сар., 2006).



Извор инфекције такође могу бити вода, храна и земљиште који су контаминирани ооцистама, нарочито у подручјима топле и влажне климе која погодује дужем преживљавању ооциста у природи.

Клинички значајни путеви преношења инфекције су трансплацентни и преко трансплантираних органа односно трансфузије крви. Трансплацентним путем настаје тзв. вертикална трансмисија којом се патоген преноси од мајке на фетус. Код трансплантације органа или костне сржи, код које се примаоци уводе у стање имуносупресије, може доћи било до инфекције неимунизованог примаоца органом примљеним од инфицираног донора било до инфекције трансплантираног органа од неинфицираног донора у инфицираног примаоца. Отуда је приликом трансплантације органа и ткива веома важно водити рачуна о томе да су донор и прималац компатибилни у овом смислу, тј. да су обоје или инфицирани или неинфицирани (истог серолошког статуса). Ређи пут настанка инфекције је лабораторијска инфекција, која настаје контактом са инфективним материјалом.

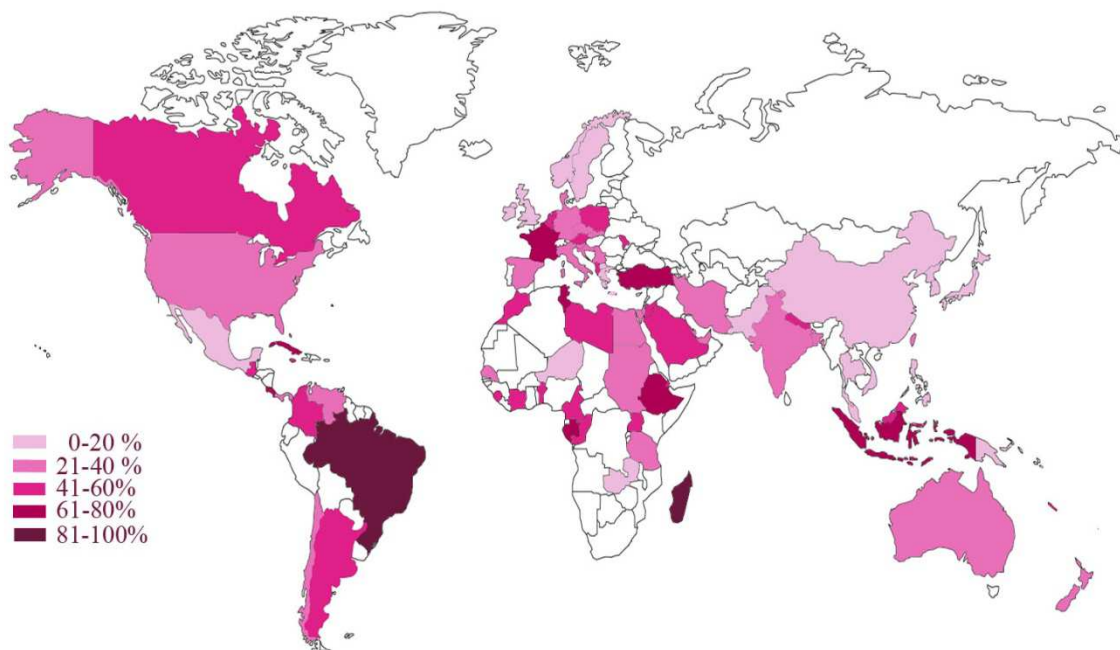
## 1.4. ТОКСОПЛАЗМОЗА КОД ЉУДИ

Инфекција паразитом *T. gondii* код људи је широко распрострањена док преваленца веома варира како између земаља, тако и између географских регија у једној земљи. Највећа забележана серопреваленца је у Јужној Америци (92% у Бразилу) док је у Југоисточној Азији најмања (4% у Кореји) (Слика 8) (Dubey и Beattie, 1998; Tenter и сар., 2000; Pappas и сар., 2009; Dubey, 2010; Vobić и сар., 2011). На глобалном нивоу, током последње деценије, уочена је тенденција опадања преваленце (Dubey, 2010).

Што се тиче нашег региона Бобић и сар. су у својим истраживањима указали да на подручју Балкана долази до пада преваленце инфекције *T. gondii* у последњих 30 година. Тако је у Србији 80их година серопреваленца износила преко 80%, док је 2007. опала на 31%. Данас преваленца на Балкану не прелази 50%, и креће се у размери од 20% у Грчкој до 49% у Албанији (Vobić и сар., 2011).

Експериментално је показано да је инфекција домаћина изазвана ооцистама интензивнија од оне изазване ткивним цистама (брадизоитима), без

обзира на број унетих паразита. Тежина обољења код имунокомпетентних домаћина зависи и од соја паразита као и од врсте и имунског статуса домаћина (Dubey, 1997 б; Dubey и сар., 1997).



**Слика 8.** Серопреваленца токсоплазмозе код људи (мапирање извршено према подацима из Dubey, 2010; Bobić и сар., 2011)

### 1.4.1. Клиничке карактеристике инфекције *T. gondii*

У зависности од тога када је и како настала инфекција, токсоплазмоза може бити аквирирана (стечена) и конгенитална (урођена).

#### 1.4.1.1. Стечена токсоплазмоза

Стечена токсоплазмоза код имунокомпетентних особа је углавном благо обољење које у највећем броју случајева пролази асимптоматски а само је код око 10-20% акутно инфицираних особа клинички манифестна (Montoya и Liesenfeld, 2004). Клиничке манифестације инфекције су најчешће благе, неспецифичне и спонтано се повлаче тако да велики број инфекција прође незапажено. Најчешћи

симптоми су незнатно повишена температура, малаксалост, замор, главобоља, прекомерно знојење, бол у мишићима и зглобовима и макулопапуларни осип. С обзиром на то да су ови симптоми веома слични симптомима неких других обољења, као што су инфективна мононуклеоза и грип, акутну токсоплазмозу је често тешко дијагностиковати. Ако се инфекција клинички манифестује најчешћи симптом представљају увећане лимфне жлезде које се јављају у 62-77% свих манифестних случајева обољења (Lelong и сар., 1960; Šibalić и сар., 1973). Акутна стечена инфекција може се манифестовати и хориоретинитисом мада се он чешће јавља као секвела конгениталне инфекције.

Популацију која је посебно угрожена од инфекције токсоплазмом представљају имуносупримиране особе, код којих се практично увек ради о реактивацији хроничне инфекције коју ослабљени имунитет више не може да контролише. Тако код особа на терапији имуносупресивним лековима и оболелим од синдрома стечене имунодефицијенције (AIDS, сида) престаје имунски надзор над паразитом и долази до конверзије брадизоита у тахизоите (Ђурковић-Ђаковић, 1998). С обзиром на то да пролиферација тахизоита може довести до масовне инфестације унутрашњих органа у клиничкој слици доминирају симптоми тешких енцефалитиса, менингоенцефалитиса, миокардитиса, пнеумонија, хепатитиса и хориоретинитиса, често са фаталним исходом. Резултати истраживања која су обављана крајем XX века у Америци показала су да је чак 30-40% особа оболелих од AIDS-а инфицираних токсоплазмом умирало од токсоплазматског менингоенцефалитиса (Luft и Remington, 1992). Данас, захваљујући примени нових терапија као што је високо активна антиретровирусна терапија (HAART), смртност пацијената коинфицираних *HIV* вирусом и токсоплазмом знатно је смањена.

#### **1.4.1.2. Конгенитална токсоплазмоза**

Конгенитална токсоплазмоза настаје у случају примоинфекције мајке паразитом *T. gondii* у току трудноће и трансплацентне трансмисије паразита на плод. У случају да је инфекција настала пре трудноће, односно када је трудница већ у хроничној фази, не долази до инфекције плода (Remington и сар., 2006).

Инфекција у трудноћи најчешће пролази неприметно и клинички се манифестује у мањем броју случајева. Да ли ће после акутне инфекције труднице доћи и до инфекције плода и како ће се она манифестовати зависи од низа фактора као што су вируленција соја *T. gondii*, имунски статус труднице, али у највећој мери од гестацијске зрелости плода у време инфекције. Са напредовањем трудноће долази до физиолошког раста пермеабилности плаценте која у ранијим месецима трудноће обезбеђује 80% а при крају трудноће мање од 40% заштите (Ђурковић-Ђаковић, 1995). Када се инфекција мајке деси рано током трудноће мања је вероватноћа да ће доћи до преласка паразита кроз плаценту али су последице за плод теже. Уколико се мајка инфицира у првом триместру трудноће ризик од конгениталне инфекције је најмањи (10-15%) док је највећи када до инфекције дође у трећем триместру (60-90%), али су срећом тада последице и најлакше (Dunn и сар., 1999; Foulon и сар., 1999; Remington и сар., 2006). Трансплацентна инфекција може код фетуса и новорођенчета довести до различитих манифестација, које обухватају спонтани побачај, мртворођеност, или рођење живог новорођенчета које може бити тешко оштећено. Класичну тријаду знакова конгениталне токсоплазмозе чине хидроцефалус или микроцефалус, интракранијалне калцификације и хориоретинитис (Sabin, 1941), али се ова данас веома ретко среће. Међутим, већина конгениталних инфекција се не манифестује на рођењу, али се код конгенитално инфициране деце могу у првим годинама живота па и касније појавити касне последице, што је најчешћи случај са хориоретинитисом.

## 1.5. ТОКСОПЛАЗМОЗА КОД ЖИВОТИЊА

Досадашња истраживања су показала да је инфекција паразитом *Toxoplasma gondii* широко распрострањена код свих топлокрвних животиња тако да оне представљају веома важну карику у животном циклусу токсоплазме. Код дивљих животиња токсоплазма је нађена код великог броја врста а од посебног значаја су животиње које живе у близини људских насеља и на тај начин непосредно долазе у контакт са људима, као и дивљач која се користи у људској исхрани.

Интересантно је да су неке дивље животиње, као што су аустралијски торбари, које су еволуирале у областима у којима није био присутан паразит, и у којима није било мачака као сталних домаћина, подложније инфекцији у односу на врсте које су коеволуирале са *T. gondii* (Dubey и Beattie, 1988). Резистентност на инфекцију паразитом међутим може бити како индивидуална тако и на нивоу врсте и највероватније зависи од соја, старости домаћина, броја паразита и пута уношења.

Инфекција токсоплазмозом код домаћих животиња представља озбиљан проблем, не само због економских губитака, као што је пример у овчарству где може изазвати спонтане побачаје, већ и због зооноског ризика, јер је, као што је већ речено, конзумирање термички необрађеног меса заражених животиња најзначајнији фактор ризика за инфекцију људи. Токсоплазмоза је доказана код практично свих домаћих животиња као што су овце, коњи, говеда, козе, кокошке и свиње, са преваленцом од 0 до 100% (Dubey, 2010). У нашој земљи је једно недавно истраживање показало да је серопревалнца инфекције домаћих животиња веома висока и то код говеда 76,3%, код оваца 84,5% а код свиња 28,9% (Klun и сар., 2006).

### 1.5.1. Токсоплазмоза код глодара

Пацови и мишеви инфицирани са *T. gondii* су од посебног значаја у епидемиологији токсоплазмозе због тога што могу бити резервоари али и извор циста за многе карниворне прелазне домаћине као што су свиње, пси и мачке (Dubey и Frenkel, 1998; Kijlstra и сар., 2008).

Прва документована токсоплазматска инфекције код дивљих пацова забележена је у Џорџији, САД 1943. године (Perrin и сар., 1943). Серолошка испитивања су касније рађена широм света и резултати су показали да опсег преваленце код пацова може износити од 1% у Кини (Lin и сар., 1990) до 100% у Џорџији, САД (Lubroth и сар., 1983).

Претпоставља се да највећу улогу у епидемиологији токсоплазмозе имају инфицирани пацови који се налазе на фармама свиња које се користе у људској исхрани. Рађене су многобројне студије о преваленци инфекције код пацова који су уловљени на таквим фармама и једна студија спроведена у Италији је показала

да је 70% пацова имало антитела специфична за *T. gondii*, док је 76% пацова имало *T. gondii* цисте на микроскопском прегледу мозга (Genchi и сар., 1991). Међутим, у Илиноису од 95 уловљених пацова само 6,3% је имало антитела специфична за *T. gondii* (Dubey и сар., 1995). Такође, у многим земљама Африке и Азије пацови се користе и у исхрани људи и на тај начин могу представљати значајан извор инфекције за људе.

Преваленца инфекције *T. gondii* код мишева, слично као и код пацова, знатно варира у зависности од региона као и методологије којом је одређивана. Генерално, резултати истраживања показују да је серопреваленца ниска као што се може видети из студија у Америци где је испитивање кућних мишева сакупљаних на фармама свиња показало стопу серопозитивности од 2.1% (26/1243) односно 0.3% (2/588) (Smith и сар., 1992; Dubey и сар., 1995).

## 1.6. ДИЈАГНОСТИКА ТОКСОПЛАЗМОЗЕ

У савременој дијагностици данас се користи већи број директних и индиректних метода за детекцију и доказивање токсоплазматске инфекције.

**Директне методе** које се користе за доказивање акутне инфекције заснивају се на доказивању самог паразита, кога је могуће изоловати само за време краткотрајне паразитемије. У ове методе се убрајају:

- налаз паразита у размазима телесних течности и ткива добијених *in vivo* или *post mortem*
- изолација паразита путем биолошког огледа на мишевима
- изолација паразита у култури ћелија или ткива
- доказивање антигена у циркулацији, телесним течностима и ткивима
- молекуларне методе, углавном засноване на PCR-у (ланчаној реакцији полимеразе).

За доказивање хроничне инфекције, тј. ткивних циста у ткивима домаћих животиња користе се:

- налаз паразита у препаратима добијеним вештачком дигестијом

- изолација паразита биолошким огледом на мишу инокулацијом дигестованог суспектног биолошког материјала
- изолација паразита биолошким огледом на мачкама нахрањених ткивима инфицираних животиња

**Индиректне методе** обухватају тестове за процену нивоа хуморалног имунског одговора, који се уобичајено називају серолошким тестовима.

Серолошким тестовима се доказује присуство антитела специфичних за *T. gondii* у серуму и то пре свега присуство специфичних IgM, IgG и IgA класа. Антитела IgG класе могу се дијагностиковати свим доле наведеним тестовима, док се тестови имунофлуоресценције, ензимски тест и тест модификоване аглутинације могу, са одређеним изменама (употребом одговарајућег коњугата), користити и за детекцију IgM антитела. IgM антитела се синтетишу већ у првим данима након инфекције, достижу максималне нивое за 2-3 недеље, а затим полако опадају током неколико месеци и касније се не могу детектовати у серуму. Њихово присуство указује на акутну инфекцију *T. gondii*. Антитела IgG класе синтетишу се касније (током друге недеље инфекције) и најчешће достижу максимум после око 8 недеља, када после фазе одржавања (тзв. “плато”) почињу да опадају, задржавајући се на детектабилном нивоу током целог живота јединке. За дијагностику токсоплазмозе веома значајна помоћна метода је одређивање авидитета специфичних IgG антитела чије вредности указују на време настанка инфекције. Специфична IgA антитела се могу детектовати у серуму после појаве IgM а пре појаве IgG антитела и указују на рану фазу инфекције.

Постоје бројни серолошки тестови који се заснивају на принципу детекције реакције везивања антигена са антителима а најзначајнији су:

- Sabin-Feldman-ов тест (SFT) је историјски први развијен за доказивање пре свега IgG антитела специфичних за *T. gondii* (Sabin и Feldman, 1948), чијим увођењем су омогућена широка истраживања токсоплазмозе и који се и даље сматра тестом златног стандарда у дијагностици. Међутим, како се као антиген у овом тесту користе пречишћени тахизоити високо вирулентног RH соја *T. gondii*, због потребе за одржавањем овог соја у лабораторији као и приметног читања

результата, данас се користи у сасвим малом броју високо специјализованих лабораторија.

За рутинску дијагностику су много бољи тестови са мртвим паразитом као антигеном, за које се реагенси могу комерцијално набавити, између осталог и због смањеног ризика за људе који изводе тестове. То су:

- индиректни хемаглутинациони тест (ИНАТ – “indirect haemagglutination test”) (Jacobs и Lunde, 1957);

- индиректни флуоресцентни тест (IFAT – „indirect fluorescent antibody test“) (Kellen и сар., 1962; Remington и сар., 1968);

- модификовани директни аглутинациони тест (МАТ – “modified agglutination test”) (Fulton и Turk, 1959; Peloux и сар., 1973; Desmots и Remington, 1980), који није специфичан за врсту јер се заснива на директној реакцији антигена са антителом (без присуства коњугата), па се може применити на све животињске врсте укључујући и човека. Основне предности овог теста су репродуцибилност, једноставност и лакоћа извођења;

- ензимски имуносорбентни тест (ELISA - „enzyme-linked immunosorbent assay“) (Voller и сар., 1976; Naot и сар., 1981), који се заснива на промени боје супстрата у присуству антитела у серуму која се читава на фотометру као одређена оптичка густина раствора. Предност овога теста је што се може изводити аутоматизовано и на тај начин омогућити испитивање великог броја узорака; и

- имуносорбентни аглутинациони тест (ISAgA - „immunosorbent agglutination assay“), који је тест високе осетљивости за доказивање специфичних IgM антитела у серуму (Desmots и сар., 1981). Принцип теста се састоји у томе да се специфична IgM антитела у серуму везују за моноклонска антитела (хумани анти-IgM) нанета на чврсту подлогу, при чему до аглутинације могу довести само антитела везана за токсоплазме. Тест је прилагођен и за доказивање специфичних IgA антитела. ISAgA је специфична, високо осетљива и једноставна за извођење као и читавање резултата.



## 1.7. МОЛЕКУЛАРНА ДЕТЕКЦИЈА И ГЕНОТИПИЗАЦИЈА

Током последње две деценије молекуларна дијагностика токсоплазмозе, која се базира на детекцији ДНК *T. gondii*, заузима све значајније место. Молекуларна детекција ДНК *T. gondii* код пацијената који су на имуносупресивној терапији или су оболели од синдрома стечене имунодефицијенције, а код којих се дијагностика токсоплазмозе не може ослонити само на серологију, може бити од пресудног значаја. Такође, увођење молекуларних метода у дијагностику конгениталне токсоплазмозе значајно је скратило време добијања резултата и самим тим омогућило правовремену примену одговарајуће терапије, с обзиром на то да је за постављање дијагнозе на основу резултата биолошког огледа или културе ћелија, потребно 6 недеља.

Молекуларне методе које се базирају на PCR-у су једноставне, осетљиве, репродуцибилне и могу се применити на свим типовима клиничких узорака (Bell и Ranford-Cartwright, 2002; Contini и сар., 2005; Calderaro и сар., 2006; Bastien и сар., 2007). Ове методе се деле у две групе, при чему прва група обухвата технике којима се детектује ДНК *T. gondii* у биолошким узорцима и ту спадају конвенционални PCR, *nested* PCR и PCR у реалном времену (Real-Time PCR, у даљем тексту *rtPCR*). Другу групу чине молекуларне методе у које спадају анализа полиморфизма дужина рестрикционих фрагмената заснована на PCR-у (PCR-RFLP), анализа микросателита и мултилокусно типизирање секвенце једне копије ДНК *T. gondii* (*multilocus sequence typing of single copy T. gondii DNA*) и оне се користе за генотипизацију сојева *T. gondii* (Su и сар., 2010).

За детекцију *T. gondii* из биолошких узорака користе се ДНК секвенце одређених, најчешће високо конзервисаних региона као што су B1 ген који се понавља 35 пута у геному, 529 бп репетитивни елемент који се у геному налази у око 200-300 копија, *ITS-1* (*internal transcribed spacer*) и ген за 18S rRNA, који постоје у 110 копија. Први протокол за молекуларну детекцију *T. gondii*, односно конвенционални PCR за B1 ген, развијен је 1989. године и од тада је модификован и оптимизован у многим лабораторијама (Burg и сар., 1989; Khalifa и сар., 1994;

Liesenfeld и сар., 1994; Reischl и сар., 2003; Switaj и сар., 2005). Међутим репетитивни елемент дужине 529 бп, који је први пут идентификовао Номан 2000. године, на PCR-у је показао 10 до 100 пута већу осетљивост у односу на B1 ген (Номан и сар., 2000; Reischl и сар., 2003). Такође, у неким лабораторијама је рађена и детекција *ITS-1* и 18S rDNK при чему је сензитивност методе била слична као при детекцији B1 гена (Hurtado и сар., 2001; Calderaro и сар., 2006). Да би се повећала осетљивост, у молекуларну дијагностику токсоплазмозе је уведен *nested PCR* иако се последњих година показало да *rtPCR* има значајно већу не само осетљивост већ и специфичност (Jauregui и сар., 2001; Reischl и сар., 2003; Contini и сар., 2005; Calderaro и сар., 2006; Edvinsson и сар., 2006). *rtPCR* осим детекције има могућност и квантификације *T. gondii* у биолошким узорцима што је нашло велику примену у праћењу кинетике и исхода паразитске инфекције код пацијената који су под терапијом, као и у експерименталним моделима (Lin и сар., 2000; Jauregui и сар., 2001; Contini и сар., 2005). Данас се као маркер за детекцију ДНК *T. gondii* највише користи репетитивни елемент 529 и *rtPCR* који по протоколу детектује присуство овог елемента и тренутно представља најосетљивији тест за детекцију овог паразита (Reischl и сар., 2003; Kasper и сар., 2009).

Осим у филогенетским истраживањима, генотипизација сојева *T. gondii* има посебан значај и у истраживањима епидемиологије токсоплазмозе. Данашња истраживања иду у правцу откривања везе између различитих генотипова и тежине обољења и иако постоји велики број студија чији резултати могу указивати на одређену везу између појединих клонских типова *T. gondii* и клиничке слике самог обољења, још увек се са сигурношћу не може потврдити евентуална корелација.

Филогенетска истраживања врсте *T. gondii* указала су на мању генетичку комплексност међу сојевима него што би се очекивало с обзиром на постојање сексуалног размножавања и могућности рекомбинација (Darde и сар., 1992; Sibley и Boothroyd, 1992). Howe и Sibley су 1995. године урадили студију популационе структуре *T. gondii* на 106 изолата сакупљених од људи и животиња из Северне Америке и Европе и резултати њихових истраживања су показали да постоје три клонска типа (тип I, II и III) и да су разлике између клонских линија веома мале на

основу чега је закључено да *T. gondii* има клонску популациону структуру (Howe и Sibley, 1995). Пре откривања генетичких маркера на основу којих је извршена подела на клонске типове, изолати *T. gondii* су били груписани по вирулентности за генетички несродне мишеве. Компаративна анализа секвенци индивидуалних гена је указала на изузетно низак алелски диверзитет унутар клонских линија, односно да постоји свега 1% дивергенције на нивоу ДНК. Такође, ограничен генетички диверзитет између и унутар клонских линија указује да су еволуирале од заједничког претка и то не тако давно, највише пре 10.000 година (Su и сар., 2003).

Ове три широко распрострањене клонске линије доминирају у Европи и Северној Америци, међу којима је тип II најчешћи (Sibley и Boothroyd, 1992; Howe и Sibley, 1995). Међутим, прелиминарне студије указују на то да би у Португалу и Шпанији типови I и III могли бити присутнији (Fuentes и сар., 2001; de Sousa и сар., 2006), док су изолати са Крита и Кипра показали преобладајућу тип III (Messaritakis и сар., 2008). Међутим, испитивања генотипова *T. gondii* која су тек од скора започела у Јужној Америци, Азији и Африци указују на велику генетичку варијабилност клонских типова на овим континентима.

Изненађујуће је да токсоплазма има клонску популациону структуру са обзиром на то да има широку географску распрострањеност, широк опсег домаћина и могућност сексуалног размножавања. Међутим, клонска структура популације не искључује у потпуности могућност рекомбинантних догађаја већ указује на то да такви догађаји не могу значајно променити доминантну клонску структуру (Darde и сар., 2007). Такође, студије којима је обухваћена генотипизација већег броја изолата *T. gondii* довеле су до закључка да је рекомбинација изузетно редак догађај у природним популацијама овог паразита (Sibley и Boothroyd, 1992; Howe и Sibley, 1995; Darde, 1996; Ajzenberg и сар., 2002 а; Darde, 2008). Податак да се рекомбинантни генотипови веома ретко срећу у природи указује на ретке сексуалне рекомбинације што значи да се сексуална фаза животног циклуса *T. gondii*, када долази до размене генетичког материјала путем *crossing-overa*, знатно ређе дешава у односу на асексуалну фазу. *T. gondii* најчешће прескаче сексуалну рекомбинацију због тога што је директно орално инфективна за прелазне домаћине, што за последицу има широку

распрострањеност неколико клонских линија (Sibley, 2003; Su и сар., 2003; Khan и сар., 2005). Претпоставља се да је у географски изолованим регијама, где се сексуални циклус чешће одиграва због ограничене разноврсности прелазних домаћина, рекомбинација много чешћа (Ajzenberg и сар., 2004).

Осим три главна клонска типа постоје и рекомбинантни типови код којих су класе алела исте као код три главне линије али су другачије распоређене између локуса. Ови сојеви могу бити одраз ретких рекомбинантних догађаја, или могу бити мање успешно сродно потомство три главне линије (Grigg и Suzuki, 2003). Изолати са рекомбинантним генотиповима су нађени већином у тропским пределима као што је Бразил, Африка и Кариби (Ajzenberg и сар., 2004), а неколико је нађено и код дивљих животиња (медведи и јелен) у Северној Америци (Howe и Sibley, 1995; Ajzenberg и сар., 2004). Међутим изолација рекомбинантних сојева у Европи и Северној Америци веома је ретка.

Још ређи су атипични односно егзотични типови, који имају јединствене полиморфизме и нове алеле. Филогенетске анализе показују да су атипични генотипови дистрибуирани кроз филогенетско стабло без неке правилности, да нису повезани са три главне линије, али да представљају много старију предачку линију која се издвојила пре око 1.000.000 година (Su и сар., 2003; Ajzenberg и сар., 2004). У литератури је описан мали број изолата са атипичним генотипом који су изоловани из узорака код случајева конгениталне токсоплазмозе у Француској, из једне овце у Уругвају, из кугуара из Канаде, из морских сисара и неколико сојева из Француске Гвајане (Darde, 1996; Lehmann и сар., 2000; Grigg и сар., 2001; Carme и сар., 2002; Su и сар., 2003; Ajzenberg и сар., 2004; Miller и сар., 2004; Conrad и сар., 2005).

Резултати досадашњих истраживања која су рађена у Северној Америци и Европи показала су да је већина случајева хумане токсоплазмозе узрокована сојем типа II (Darde и сар., 1992; Howe и Sibley, 1995; Howe и сар., 1997; Ajzenberg и сар., 2002 б). Такође, генотипизација која је урађена на изолатима из конгениталних случајева токсоплазмозе у Француској потврдила је да већина припада овом клонском типу (Ajzenberg и сар., 2002 б). Међутим, иако је већина инфекција код пацијената са синдромом стечене имунодефицијенције изазвана типом II, уочена је повећана учесталост сојева типа I (Howe и Sibley, 1995).

Такође, тип I је и често повезан са случајевима рекурентне очне токсоплазмозе код имунокомпромитованих пацијената (Grigg и сар., 2001). Претпоставља се да код имунокомпромитованих пацијената генотип паразита није повезан са тежином клиничке слике али ће одражавати слику у географској области у којој је настала инфекција. Тако, пацијенти који су се инфицирали у Европи имају тип II, док су код пацијената који су инфицирани у другим регионима, посебно у субсахарској Африци, чешћи други генотипови (Ajzenberg и сар., 2009). Атипични сојеви *T. gondii* су у Француској Гвајани и Суринаму повезани са тежим облицима токсоплазмозе код имунокомпетентних пацијената (Ajzenberg и сар., 2004; Demar и сар., 2007) док у Јужној Америци могу изазвати теже облике стечене очне токсоплазмозе (Khan и сар., 2006).

Код прелазних домаћина, укључујући и људе, може доћи и до мешане инфекције различитим генотиповима али су такође описани и нови генотипови са различитим комбинацијама алела I, II и III типа и атипичних алела (Ajzenberg и сар., 2002 а; Aspinall и сар., 2003; Dubey и сар., 2003; Dubey и сар., 2005; Su и сар., 2006). Штавише, још увек малобројна истраживања на афричким сојевима, показала су да постоји честа инфекција *T. gondii* са фиксираним комбинацијом алела типа I и III, што може указати на постојање афричког клонског типа.

Такође је утврђено да упркос малим варијацијама између клонских линија постоје фенотипске разлике које могу довести до разлика у вируленцији и инфективности. Истраживања на мишевима су показала да инфекције различитим клонским типовима могу имати различите исходе тако да су изолати типа I високо вирулентни и летални, док су типови II и III генерално авирулентни за мишеве (Sibley и Boothroyd, 1992; Darde и сар., 2007).

Истраживања популационе структуре паразита *T. gondii* заснована су на филогенетским студијама високо конзервисаних региона у геному ове врсте. Данас се за генотипизацију токсоплазматских изолата најчешће користе две методе, PCR-RFLP и микросателитска анализа.

Анализа микросателитских секвенци се заснива на детектовању полиморфности унутар секвенце која се састоји од кратких тандемских поновака дужине 2-6 нуклеотида чији број може да варира у оквиру једног алела. Данас се у

најсавременијим филогенетским и епидемиолошким истраживањима користи чак до 15 микросателитских маркера (Ajzenberg и сар., 2010).

PCR-RFLP метода је базирана на деловању рестрикционих ендонуклеаза које препознају места тачкастих полиморфизама (SNP, *single nucleotide polymorphism*) при чему се добијају PCR продукти различитих величина на основу којих је могуће одредити припадност неком од клонских типова.

Да би се добила што прецизнија слика о популационој генетици паразита веома је важно да се у мултилокусној анализи користи што већи број маркера. Како су информације о секвенцама постале доступније реализацијом пројекта који се бавио испитивањем токсоплазматског генома, идентификован је велики број специфичних полиморфних маркера који се данас користе у филогенетским студијама (Ajioka и сар., 1998; Manger и сар., 1998; <http://toxomap.wustl.edu/>; <http://toxodb.org/toxo/>), од којих су најзначајнији приказани у Табели 1.

**Табела 1.** Маркери за PCR-RFLP анализу и хромозоми *T. gondii* на којима се они налазе

бр.	маркер	хромозом <i>T. gondii</i>
1	SAG1	VIII
2	SAG2	VIII
3	SAG3	XII
4	BTUB	IX
5	GRA6	X
6	GRA7	VIIa
7	C22-8	Ib
8	C29-2	III
9	L358	V
10	PK1	VI
11	Apico	пластид

Заједничка карактеристика свих протозоа је да поседују велики број површинских протеина који су са мембраном повезани преко

гликолфосфатидилинозитол (GPI) веза. Токсоплазма има неколико фамилија ових протеина од којих су најбоље проучени површински антигени (SAG) и они су део суперфамилије сродних протеина названих SRS. На површини тахизоита експримирани су SAG1, SAG2A/B и SAG3. SAG2D и BSR4 су протеини специфични за брадизоите док се код спорозоита експримира SporoSAG. Највећи број површински везаних антигена припада SAG1 и SAG2 фамилијама. На основу досадашњих истраживања претпоставља се да ови молекули имају важну улогу у инвазији ћелија домаћина, модулацији имунског одговора и/или смањењу вируленције, а такође је могуће и да обезбеђују заштиту паразиту неопходну за преживљавање (Lekutis и сар., 2001).

GRA протеини се налазе у саставу густих гранула који се ослобађају, по инвазији паразита у ћелију домаћина, у новоформирану паразитофорну вакуолу. Сматра се да учествују у модификацији паразитофорне вакуоле мада тачна функција ових протеина још увек није позната. GRA протеини се експримирају код сва три животна облика токсоплазме и до сада је описано 12 протеина од којих већина има трансмембранске домене. GRA6 има 32 кило Далтона (kDa) и први пут су га описали Lecordier и сар. (1995), док GRA7 има 29 kDa (Fischer и сар., 1998).

С обзиром на описану улогу молекуларних техника детекције *T. gondii*, од посебног је значаја, како за дијагностику тако и за епидемиолошке студије, усавршавање постојећих и развој нових, једноставнијих, осетљивијих и бржих метода за детекцију и идентификацију, као и генотиписацију *T. gondii*. Тренутно су *state-of-the-art* методе *multiplex multilocus nested PCR-RFLP* (Dubey и сар., 2007) и *microsatelite single multiplex PCR assay* (Ajzenberg и сар., 2010).

***ЦИЉ РАДА***



Побољшање дијагностике паразитских обољења, а посебно токсоплазмозе као једне од најшире распрострањених зооноза, обухвата пре свега усавршавање традиционалних тестова и анализа али и увођење нових заснованих на најновијим научним и технолошким достигнућима.

С обзиром на то да се молекуларне методе због своје изузетне осетљивости али и специфичности намећу као нови стандарди у водећим светским центрима за ово обољење, основни циљеви овог рада су увођење молекуларних метода у дијагностику токсоплазмозе у Србији и оптимизација дијагностичких протокола. Не мање важан циљ је и генотипизација изолованих сојева којом ће се добити први подаци о популационој структури *T. gondii* на нашем простору.

Постављени циљеви ће бити реализовани кроз следеће задатке:

- Избор и увођење основних молекуларних метода заснованих на PCR технологији у дијагностику токсоплазмозе и оптимизација протокола за различите врсте узорака и материјала
- Детекција паразита *T. gondii* индиректним методама у материјалима хуманог и животињског порекла
- Изолација *T. gondii* биолошким огледом
- Детекција ДНК пореклом од *T. gondii* помоћу квалитативног и квантитативног rtPCR у материјалу хуманог порекла
- Детекција ДНК пореклом од *T. gondii* помоћу квалитативног и квантитативног rtPCR у материјалу животињског порекла
- Генотипизација изолованих сојева *T. gondii* помоћу PCR-RFLP методе

## ***МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ***

### 3.1. МАТЕРИЈАЛ

Вијабилни паразити *T. gondii* се током инфекције могу наћи као тахизоити у крвотоку у току краткотрајне акутне фазе док се у хроничној фази, као брадизоити у ткивним цистама, налазе преобладајуће у мозгу и попречној пругастој мускулатури. Хумани материјал који је анализиран у овом истраживању потицао је од пацијената са сумњом на акутну инфекцију (жене у трудноћи, деца са суспектном конгениталном токсоплазмозом, пацијенти са лимфаденопатијом и пацијенти са променама на очном дну изазваним токсоплазмозом) и пацијената код којих је извршена трансплантација, док је животињски материјал био пореклом од синантропних глодара.

#### 3.1.1. МАТЕРИЈАЛ ХУМАНОГ ПОРЕКЛА

Анализирани материјал хуманог порекла који је у периоду од 2007. до 2011. године пристигао у Националну референтну лабораторију за токсоплазмозу (НРЛТ) обухватио је периферну крв, плодову воду, феталну крв, очну водицу, ликвор и бронхоалвеоларни лават (БАЛ). Анализирано је укупно 160 узорка, од 127 пацијента, који су сви имали позитиван налаз специфичних IgG антитела, а од посебног интереса су били случајеви са позитивним налазом спец. IgM антитела као и ниским авидитетом спец. IgG антитела због тога што су ово параметри који указују на акутну инфекцију *T. gondii*.

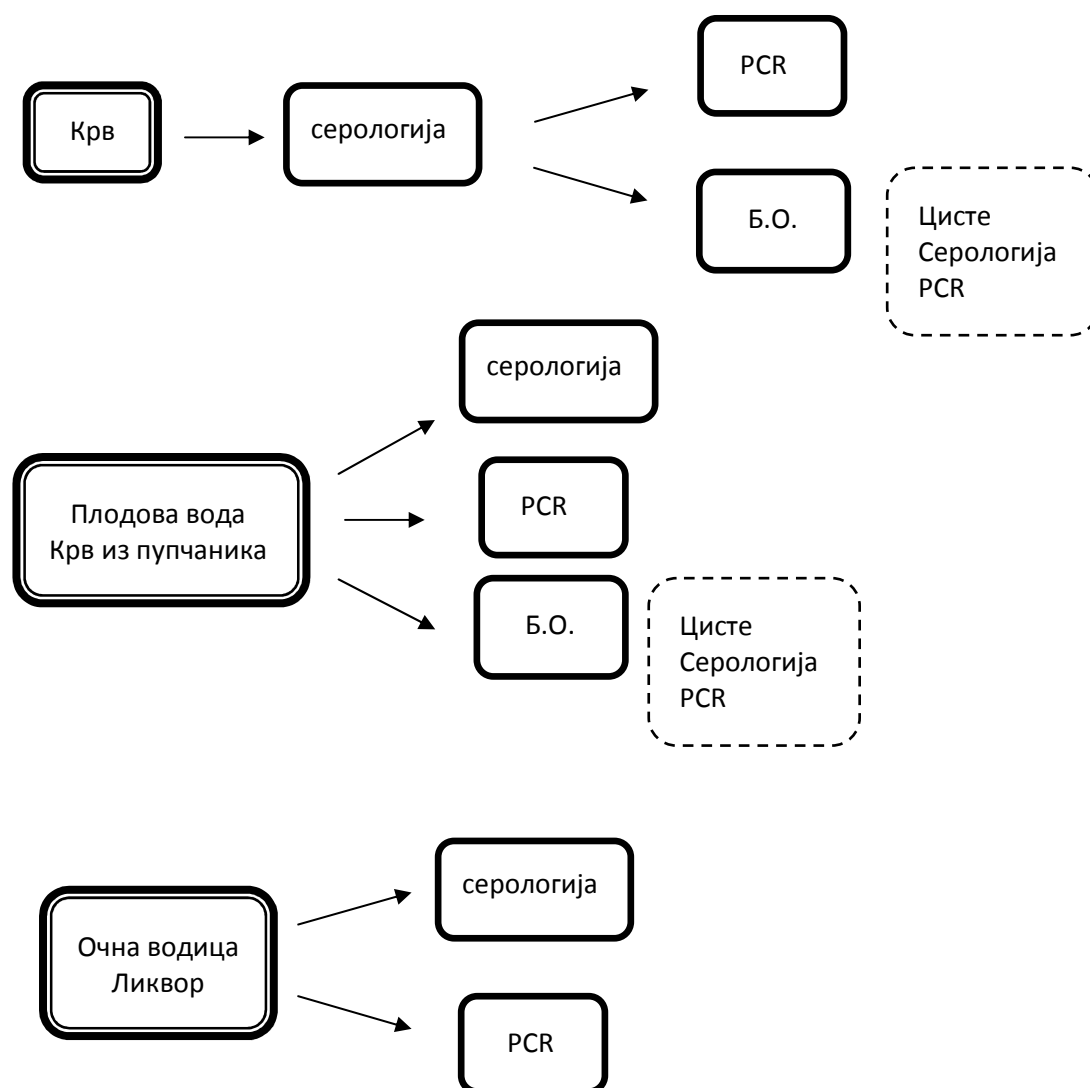
### 3.1.2. МАТЕРИЈАЛ ЖИВОТИЊСКОГ ПОРЕКЛА

Материјал животињског порекла обухватио је мозгове пореклом од 156 глодара и то 144 пацова врсте *Ratus norvegicus* и 12 мишева врсте *Mus musculus* који су сакупљани у оквиру шире еколошке студије у сарадњи са Институтом за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ на три локалитета на ширем подручју Београда, руралног карактера и лоших санитарних услова, као и 80 серума пореклом само од пацова.

## 3.2. МЕТОДЕ

Хумани материјал који доспева у НРЛТ пролази кроз серију анализа, по стандардизованим протоколима, као што је схематски приказано на Слици 9.

Сви прикупљени серуми, како хуманог тако и животињског порекла, плодове воде, ликвори и очне водице били су анализирани на присуство IgG антитела специфичних за *T. gondii* помоћу високо осетљивог теста директне аглутинације („*High Sensitivity Direct Agglutination – HSDA*“). Код људи је ниво специфичних IgG и специфичних IgM антитела, као и авидитет специфичних IgG антитела, одређиван помоћу одговарајућих комерцијалних тестова на апарату мини VIDAS (*Mini VIDAS Automated Immunoassay System, Biomerieux*, Француска), док је присуство специфичних IgM антитела одређивано и помоћу високо осетљивог имуносорбентног аглутинационог теста („*Immunosorbent Agglutination Assay – ISAgA*“).



**Слика 9.** Схематски приказ стандардног протокола предвиђених анализа у НРЛТ

У свим случајевима у којима је из хуманог материјала на основу серолошког налаза постављена дијагноза акутне токсоплазмозе, као и из мозга глодара који су на микроскопском прегледу имали цисте, покушана је изолација *T. gondii* помоћу биолошког огледа. Мозгови мишева из биолошких огледа који су на микроскопском прегледу имали цисте пасирани су у циљу даљег одржавања и обогаћивања соја и његове генотипизације.

Из материјала као што су периферна крв, крв из пупчаника, плодова вода, ликвор, очна водица, БАЛ и мозгови мишева из биолошких огледа, у којима се на основу претходних анализа могло очекивати присуство паразита, као и из мозга

синантропних глодара, за потребе молекуларно биолошких анализа екстрахована је комплетна ДНК.

Детекција токсоплазме на нивоу ДНК је рађена помоћу rtPCR-а, а генотипизација сојева *T. gondii* помоћу PCR-RFLP методе на четири генска маркера и то SAG1, SAG2, GRA6 и GRA7.

### 3.2.1. Серолошка испитивања

Узорци периферне и феталне крви су центрифуговани 15 минута на 2200 обртаја у минути и издвојени серум је чуван на -20°C за серолошке анализе. Коагулум је чуван у фрижидеру на +4°C до постављања биолошког огледа и екстракције ДНК код узорака код којих је на основу серолошких анализа постављена дијагноза акутне токсоплазмозе.

Плодове воде су такође центрифугиране 15 минута на 2200 обртаја а супернатант је коришћен за серолошке анализе. Део талога је коришћен за постављање биолошког огледа, а из другог дела екстрахована је ДНК.

Очне водиче, ликвори, БАЛ и серуми синантропних глодара су стизали у лабораторију на леду и чувани су на температури од -20°C за серолошке анализе, а очне водиче, ликвори и БАЛ и за екстракцију ДНК.

#### 3.2.1.1. Комерцијални тестови

За одређивање присуства IgM и IgG антитела код људи коришћени су и комерцијални китови за апарат мини VIDAS, према упутству произвођача.

Мини VIDAS користи китове спремне за употребу који се састоје од SPR (*solid phase receptacle*) тестера, пластичних пипета чија унутрашњост је превучена антителима или антигенима и ”стрипова,, који садрже све реагенсе неопходне за реакцију (испирач, коњугат, растварач и супстрат). Метода се заснива на комбинацији двостепеног ензимског „sandwich“ имуно-теста и регистравања добијене промене интензитета флуоресценције супстрата („ELFA – *Enzyme Linked Fluorescent Assay*“). Сви кораци теста се у машини изводе аутоматски и

обухватају пипетирање испитиваног узорка *SPR* тестерима кроз одговарајућу секвенцу бунарчића на стриповима, завршно флуоресцентно читавање реакције и штампања резултата.

**Ензимски имунотест за детерминацију IgG антитела специфичних за *T. gondii* у хуманом серуму или плазми, VIDAS® Toxo IgG II (TXG):** *T. gondii*-специфична IgG антитела која су присутна у узорку везују се за антиген *T. gondii* на унутрашњој површини *SPR* тестера (мембрански и цитоплазматски *T. gondii* антиген пореклом из RH соја). Све неvezане компоненте узорка испирају се током више корака. Мишја моноклонска анти-хумана IgG антитела коњугована са алкалном фосфатазом се затим везују за хумани IgG (пореклом из узорка) који је већ везан за антиген *T. gondii* у *SPR* тестеру. У последњем кораку, *SPR* тестер пипетира садржај бунарчића са супстратом (4-метил-умбелиферил фосфат) када алкална фосфатаза катализује хидролизу овог супстрата у флуоресцентни продукт 4-метил-умбелиферон. Јачина флуоресцентне емисије мери се на 450nm, а интензитет флуоресценције је пропорционалан концентрацији антитела присутних у испитиваном узорку.

На основу разлике у интензитету флуоресценције пре и после разлагања супстрата и читавања добијене релативне флуоресцентне вредности (РФВ) у односу на калибрациону криву, добијају се резултати изражени у количини интернационалних јединица по милилитру.

Табела тумачења резултата:

Титар (IU/ml)	Тумачење
< 4	Негативан
4 ≤ титар < 8	Граничан
≥ 8	Позитиван

**Ензимски имунотест за детерминацију IgM антитела специфичних за *T. gondii* у хуманом серуму, VIDAS<sup>®</sup> Toxo IgM (TXM):** *T. gondii*-специфична IgM антитела присутна у узорку везују се за поликлонска антитела на унутрашњој површини *SPR* тестера, а све неvezане компоненте узорка испирају се током више корака. Мишја моноклонска анти-*P30* (растворљива антигена детерминанта *T. gondii*) антитела коњугована са алкалном фосфатазом се затим везују за хумани IgM (пореклом из узорка) већ везан за анти- $\mu$  имуноглобулински ланац у *SPR* тестеру. У последњем кораку, *SPR* тестер пипетира садржај бунарчића са супстратом (4-метил-умбелиферил фосфат). Алкална фосфатаза катализује хидролизу овог супстрата у флуоресцентни продукт 4-метил-умбелиферон. Јачина флуоресцентне емисије мери се на 450nm а интензитет флуоресценције пропорционалан је концентрацији антитела присутних у испитиваном узорку. На основу разлике у интензитету флуоресценције пре и после разлагања супстрата и читавања добијене РФВ у односу на калибрациону криву, добијају се резултати изражени као индекс (I).

Табела тумачења резултата:

Индекс	Тумачење
$I < 0,55$	Негативан
$0,55 \leq I < 0,65$	Граничан
$I \geq 0,65$	Позитиван

**Ензимски имунотест за детерминацију авидитета IgG антитела специфичних за *T. gondii* у хуманом серуму плазми, VIDAS<sup>®</sup> TOXO IgG avidity (TXGA):** Тест се заснива на особини урее да лако разлаже везе антигена са специфичним IgG антителима насталим у почетку инфекције (тзв. ниско-авидна антитела), а нема утицаја на везе антигена са антителима насталим касније у току инфекције (тзв. високо-авидна антитела). Због тога што се анализа узорка изводи паралелно у два стрипа, од којих први у одређеним бунарчићима садржи само



пуфер за испирање, а други уз испирач садржи и уреу, резултат теста представља количник РФВ добијених читавањем другог и првог стрипа.

Антитела специфична за *T. gondii* која су евентуално присутна у узорку, везују се за антиген на унутрашњој површини *SPR* тестера (RH сој). Све неvezане компоненте узорка испирају се током више корака. Мишија моноклонска антихумана IgG антитела коњугована са алкалном фосфатазом се затим везују за хумани IgG (пореклом из узорка) који је већ везан за антиген *T. gondii* у *SPR* тестеру. У последњем кораку, *SPR* тестер пипетира садржај бунарчића са супстратом (4-метил-умбелиферил фосфат). Алкална фосфатаза катализује хидролизу овог супстрата у флуоресцентни продукт 4-метил-умбелиферон и јачина флуоресцентне емисије мери се на 450 nm. Количник добијен дељењем релативних флуоресцентних вредности другог и првог стрипа представља резултат анализе изражен као индекс.

Да би се неки узорак тестирао на авидитет мора бити претходно тестиран на присуство IgG антитела TXG тестом и мора бити позитиван (титар  $\geq 8$  IU/ml). Сваки узорак чији је резултат TXG теста већи од 15 IU/ml мора се разблажити до 15 IU/ml, док се узорци који имају титар  $\leq 15$  IU/ml тестирају неразблажени.

Табела тумачења резултата:

Авидитет	Тумачење
$I < 0,200$	Низак авидитет
$0,200 \leq I < 0,300$	Граничан авидитет
$I \geq 0,300$	Висок авидитет

### 3.2.1.2. Тест модификоване директне аглутинације

**HSDA** представља модификацију теста директне аглутинације (*MAT – modified agglutination test*) по методу *Desmonts* и *Remington* из 1980. године. Тест није специфичан, због тога што долази до директне реакције антиген-антитело,

без учешћа коњугата, и зато се може користити за доказивање специфичних IgG антитела за *T. gondii* и код људи и код животиња.

Као антиген се користе цели, интактни формализовани тахизоити RH соја *T. gondii*. За извођење теста користе се микротитарске плоче са 96 бунарчића са заобљеним дном, а као медијум се користи BABS пуфер (прилог 6). Разблажења серума су прављена у фосфатном пуферу (PBS, прилог 6), коме се додаје 2-меркаптоетанол, финалне концентрације 0,016 g/mL, у циљу разлагања специфичних и неспецифичних IgM антитела у серуму што спречава појаву лажно позитивних реакција. За узорке хуманог порекла основно разблажење било је 1:20 (5 µL серума и 95 µL пуфера), док је за животињске било 1:25 (4 µL серума и 96 µL пуфера). Свака реакција је подразумевала и позитивну (лабораторијски стандард припремљен према референтном серуму Светске Здравствене Организације концентрације 1000 IU/mL) и негативну контролу (пуфер PBS).

На основу резултата TXG теста узорци хуманог порекла су титрирани до одређеног разблажења. Животињски серуми су прво испитани у стандардном низу 1:25 и 1:50, а затим су сви позитивни у разблажењу 1:50 титрирани до последњег позитивног разблажења. Разблаженим серумима је додавана једнака запремина BABS пуфера са *T. gondii* антигеном и микроплоче са таквим садржајем су лагано мешане 15 секунди на шејкеру. Плоче су потом инкубиране 18 сати на 32°C у мини инкубатору, након чега су очитавани резултати реакције. Сви серуми код којих је утврђена аглутинација у титру  $\geq 1:20$  за људе и  $\geq 1:25$  за животиње сматрани су позитивним, што одговара вредности од 1 и 1,25 интернационалних јединица специфичних *T. gondii* антитела у милилитру серума (одређено на основу референтног серума Светске здравствене организације).

### 3.2.1.3. Имуносорбентни аглутинациони тест

**Имуносорбентни аглутинациони тест** („*Immunosorbent agglutination assay – ISAgA*”) је високо осетљиви тест за одређивање присуства специфичних IgM антитела. ISAgA тест, који је рађен коришћењем комерцијалног кита (*bioMérieux, Charbonnières-les-Bains, Француска*), заснива се на принципу везивања анти-хуманих IgM моноклонских антитела за хумани IgM у узорку.

Додатак формализованих тахизоита омугаћава визуелну идентификацију присуства или одсуства специфичних IgM антитела.

Серуми одраслих пацијената се разблажују у *PBS*-у у размери 1:100, а деце до једне године старости у размери 1:20. Позитивна контрола добијена у киту разблажује се 1:10, док се као негативна контрола користи *PBS*. По 100  $\mu\text{L}$  разблаженог узорка, као и позитивне и негативне контроле, укапавају се у по два бунара који су превучени анти-хуманим IgM моноклонским антителима. Стрипови се покривају и остављају два сата у влажној комори на 37°C. После инкубације бунарчићи се празне извртањем стрипова. Сваки бунар се испира једном кратко у *PBS-Tween*, потом два пута у *PBS-Tween* по 5 минута и два пута по 5 минута само у *PBS*. Антиген се разблажује *BABS* пуфером у односу 1:20 и затим додаје у бунарчиће. Стрипови се покривају и остављају преко ноћи у влажној комори на 37°C, а степен аглутинације се одређују коришћењем читача са огледалом.

Сваки узорак се прво тестира додавањем 100 и 150  $\mu\text{L}$  суспензије антигена, а уколико је потребно, ради се и потврдни тест додавањем 150  $\mu\text{L}$  и 200  $\mu\text{L}$  антигена.

Када је реакција негативна долази до седиментације тахизоита на дну бунара у виду компактног дугмета а уколико је реакција позитивна долази до аглутинације тахизоита. Резултати се изражавају вредностима од 0 до 4. Тотална седиментација, када је дугме величине као и код негативне контроле, означава се вредношћу 0, док се тотална аглутинација означава вредношћу 4. ISAgA индекс за испитивани узорак се добија сабирањем вредности добијених коришћењем 2 различите запремине антигена. Потврдни тест се ради када је резултат  $\geq 6$  и у том случају се ISAgA индекс за испитивани узорак добија сабирањем вредности добијених коришћењем 3 различите запремине антигеа.

Табела тумачења резултата:

Индекс	Тумачење
0 - 5	Негативан
6 - 8	Граничан
9 - 12	Позитиван

### 3.2.2. Биолошки оглед

Од хуманог материјала биолошки огледи су постављани од периферне крви пацијената код којих је на основу серолошких анализа постављена дијагноза акутне токсоплазмозе, феталне крви, плодове воде и БАЛ. Од материјала животињског порекла, биолошки огледи су постављани од мозга пацова код којих је микроскопским прегледом утврђено присуство циста у мозгу.

Биолошки оглед подразумева интраперитонеалну инокулацију суспектног материјала у по две *Swiss-Webster* албино женке мишева, тежине око 18-20 g. Инокулише се око 500  $\mu\text{L}$  материјала заједно са 100  $\mu\text{L}$  гентамицина (0.8 mg/mL).

После 6 недеља мишевима је узимана крв из интраорбиталне вене и тестирана на присуство IgG антитела специфичних за *T.gondii*.

Мишеви су потом жртвовани успављивањем помоћу анестетика а хомогенати мозга, који су прављени тако што су мозгови хомогенизовани у 1 mL физиолошког раствора пасажом кроз стерилни инсулински шприц и иглу 21G, су микроскопски прегледани на присуство циста *T.gondii*. Цисте су пребројаване тако што је 25  $\mu\text{L}$  хомогената накапавано на 4 плочице које су затим прегледане на фазно-контрастном микроскопу, а укупан број циста по мозгу миша је израчунаван тако што се број који је добијен прегледањем 4 препарата множио са 10, што значи да је праг осетљивости методе је био 10 циста по mL. Уколико је установљено присуство циста мозак је даље пасиран (кроз два миша) ради покушаја одржавања соја и његове генотипизације.

Мозгови мишева из биолошких огледа су анализирани помоћу rtPCR само у случајевима када су били позитивни на микроскопском прегледу и/или

серолошки, односно када је узорак од кога је постављен Б.О. већ био позитиван на rtPCR. Такође, rtPCR је рађен и да би се одредила количина ДНК пореклом од *T.gondii* у узорку на основу чега је, уколико је добијена *Ct* вредност указивала на минимално потребну количину ДНК, даље рађена генотипизација.

Биолошки оглед је сматран позитивним ако су доказана специфична IgG антитела код макар једног миша, ако је нађена једна токсоплазматска циста у макар једном мишу, или ако је најмање код једне животиње доказана токсоплазматска ДНК.

### 3.2.3. Обогаћивање

Обогаћивање је помоћна метода која представља у принципу пасажу соја из биолошког огледа да би се добила већа количина паразита, а самим тим и већа концентрација ДНК која је потребна за успешну генотипизацију. Од 250 до 500  $\mu\text{L}$  хомогената мозга миша из биолошког огледа, заједно са 100  $\mu\text{L}$  гентамицина, убризгавано је интраперитонеално у по две здраве женке миша. После 6 до 8 дана мишеви су жртвовани и перитонеум је испиран са по 4 mL физиолошког раствора. Тако сакупљен перитонеални ексудат је центрифугован 10 минута на 3000 обртаја. Талог је затим испиран 2-3 пута у физиолошком раствору и ресуспендован у 200  $\mu\text{L}$  PBS из чега је даље екстрахована ДНК.

### 3.2.4. Молекуларне методе

#### 3.2.4.1. Екстракција

Екстракција ДНК из прикупљеног материјала за коју је коришћен QIAgen кит (*QIAamp DNA mini kit, Qiagen*), рађена је по протоколу који се базира на издвајању нуклеинских киселина у колоницама са силика гел мембраном.

Крв је центрифугована 15 минута на 2200 обртаја у минути и издвајан је серум за серолошке тестове, а затим су коагулум и остатак серума хомогенизовани стерилним инсулинским шприцем. Екстракција ДНК је потом

обављана из 200  $\mu\text{L}$  овако припремљеног хомогената. И плодова вода је центрифугована 15 минута на 2200 обртаја у минути а ДНК је такође екстрахована из 200  $\mu\text{L}$  талоба. Услед мале количине ликвора и очне водице ДНК је екстрахована из целокупног материјала који је био доступан док је екстракција ДНК из БАЛ обављана из 200  $\mu\text{L}$  узорка. Мозгови мишева из биолошких огледа као и мозгови дивљих мишева, сваки појединачно, хомогенизовани су стерилним инсулинским шприцем и иглом у 1 mL физиолошког раствора. Од сваког хомогената за екстракцију је узимано такође по 200  $\mu\text{L}$ . Због своје величине, сваки мозак пацова хомогенизован је стерилним инсулинским шприцем и иглом у 2 mL физиолошког раствора и одатле је такође одвајано по 200  $\mu\text{L}$  за екстракцију.

Екстракција ДНК из телесних течности и ткива обављана је по протоколу произвођача са мањим модификацијама. Телесне течности су прво лизирани са 20  $\mu\text{L}$  протеиназе К и 200  $\mu\text{L}$  *AL* пуфера за лизу док су мозгови лизирани са 20  $\mu\text{L}$  протеиназе К и 200  $\mu\text{L}$  *ATL* пуфера за лизу. Лизирање се одвијало у термомиксеру при ротацији од 500 обртаја у минути, на 56°C од 10 минута до 24 сата, у зависности од типа узорка, односно све до потпуног лизирања узорка. По завршетку лизе ткива су остављана у термомиксеру још 10 минута на температури од 70°C уз додавање 200  $\mu\text{L}$  *AL* пуфера. У следећем кораку је додавано 200  $\mu\text{L}$  етанола, вортексовано 15 сек и пребацивано у колонице са мембраном, које су затим центрифуговане 1 минут на 8000 обртаја у минути. ДНК се везивала за мембрану а остаци ћелија су испирани прво са 500  $\mu\text{L}$  *AW1* пуфера центрифуговањем 1 минут на 8000 обртаја у минути, а затим са 500  $\mu\text{L}$  *AW2* пуфера центрифуговањем 5 минута на 13000 обртаја у минути. Да би се сав пуфер испрао из мембране, колоница је још једном центрифугована 3 минута на 13000 обртаја. У колоницу је затим укапано 50  $\mu\text{L}$  воде без нуклеаза и после инкубације од 5 минута на собној температури центрифуговано 1 минут на 8000 обртаја. Да би се добила већа количина ДНК последњи корак је поновљен са још 50  $\mu\text{L}$  воде да би се на крају добила финална запремина од 100  $\mu\text{L}$  ресуспендоване ДНК.

Као позитивна контрола коришћена је ДНК екстрахована из RH соја. RH сој се континуирано одржава у НРЛТ серијским интраперитонеалним пасажама на *Swiss Webster* мишевима. Редовне пасаже се врше инокулацијом суспензије од  $2 \times 10^6$  паразита / mL у стерилном физиолошком раствору, са додатком антибиотика

широког спектра (гентамицин, 100  $\mu\text{L}$  по мишу концентрације 0,8 mg/mL), у перитонеалну шупљину мишева. Паразити су сакупљани из перитонеалног ексудата стерилним шприцем три дана после инокулације и затим пречишћавани испирањем физиолошким раствором и центрифуговањем 5 минута на 3000 обртаја у минути, три пута. Број паразита који је разблаживан у физиолошком раствору до концентрације од  $1 \times 10^3$  паразита / mL одређиван је на „Bürker-Türk” коморици а затим је из 200  $\mu\text{L}$  овог раствора екстрахована ДНК.

### 3.2.4.2. PCR у реалном времену

Детекција ДНК вршена је умножавањем дела секвенце (ампликона) 529 бп региона, који се у геному *T. gondii* понавља 200-300 пута (*GenBank accession number AF146527*) (Homan *et al.*, 2000) (Прилог 1). Умножавање ампликона и његова детекција вршени су на *Mastercycler® ep realplex* апарату (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*).

Протокол који је први уведен у нашу лабораторију, по заснивању Лабораторије за молекуларну дијагностику, се заснивао на амплификацији дела 529 бп региона помоћу прајмера 529 fo и 529 re, док су ампликони детектовани помоћу *TaqMan* пробе „probe 529“ (Табела 2). Помоћу ових прајмера уможавана је секвенца дужине 125 бп (Прилог 1). Протокол је добијен љубазношћу др Helene Yera из *Hôpital Cochin, AP-HP, Universite Paris Descartes*, Париз, Француска.

**Табела 2.** Секвенце прајмера и проба и rtPCR програм коришћени за детекцију региона 529 бп *T. gondii*

	Назив	Секвенца
Прајмери	529 for	5'- TGGTTGGGAAGCGACGAGAG
	529 rev	5'- CATCACCACGAGGAAAGCGTC
Проба	probe 529	5'-6-carboxyfluorescein-AG[+A]GA[+C]AC[+C]GG[+A]ATGCG[+A]T-BHQ1
rtPCR програм		2 мин 50°C
		10 мин 95°C
		50X 15 сек 95°C 1 мин 60°C

За укупан број узорака у реакцији прављене су три реакционе смеше за rtPCR. Прво је прављен основни микс који се, по узорку састојао од 12,5  $\mu\text{L}$  *TaqMan* мастер микса са N-урацил гликозилазом (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) у чији састав улазе *Taq* ДНК полимераза,  $\text{MgCl}_2$ , dNTP и пуфер, 1  $\mu\text{L}$  пробе 529 концентрације 5  $\text{pmol}/\mu\text{L}$ , 0,5  $\mu\text{L}$  сваког прајмера концентрације 40  $\text{pmol}/\mu\text{L}$  (529 fo и 529 re) и 3,75  $\mu\text{L}$  стерилне дестиловане воде (Табела 3).

**Табела 3.** Реакциона смеша за rtPCR за детекцију ДНК *T. gondii* по узорку

Основни микс	Волумен у $\mu\text{L}$	Фин. конц.
<i>TaqMan</i> мастер микс	12,5	
проба 529 (5 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ )	1	200nM
прајмер 529 fo (40 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ )	0,5	800nM
прајмер 529 re (40 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ )	0,5	800nM
вода	3,75	
Укупна запремина	18,25	

Затим је прављен микс са интерном контролом када је основном миксу додавано 0,25  $\mu\text{L}$  пробе CI концентрације 5  $\text{pmol}/\mu\text{L}$ , 0,25  $\mu\text{L}$  сваког прајмера концентрације 40  $\text{pmol}/\text{Ml}$  (CI 1 и CI 2) и 1  $\mu\text{L}$  екстраховане ДНК интерне контроле (Табела 4 и 6). Укупна запремина микса са интерном контролом износи 20  $\mu\text{L}$  и њему је додавано 5  $\mu\text{L}$  екстраховане ДНК из узорка.

**Табела 4.** Реакциона смеша за rtPCR за детекцију интерне контроле по узорку

Микс са интерном контролом	Волумен у $\mu\text{L}$	Фин. конц.
Основни микс	18,25	
проба CI (5 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ )	0,25	50nM
прајмер CI 1 (40 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ )	0,25	400nM
прајмер CI 2 (40 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ )	0,25	400nM
интерна контрола ( $10^{-20}/10\mu\text{L}$ )	1	$10^{-21}$
Укупна запремина	20	



На крају је прављен микс без интерне контроле тако што је основном миксу додавано 1,75  $\mu\text{L}$  стерилне дестиловане воде и добијена је запремина од 20  $\mu\text{L}$  у коју је додавано 5  $\mu\text{L}$  екстраховане ДНК из узорка (Табела 5).

**Табела 5.** Реакциона смеша за rtPCR по узорку

Микс без интерне контроле	Волумен у $\mu\text{L}$
Основни микс	18,25
Вода	1,75
Укупна запремина	20

Узорци су тестирани неразблажени са и без интерне контроле, као и разблажени у односу 1:10 са интерном контролом. Узорци су тестирани са некомпетитивном интерном контролом која се састоји од егзогене ДНК инсертоване у плазмид (*PCR 2.1 vector; Invitrogen, France*) да би детектовали присуство rtPCR инхибитора. Амплификација интерне контроле у узорцима је поређена са амплификацијом интерне контроле у узорку негативне контроле и када је разлика била већа од три и више rtPCR циклуса сматрало се да је дошло до инхибиције.

**Табела 6.** Секвенце прајмера и проба и rtPCR програм коришћени за детекцију интерне контроле

	Назив	Секвенца
Прајмери	CI1	5'- CGCCCCGAAGAACGTTTT
	CI2	5'- CGCGCCACATAGCAGAACTT
Проба	probe CI	5'- VIC-CAATGATGAGCACTTTT-MGB
rtPCR програм		2 мин 50°C
		10 мин 95°C
		50X 15 сек 95°C
		1 мин 60°C

Свака реакција је укључивала негативну контролу екстракције (стерилна дестилована вода), позитивну екстракциону контролу разблажену тако да да

резултат од 0,5 и 5 еквивалента генома *T. gondii* по реакцији, негативну rtPCR контролу (екстракт ДНК претходно доказан као негативан) и позитивну rtPCR контролу (екстракт ДНК претходно доказан као позитиван). Узорак је сматран позитивним ако је било који од трипликата био позитиван.

Програм за амплификацију токсоплазматске ДНК састојао се од три корака. Први корак је инкубација ензимом UNG у трајању од 2 минута на 50°C, други је почетна денатурација ДНК молекула, 10 минута на 95°C, а трећи чине два подкорака и то денатурација од 15 секунди на 95°C и елонгација и везивање прајмера, 1 минут на 60°C, који се понављају 50 пута (Табела 2).

С обзиром на то да се овај протокол заснивао на специјално модификованим пробама чија је цена вишеструко већа од класичних *TaqMan* проба, у сарадњи са др Isabelle Villena која води Француску Националну референтну лабораторију за токсоплазмозу која се налази на Универзитету у Ремсу, установљен је нови протокол који је после оптимизације показао већу осетљивост посебно код узорака животињског порекла.

По овом протоколу део секвенце (ампликона) 529 бп региона умножаван је помоћу прајмера HO1(f) и HO2(r), а добијени ампликони су детектовани помоћу *TaqMan* пробе HOFT (Табела 8).

Да би оптимизовали реакцију rtPCR протокол је прво испробан на екстрактима ДНК пореклом од RH соја. Оптимизација је пре свега подразумевала одређивање најоптималније концентрације прајмера и проба као и температуре на којој су се прајмери најбоље везивали за нуклеотидну секвенцу. Најоптималнија температура везивања прајмера за денатурисану ДНК одређена је на уређају за конвенционални PCR, са опцијом градијента, тако што је за исту реакцију, током истог програма задато 6 различитих температура. Овако добијени PCR производи су потом анализирани електрофорезом на агарозном гелу а одабрана је температура чија је трака на гелу показивала најчистији сигнал. Почетни волумен прајмера и проба који се користио у реакцији била је 0,5  $\mu\text{L}$  да би касније био смањен на 0,3  $\mu\text{L}$ , при чему је концентрација остала иста. Такође, укупна запремина реакционе смеше по узорку, која је на у почетку износила 25  $\mu\text{L}$ , смањена је на 20  $\mu\text{L}$ , што је аутоматски довело да смањеног удела *TaqMan* мастер микса са 12,5 на 10  $\mu\text{L}$ . Повећана је и концентрација  $\text{MgCl}_2$  са 25 mM на 50 mM, а

уместо 5  $\mu\text{L}$  екстракта ДНК, додавано је 3  $\mu\text{L}$ . Како је прелиминарним испитивањима показано да су све ове адаптације уродиле повећањем осетљивости, и број циклуса у програму је такође смањен у односу на оригинални протокол добијен из Француске, са 45 на 40 циклуса. Сва поменута подешавања довела су до тога да је оваквим протоколом оптимизована *rtPCR* реакција до најповољнијег односа осетљивости и специфичности у односу на економску исплативост.

Контрола квалитета протокола *rtPCR* методе која се користи за молекуларну дијагностику токсоплазмозе у нашој лабораторији, и ради се једном годишње у оквиру *QCMD* програма (*Toxoplasma DNA EQA Program*), показала је осетљивост од 1 *T. gondii*/mL узорка.

Реакциона смеша за *rtPCR* прављена је за укупан број узорака у реакцији и разливана у стерилне *rtPCR* тубице. Финална запремина реакционе смеше по узорку износила је 20  $\mu\text{L}$  и састојала се од 3  $\mu\text{L}$  неразблажене екстраховане ДНК, 0,3  $\mu\text{L}$  сваког прајмера концентрације 25 pmol/ $\mu\text{L}$  (НО1 и НО2), 0,3  $\mu\text{L}$  пробе концентрације 10 pmol/ $\mu\text{L}$  (НОFT), 1  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  концентрације 50 mM, 5,1  $\mu\text{L}$  воде без нуклеаза и 10  $\mu\text{L}$  *TaqMan* мастер микса са N-uracil гликозилазом (*Maxima® Probe qPCR Master Mix (2X)*, *Fermentas*) у чији састав улазе Таq ДНК полимераза, dNTP и пуфер (Табела 7).

**Табела 7.** Реакциона смеша за *rtPCR* за детекцију ДНК *T. gondii* по узорку

Основни микс	Волумен у $\mu\text{L}$	Фин. конц.
<i>TaqMan</i> мастер микс	10	
проба НОFT (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0,3	150nM
прајмер НО1 (25 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0,3	375nM
прајмер НО2 (25 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0,3	375nM
$\text{MgCl}_2$ (50 mM)	1	2.5mM
Вода	5,1	
Укупна запремина	17	

Свака реакција је укључивала једну позитивну контролу, једну rtPCR негативну контролу и једну негативну контролу (вода без нуклеаза). PCR негативне контроле код којих није детектована ДНК *T. gondii* у контролној rtPCR реакцији добијене су екстраховањем ДНК пореклом из крви серолошки негативног пацијента односно из мозга здравог миша. Све контроле и узорци су рађени у дупликату, са изузетком крви, плодове воде, очне водице, ликвора и БАЛ који су рађени у трипликату. Позитивним је сматран узорак код кога је у најмање једном поновку доказана ДНК *T. gondii*.

Програм за амплификацију токсоплазматске ДНК састоји се од три корака. Први корак је 2 минута на 50°C, други 10 минута на 95°C, а трећи чине два подкорака од 15 секунди на 95°C и 1 минут на 60°C који се понављају 40 пута (Табела 8). Овим протоколом добијан је продукт величине 81 бп (прилог 1).

**Табела 8.** Секвенце прајмера и проба и rtPCR програм коришћени за детекцију региона 529 бп *T. gondii*

	Назив	Секвенца
Прајмери	HO1	5'-AGAGACACCGGAATGCGATCT
	HO2	5'-CCCTCTTCTCCACTCTTCAATTCT
Проба	HOFT	5'-6FAM-ACGCTTTCCTCGTGGTGATGGCG-TAMRA
rtPCR програм		2 мин 50°C 10 мин 95°C 40X 15 сек 95°C 1 мин 60°C

Да би детектовали инхибиторе rtPCR реакције, ДНК плазида (1 pg/mL) је додавана свим узорцима у другој реакцији. У случају присуства инхибитора 8 µg говеђег албумин серума (*Boehringer*) је додавано меши у новој реакцији пре амплификације (Villena и сар., 2004). Умножавање ампликона, који представља део B1 гена *T. gondii* претходно убачен у плазмид, рађено је помоћу прајмера B1F и B1R а њихова детекција помоћу *TaqMan* пробе B1SFT. Прајмери и проба, као и rtPCR програм који се користио за амплификацију ове ДНК приказани су у Табели 9. Реакциона смеша за ову rtPCR реакцију прављена је исто као и за

амплификацију 529 бп региона, осим што су коришћени прајмери B1F и B1R и проба B1SFT (Табела 10).

**Табела 9:** секвенце прајмера и проба и rtPCR програм коришћени за детекцију B1 гена *T. gondii*

	Назив	Секвенца
Прајмери	B1F	5'-TTCAAGCGTCAAAACGAACTAT
	B1R	5'-CTCATTTCTGGGTCTACGTCG
Проба	B1SFT	5'-FAM- ATGGCATGACAACCTGGGCAG -TAMRA
rtPCR програм		2 мин 50°C 10 мин 95°C 40X 15 сек 95°C 1 мин 60°C

**Табела 10.** Реакциона смеша за rtPCR за детекцију интерне контроле по узорку

Микс за интерне контроле	Волумен у $\mu\text{L}$	Фин. конц.
<i>TaqMan</i> мастер микс	12,5	
проба B1SFT (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0,5	200nM
прајмер B1f (25 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0,5	500nM
прајмер B1r (25 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0,5	500nM
Вода	6	
Укупна запремина	20	

Као додатна провера да је rtPCR методом амплификован регион очекиване величине сви PCR продукти, као и позитивна и негативна контрола, анализирани су електрофорезом. Електрофореза је вршена на 3% агарозном гелу у трајању од 45 минута до сат времена на 90 волти. Гел је прављен од 3 g агарозе са 100 mL пуфера TAE 1X (*Tris-Acetate-EDTA*) и обојен са 3  $\mu\text{L}$  етидијум бромидом (10mg/mL). Пре укапавања узорача у бунарчиће гела на парафилму је помешано 10  $\mu\text{L}$  PCR продукта са 2  $\mu\text{L}$  "DNA loading dye" (*Fermentas*). Поред узорача у бунарчиће гела додавано је и 2  $\mu\text{L}$  маркера "50bp ladder" (*Fermentas*), да би се одредила величина продукта (у базним паровима). Сваки гел је читаван

постављањем на УВ трансилуминатор (*Gel Documentation system/CCD, Biometra*), фотографисан и затим анализиран одговарајућим софтвером.

С обзиром на то да је код свих техника заснованих на PCR потенцијалан проблем контаминација, у овом истраживању су предузете све неопходне противмере укључујући рад са стерилисаним потрошним материјалом, у ламинарним коморама са ХЕПА филтерима и УВ светлом, као и уз поштовање протокола о радној процедури.

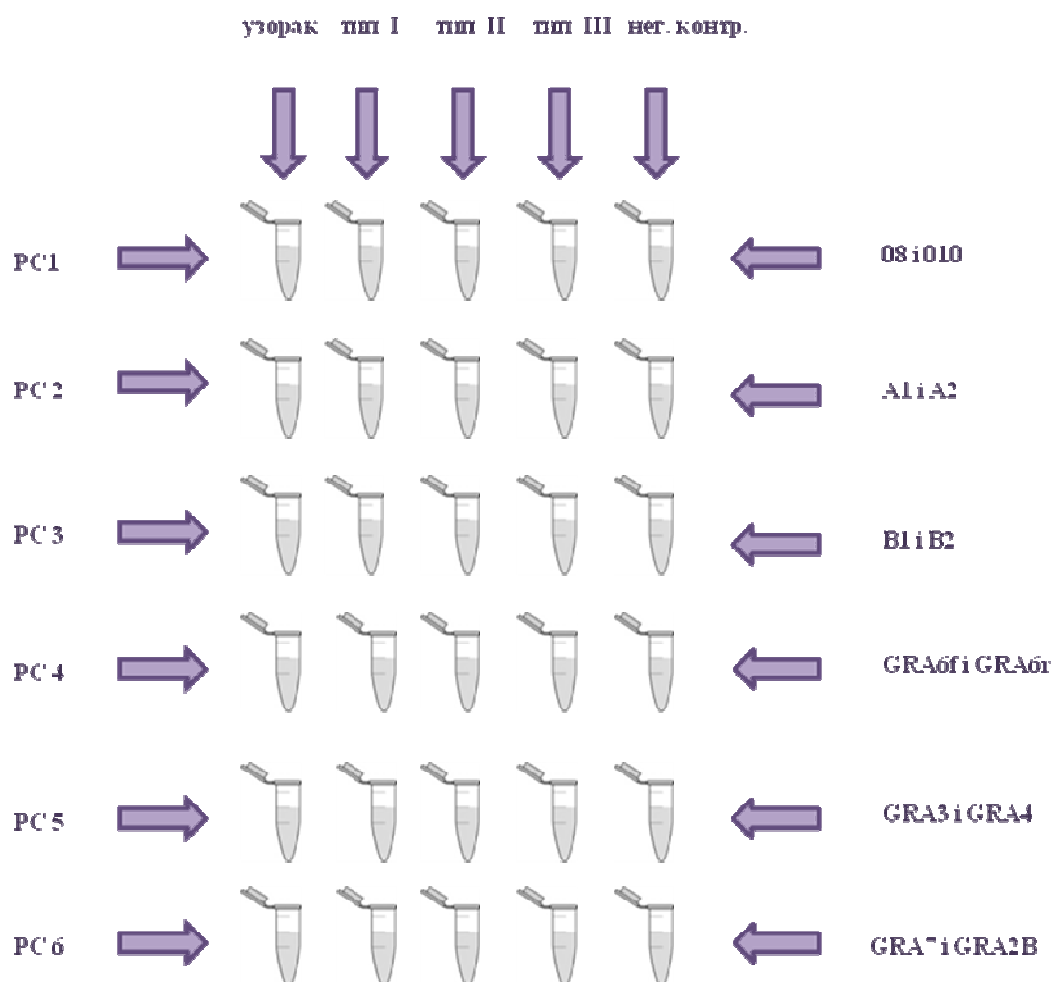
### 3.2.4.3. Генотипизација

Припадност неком од клонских типова *T. gondii* одређивана је генотипизацијом помоћу 4 генска маркера. Умножавани су региони који се налазе на четири различита гена (SAG1, SAG2, GRA6 и GRA7). Анализирани гени се налазе на различитим хромозомима и то SAG1 и SAG2 на хромозому VIII, GRA6 на хромозому X и GRA7 на хромозому VIIa.

Генотипизација је рађена пре свега из узорака који су иницијално имали већу концентрацију ДНК као и код узорака код којих је концентрација ДНК повећана методом обогаћивања, односно код свих узорака који су имали Ct вредност на rtPCR мању од 30.

Метода којом је рађена генотипизација, PCR-RFLP, заснива се на PCR амплификацији секвенце из генома *T. gondii* а затим дејству рестрикционих ензима на добијене PCR продукте.

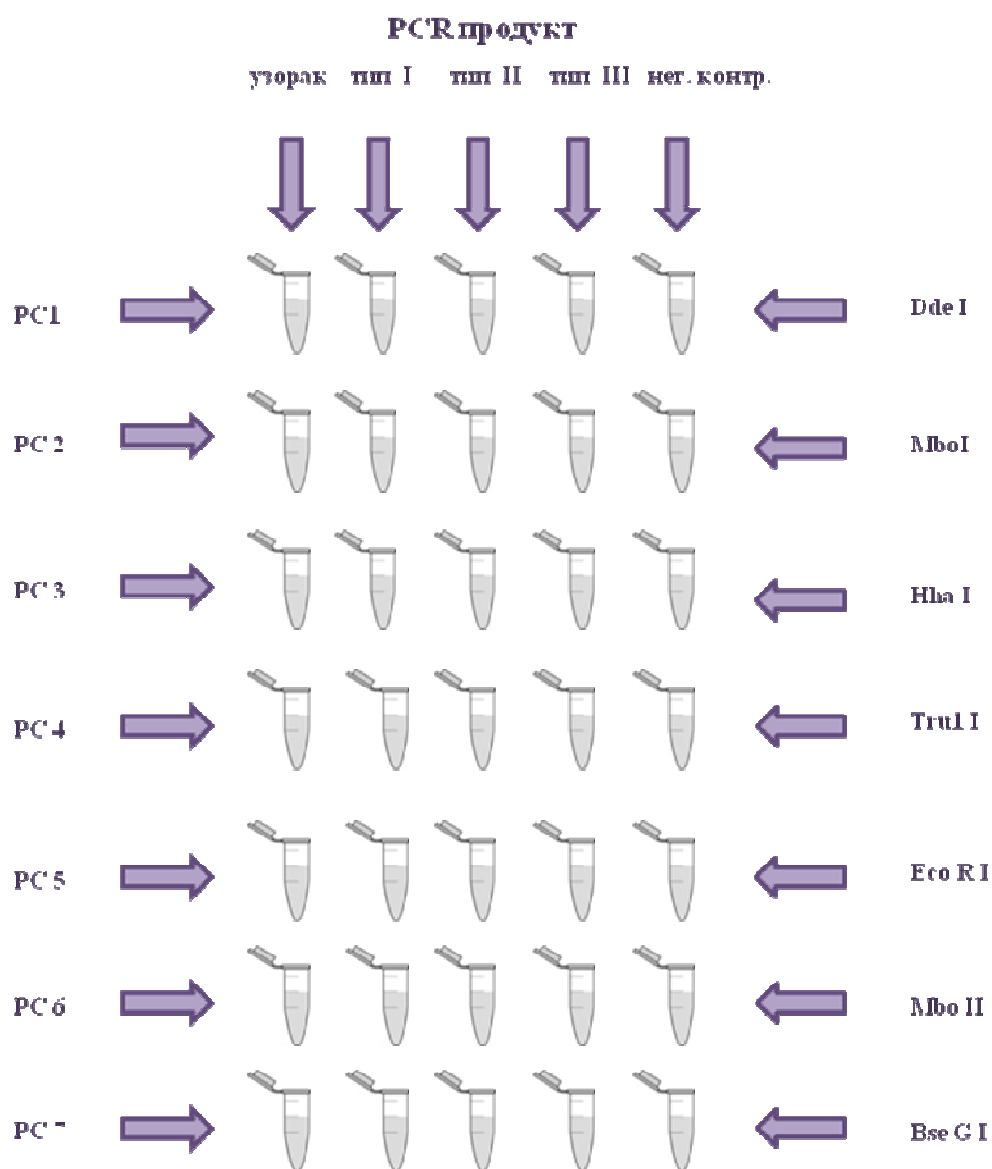
За PCR реакцију припремана је смеша која се састојала од 12,5  $\mu\text{L}$  готовог мастер микса (*PCR Master Mix (2X), Fermentas*) у чији састав улазе *Taq* ДНК полимераза,  $\text{MgCl}_2$ , dNTP и пуфер, затим 8,5  $\mu\text{L}$  воде без нуклеаза и по 1  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{M}$  одређеног пара прајмера за један од четири генска маркера. Запремина смеше износила је 23  $\mu\text{L}$  у коју је додавано 2  $\mu\text{L}$  ДНК из испитиваног узорка тако да је финална запремина износила 25  $\mu\text{L}$ . За сваки узорак, као и контроле, прављено је по 6 реакционих смеша (за сваки пар прајмера по једна) да би добили умножена сва четири маркера за сваки узорак (Слика 10).



Слика 10. Схематизован приказ припреме реагенса за PCR (PC – реакциона смеша)

Парови прајмера за амплификацију делова секвенци SAG1, SAG2, GRA6 и GRA7 као и одговарајући PCR програми, који су се разликовали у зависности од региона који је био умножаван, наведени су у Табели 11 и 13.

У другом кораку је прављено 7 реакционих смеша за сваки од 7 различитих рестрикционих ензима. Свака реакциона смеша се прави од 12,5  $\mu\text{L}$  воде, 2,5  $\mu\text{L}$  пуфера који иде уз одговарајући ензим и 0,5  $\mu\text{L}$  одговарајућег рестрикционог ензима, сваки концентрације 10 U/mL изузев ензима *Mbo II* чија је концентрација 5 U/mL. Запремина смеше износила је 15  $\mu\text{L}$  у коју се додаје 10  $\mu\text{L}$  PCR продукта из првог корака тако да је финална запремина износила 25  $\mu\text{L}$  (Слика 11). Места где рестрикциони ензими секу ДНК секвенцу приказана су у Табели 12.



**Слика 11.** Схематизован приказ припреме реагенса за рестрикциону дигестију PCR продукта (PC – реакциона смеша)



**Табела 11.** Протокол генотипизације

генски маркер	SAG 1	SAG 2		GRA 6	GRA 7	
прајмери	08(f) и 010(r)	A1 и A2	B1 и B2	GRA6(f) и GRA6(r)	GRA7 и GRA2B	GRA3 и GRA4
PCR програм	3 мин 94°C 20 сек 94°C 40X 30 сек 56°C 30 сек 72°C 5 мин 72°C	5 мин 94°C 20 сек 94°C 40X 30 сек 60°C 1 мин 72°C 5 мин 72°C	5 мин 94°C 20 сек 94°C 40X 30 сек 60°C 1 мин 72°C 5 мин 72°C	5 мин 95°C 45 сек 94°C 35X 1 мин 56°C 1 мин 72°C 10 мин 72°C	5 мин 95°C 20 сек 94°C 40X 20 сек 60°C 30 сек 72°C 5 мин 72°C	5 мин 95°C 20 сек 94°C 40X 20 сек 60°C 30 сек 72°C 5 мин 72°C
ензим	Dde I	Mbo I	Hha I	Tru1 I	Eco R I Mbo II	Bse G I
дигестија	4 сата 37°C	4 сата 37°C	4 сата 37°C	4 сата 65°C	4 сата 37°C	4 сата 55°C
заустављање дигестије	10 мин 65°C	10 мин 65°C	10 мин 65°C	0,1M EDTA	10 мин 65°C	20 мин 80°C

**Табела 12.** Места сечења нуклеотидне секвенце рестрикционим ензимима

генски маркер	SAG 1	SAG 2		GRA 6	GRA 7		
ензим	Dde I	Mbo I	Hha I	Tru1 I	Eco R I	Mbo II	Bse G I
место исецања	5'..C↓TNAG..3'	5'..↓GATC..3'	5'..GCG↑C..3'	5'..T↓TAA..3'	5'..G↑AATTC..3'	5'..GAAGA(N) <sub>8</sub> ↑..3' 3'..CTTCT(N) <sub>7</sub> ↑..5'	5'..GGATGNN↑..3' 3'..CCTAC↑NN..5'

Табела 13. Прајмери и њихове секвенце који се користе за PCR-RFLP

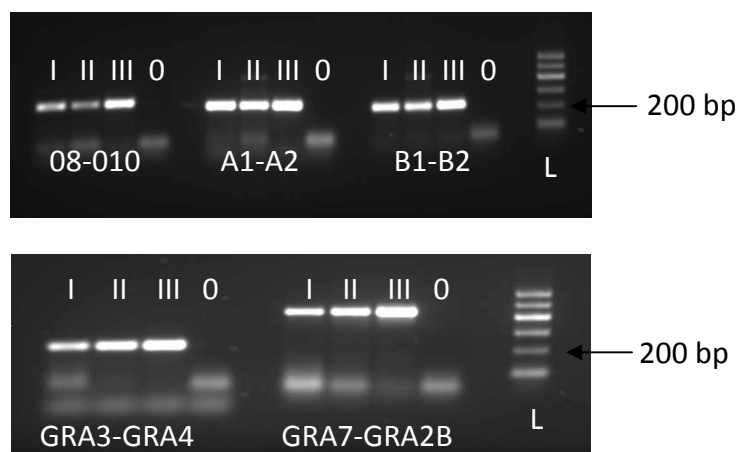
генски маркер	прајмери	секвенце
SAG 1*	08(f) 010(r)	5'-TCCTGTCAAGTTGTCTGCGG 5'-ATCCCCCTGTGCATCCAATA
SAG 2*	A1 A2	5'-GAAATGTTTCAGGTTGCTGC 5'-GCAAGAGCGAACTTGAACAC
	B1 B2	5'-AACGTTTCACGAAGGCACAC 5'-ATTCTCATGCCTCCGCTTC
GRA 6**	GRA6(f) GRA6(r)	5'-TTTCCGAGCAGGTGACCT 5'-TCGCCGAAGAGTTGACATAG
GRA 7*	GRA7 GRA2B	5'-TTCCGACGCTGAAGTGAAGTGC 5'-ACACTGTCTCGAGCTCCTA
	GRA3 GRA4	5'-ACCCTATATTGGGGCTTGCT 5'-TCGGTCTGAGACTGTCAACG

\*секвенце прајмера преузете из протокола који се користи у Француској Националној референтној лабораторији за токсоплазмозу

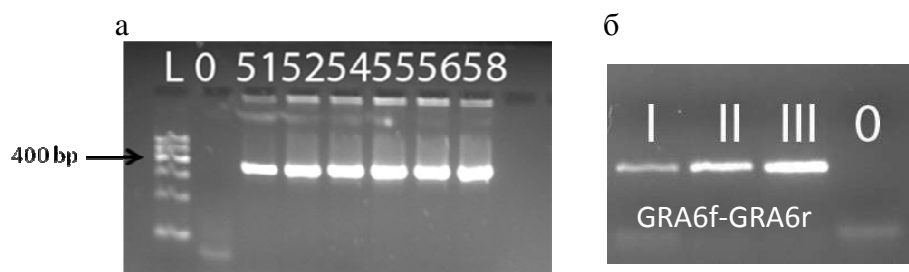
\*\*секвенце прајмера преузете из рада Su и сар., 2006

Као позитивна контрола за сваки од три клонска типа коришћена је ДНК претходно екстрахована из изолата за који је већ одређено ком типу припада. Тако да је као контрола типа I коришћен RH сој, типа II BGD1 сој, а као контрола типа III NED сој. Сојеви RH и BGD1 се одржавају у НРЛТ, Института за медицинска истраживања у Београду редовним пасажама кроз мишеве, док је сој NED добијен од Проф. Isabelle Villena из Лабораторије за Паразитологију и Микологију, Универзитета у Ремсу у Француској.

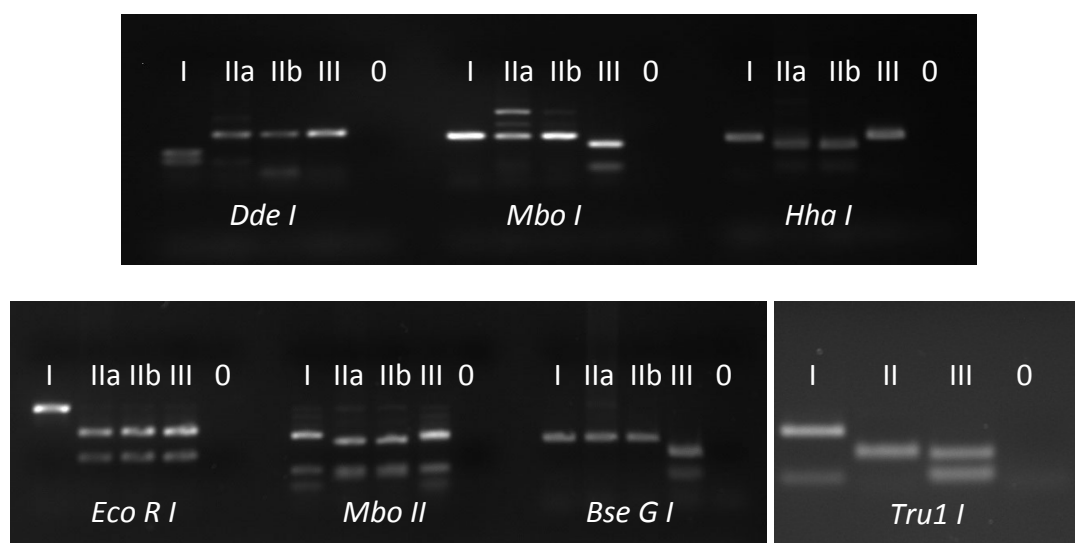
Регион који се умножава једним паром прајмера на SAG1 гену има 269 бп (видети Прилог 2, Слика 12) код сва три клонска типа. После деловања рестрикционог ензима *Dde I*, који сече само тип I, могуће је разликовати тај клонски тип од преостала два. Деловањем ензима на изолате типа I добијају се два умножена фрагмента величине од 156 и 113 бп која се преклапају на гелу због тога што су сличне величине, тако да се виде као једна трака (Слика 14). На изолате типа II и III не делује овај рестрикциони ензим, тако да се на гелу уочава такође једна трака али величине 269 бп.



**Слика 12.** PCR продукти (I, II, III-позитивне контроле типови I, II, III; 0-негативна контрола; 08-010, A1-A2, B1-B2, GRA3-GRA4, GRA7-GRA2B- парови прајмера за SAG1, SAG2 и GRA7; L-маркер)



**Слика 13.** а) PCR продукти RH соја умножени паром прајмера за GRA6 (0-негативна контрола; 51-58-градијент темература, L-маркер); б) PCR продукти (I, II, III-позитивне контроле типови I, II, III; 0- негативна контрола, GRA6f-GRA6r-парови прајмера за GRA6)



**Слика 14.** Фрагменти добијени деловањем рестрикционих ензима на PCR продукте типа I, II и III (0-негативна контрола; *Dde I*, *Mbo I*, *Hha I*, *Eco R I*, *Mbo II*, *Bse G I*, *Tru1 I*-рестрикциони ензими)

Код *SAG2* гена умножавају се два региона са два пара прајмера, који дају продукте величине 242 и 222 бп (видети Прилог 3, Слика 12) код све три клонске линије. Рестрикциони ензими, *Mbo I* (сече само тип III) за PCR продукт умножен паром прајмера A1-A2 и *Hha I* (сече само тип II) за PCR продукт умножен паром прајмера B1-B2, не делују на изолате типа I тако да се умножени региони овог клонског типа на гелу виде као једна трака. Рестрикциони ензим *Mbo I* неће деловати на PCR продукте пореклом из изолата типа II тако да се фрагмент од 242 бп види као једна трака на гелу, док се после деловања рестрикционог ензима *Hha I* добијају два продукта различитих дужина, од 169 и 53 бп. Ови продукти ће се на гелу видети као две траке. После дигестије рестрикционим ензимом *Mbo I* на PCR продукте пореклом из изолата типа III добијају се два фрагмента од 186 и 56 бп, која се на гелу виде као две траке. Рестрикциони ензим *Hha I* не делује на изолате типа III тако да се фрагмент дужине 222 бп види као једна трака на гелу (Слика 14).

Рестрикциони ензим који делује на умножени регион *GRA6* гена (344 бп) (Слика 13) је *Tru1 I* (*Mse I*) и он сече сва три клонска типа али на различитим местима (видети Прилог 4). После деловања овог ензима на PCR продукт

пореклом из изолата типа I добијају се два фрагмента од 258 и 86 бп, који ће се на гелу видети као две траке. Дигестијом PCR продуката пореклом из изолата типа II добијају се такође два фрагмента од 161 и 183 бп, који ће се на гелу видети као једна трака. PCR продукти пореклом из изолата који припадају типу III после деловања рестрикционог ензима *TruI I* дају три фрагмента од по 161, 97 и 86 бп који ће се на гелу видети као две траке (Слика 14).

На GRA7 гену умножена су два региона са два пара прајмера, величине 438 и 231 бп (видети Прилог 5, Слика 12) код све три клонске линије. Рестрикциони ензими који делују на PCR продукт умножен паром прајмера GRA7-GRA2B су *EcoR I* (сече све изузев типа I) и *Mbo II* (сече сва три типа), док је *Bse G I* (сече само тип III) ензим који делује на PCR продукт умножен паром прајмера GRA3-GRA4.

Код PCR продукта пореклом из изолата типа I рестрикциони ензим *EcoR I* нема одређено место исецања тако да се на гелу добија само једна трака дужине 438 бп, односно цео PCR продукт умножен паром прајмера GRA7 и GRA2B. После деловања рестрикционог ензима *EcoR I* на изолат типа II, као и на изолат типа III добијају се по два фрагмента од 159 и 279 бп, која се на гелу виде као две траке.

После деловања рестрикционим ензимом *Mbo II* на PCR продукте пореклом из изолата типа I и изолата типа III, добијана су по три фрагмента значајно различитих величина, од по 115, 265 и 58 бп, који су се на гелу уочавали као три траке. Код PCR продуката пореклом из изолата типа II после деловања рестрикционог ензима *Mbo II* добијају се три фрагмента од по 115, 94 и 229 бп, који се на гелу виде као три траке.

Рестрикциони ензим *Bse G I* нема своје место исецања код изолата типа I и II тако да се фрагмент од 231 бп види као једна трака на гелу, док се деловањем овог ензима на изолате типа III добијају два фрагмента од 161 и 70 бп, која се на гелу виде као две траке (Слика 14).

Раздвајање и анализа продуката који су добијени PCR-RFLP методом вршена је електрофорезом на 3% агарозном гелу у трајању од 45 минута до сат времена на 90 волти. Гел је прављен од 3 g агарозе са 100 mL пуфера TAE 1X и обојен са 3  $\mu$ L етидијум бромида (10mg/mL). Пре укапавања узорача у бунарчиће

гела на парафилму је помешано 5  $\mu\text{L}$  или 10  $\mu\text{L}$  PCR-RFLP продукта са 2  $\mu\text{L}$  "DNA loading dye" (*Fermentas*). Поред узорака у бунарчиће гела додавано је и 2  $\mu\text{L}$  "50bp ladder" (*Fermentas*) да би се видело колико базних парова имају продукти. Гел је после завршене електрофорезе читаван постављањем на УВ трансилуминатор (*Gel Documentation system/CCD, Biometra*), фотографисан и анализиран одговарајућим софтвером.

***РЕЗУЛТАТИ***

#### 4.1. Резултати rtPCR-а у материјалу хуманог порекла

Испитивања на хуманом материјалу обављена су на укупно 160 узорака, који су потицали од 127 пацијената са сумњом на акутну токсоплазматску инфекцију. Тип материјала је приказан у Табели 14; већину (103 узорка, 66,4%) чинили су узорци периферне крви, затим следи плодова вода (30 узорака, 18,7%), очна водица (10 узорака, 6,2%), фетална крв (9 узорака, 5,6%), ликвор (7 узорака, 4,4%) и бронхоалвеоларни лават (БАЛ) (1 узорак, 0,6%).

**Табела 14.** Порекло испитиваног материјала

Тип узорка	n
Крв	103
Фетална крв	9
БАЛ	1
Плодова вода	30
Очна водица	10
Ликвор	7
<b>Σ</b>	<b>160</b>

Узорци су испитивани по протоколу НРЛТ који је приказан у поглављу Материјал и методе (Слика 9). Читав протокол је примењен на 114 узорака (76 узорака периферне крви, 28 плодових вода, 9 феталних крви и 1 БАЛ), а код



осталих 46 урађена је комбинација или серологије и rtPCR (15 узорака крви, 10 узорака очне водице и 7 узорака цереброспиналног ликвора) или серологије и Б.О. (12 узорака крви и 2 узорка плодове воде) (Табела 15).

**Табела 15.** Урађене анализе по типу материјала

Тип узорка	Серологија+ rtPCR + Б. О.	Серологија + rtPCR	Серологија + Б. О.	Σ
Крв	76	15	12	103
Крв из пупчаника	9			9
БАЛ	1			1
Плодова вода	28		2	30
Очна водица		10		10
Ликвор		7		7
Σ	114	32	14	160

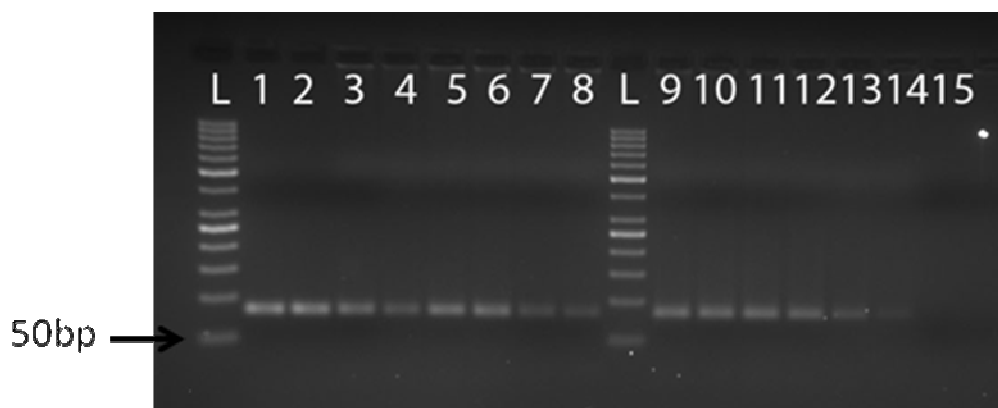
Директно из 146 узорака пореклом од 116 пацијената урађен је rtPCR и као што је приказано у Табели 16, од укупног броја узорака 52 (35,6%) је било rtPCR позитивно.

**Табела 16.** Резултати rtPCR-а из прикупљених узорака

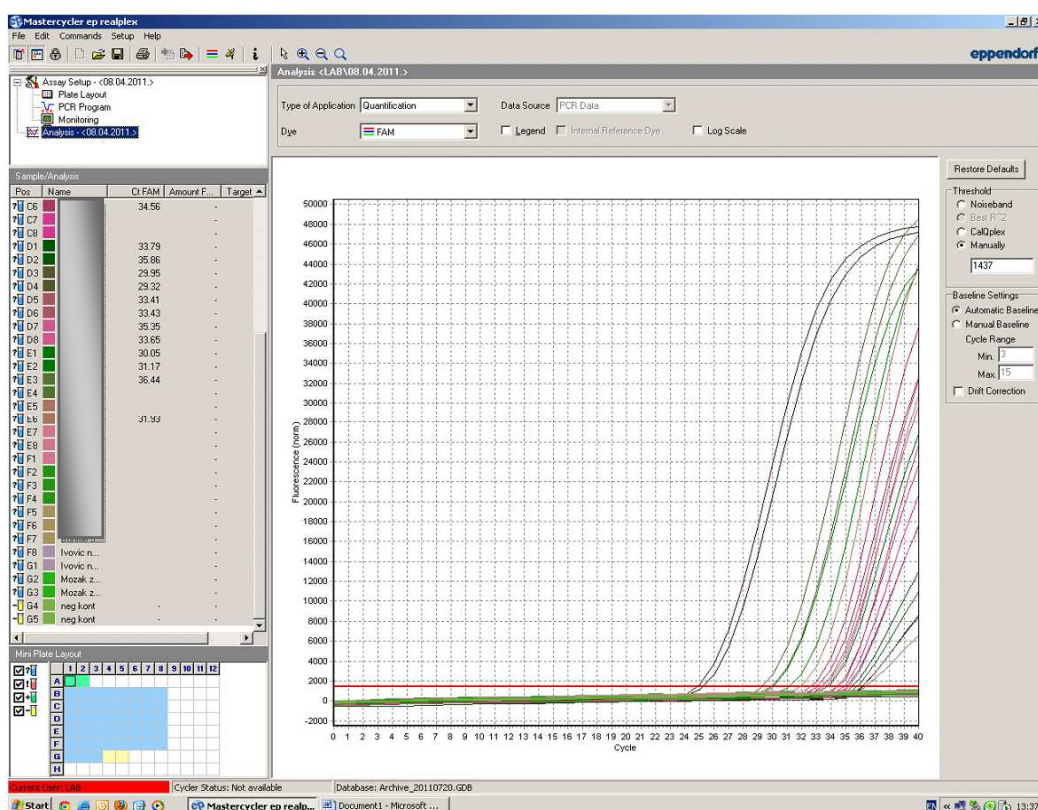
Тип узорка	rtPCR позитиван	
	n	Бр. (%)
Крв	91	28 (30,8)
Плодова вода	28	10 (35,7)
Крв из пупчаника	9	3 (33,3)
БАЛ	1	1 (100)
Очна водица	10	6 (60)
Ликвор	7	4 (57,1)
Σ	146	52 (35,6)

Специфичност реакције је потврђена у свим случајевима анализом свих добијених PCR продуката електрофорезом на 3% гелу и сви узорци су били исте

валичине као и позитивна контрола, 81 бп (Слика 15). Репрезентативан пример изгледа софтверски анализираних резултата *rtPCR*-а приказан је на Слици 16.



Слика 15. *PCR* производи на 3% агарозном гелу (1,2 позитивне контроле - *T. gondii* RH; 3-14 хумани узорци; 15- нег. контрола; L- маркер), репрезентативан пример



Слика 16. Пример *rtPCR* софтверске анализе резултата (n=17 пацијената (затамњено))

Мада се број узорака знатно разликовао по појединим типовима материјала, запажа се да је *rtPCR* био позитиван код око трећине испитаних узорака крви, плодове воде, феталне крви а код чак 57% узорака ликвора и 60% очних водица.

#### **4.1.1. Анализа успешности доказивања ДНК *T. gondii* у односу на серолошки налаз**

У следећем кораку интересовало нас је да испитамо да ли се и како серолошки одговор односно његове компоненте могу повезати са налазом *PCR*-а. У том смислу су анализирани висина авидитета специфичних *IgG* антитела као и налаз специфичних *IgM* антитела.

##### **4.1.1.1. Анализа успешности доказивања ДНК *T. gondii* у односу на авидитет специфичних *IgG* антитела**

У односу на авидитет специфичних *IgG* антитела, одвојено су анализирани пацијенти са ниским авидитетом (који указује на акутну инфекцију) и они са граничним и високим авидитетом, а у односу на специфична *IgM* антитела одвојено су анализирани они са позитивним, граничним и негативним налазом.

##### **4.1.1.1.a. Налаз *rtPCR*-а у узорцима крви која су садржала специфична *IgG* антитела ниског авидитета**

Међу узорцима пореклом од пацијената са специфичним *IgG* антителима ниског авидитета ( $n=58$ ), највећи број, чак 54 (93%), чинили су они у којима су симултано доказана и специфична *IgM* антитела.

Резултати су показали да је ДНК *T. gondii* доказана код скоро једне трећине ових узорака (16/54, 29,6%) (Табела 17).

**Табела 17.** Резултати rtPCR-а у узорцима крви која су садржала специфична IgG антитела ниског авидитета

IgM	rtPCR позитиван	
	n	Бр. (%)
позитиван	54	16 (29,6)
граничан	1	0
негативан	3	0
$\Sigma$	58	16 (27,6)

*4.1.1.1.б. Налаз rtPCR-а у узорцима крви која су садржала специфична IgG антитела граничног авидитета*

У групи пацијената са граничним авидитетом било је свега 4 узорка, међу којима су 3 имала позитиван налаз IgM антитела а 1 је био негативан. Резултати су показали да је rtPCR био позитиван у 2 од укупно 3 (66,7%) узорка, од којих су у оба истовремено била присутна и специфична IgM антитела (Табела 18).

**Табела 18.** Резултати rtPCR-а тестираних узорака крви која су садржала специфична IgG антитела граничног авидитета

IgM	rtPCR позитиван	
	n	Бр. (%)
позитиван	3	2 (66,7)
негативан	1	0
$\Sigma$	4	2(50)

#### 4.1.1.1.v. Налаз *rtPCR*-а у узорцима крви која су садржала специфична *IgG* антитела високог авидитета

Од 9 узорака пореклом од пацијената са специфичним *IgG* антителима високог авидитета, 7 је симултано садржало и специфична *IgM* антитела, од којих је ДНК *T. gondii* је доказана у 3 (42,9%).

ДНК *T. gondii* је доказана и у једном од укупно 2 узорка у којима нису била детектована специфична *IgM* антитела (Табела 19).

**Табела 19.** Резултати *rtPCR*-а тестираних узорака крви која су садржала специфична *IgG* антитела високог авидитета

<b>IgM</b>	<b>rtPCR позитиван</b>	
	<b>n</b>	<b>Бр. (%)</b>
позитиван	7	3 (42,9)
негативан	2	1 (50)
<b>Σ</b>	9	4 (44,4)

#### 4.1.1.2. Анализа успешности доказивања ДНК *T. gondii* у узорцима код којих није испитиван авидитет специфичних *IgG* антитела

Међу испитиваним узорцима крви постојала је и група (n=20) у којој није рађено испитивање авидитета специфичних *IgG* антитела, и то било зато што је концентрација специфичних *IgG* антитела била испод прага потребног за изводљивост теста авидитета, било зато што се радило о неонаталним узорцима у којима ова метода не даје егзактне резултате па се отуда и не примењује. ДНК *T. gondii* је детектована чак у 80% (4/5) узорака који су имали позитиван налаз специфичних *IgM* антитела (Табела 20).

**Табела 20.** Резултати rtPCR-а тестираних узорака крви код којих није рађен авидитет

IgM	rtPCR позитиван	
	n	Бр. (%)
позитиван	5	4 (80)
негативан	15	2 (13.3)
<b>Σ</b>	20	6 (30)

Висока стопа детекције ДНК *T. gondii* у овим узорцима није необична када се узме у обзир да ће се код одраслих суспеткних на акутну инфекцију ниска концентрација специфичних IgG антитела управо јавити на самом почетку инфекције када је и могућност паразитемије а тиме и детекције ДНК *T. gondii* у крви и највећа, а код инфицирних неонатуса зато што је количина добијеног узорка сразмерно знатно већа што повећава вероватноћу детекције паразитске ДНК.

#### 4.1.1.3. Анализа успешности доказивања ДНК *T. gondii* у односу на налаз специфичних IgM антитела

Успешност доказивања ДНК *T. gondii* у односу на налаз специфичних IgM антитела у испитиваним узорцима крви је била 36,2% у узорцима са налазом специфичних IgM антитела, а 14,3% у узорцима у којима ова нису доказана (Табела 21).

**Табела 21.** Резултати rtPCR-а у испитиваним узорцима крви у односу на налаз специфичних IgM антитела

IgM	rtPCR позитиван	
	п	Бр. (%)
позитиван	69	25 (36,2)
граничан	1	0
негативан	21	3 (14,3)

Поређењем резултата rtPCR-а у односу на серолошке маркере акутне инфекције (специфична IgG антитела ниског авидитета и налаз специфичних IgM антитела) запажа се да је успешност детекције ДНК *T. gondii* била нешто виша у узорцима са налазом специфичних IgM антитела него у оним са специфичним IgG антителима ниског авидитета.

#### 4.1.2. Анализа успешности доказивања ДНК *T. gondii* у односу на тип материјала

Затим смо хтели да испитамо да ли успешност доказивања ДНК *T. gondii* зависи од типа материјала из кога се ради анализа и како налази серологије и биолошког огледа корелирају са rtPCR-ом. Серолошке анализе, rtPCR и биолошки огледи урађени су из укупно 114 узорака (Табела 22).

**Табела 22.** Преглед порекла испитиваног материјала

Тип узорка	п
Крв	76
Фетална крв	9
БАЛ	1
Плодова вода	28
$\Sigma$	114

Резултати свих урађених анализа су показали да је проценат позитивних узорака код којих је детектована ДНК пореклом од *T. gondii* виши у односу на резултате биолошког огледа, што се могло и очекивати с обзиром на изузетну осетљивост rtPCR методе (Табела 23).

**Табела 23.** Резултати урађених rtPCR и Б.О. по типу материјала

Тип узорка	n	rtPCR	Б. О. позитиван	
		позитиван	Цисте	Серологија
		Бр. (%)	Бр. (%)	Бр. (%)
Крв	76	27 (35,5)	11 (14,5)	9 (11,8)
Фетална крв	9	3 (33,3)	3 (33,3)	2 (22,2)
БАЛ	1	1 (100)	0	0
Плодова вода	28	10 (35,7)	5 (17,9)	4 (14,3)
<b>Σ</b>	<b>114</b>	<b>41 (36)</b>	<b>19 (16,7)</b>	<b>15 (13,2)</b>

#### 4.1.2.1. Периферна крв

Серолошки налаз у узорцима периферне крви (n=76) и то према резултатима авидитета специфичних IgG антитела и налаза специфичних IgM антитела приказан је у Табели 24.

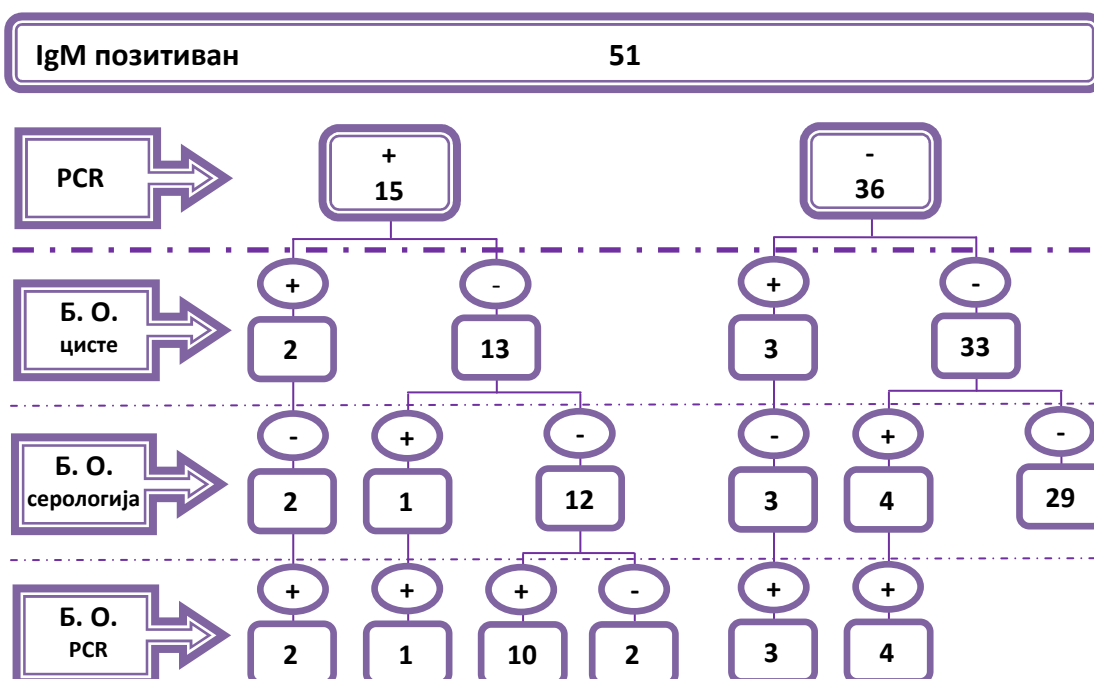
**Табела 24.** Дистрибуција броја узорака крви према резултатима авидитета специфичних IgG антитела и налазима специфичних IgM антитела

IgM	авидитет				Σ
	низак	граничан	висок	није рађен	
позитиван	51	2	2	5	60
граничан	1				1
негативан	2		1	12	15
<b>Σ</b>	<b>54</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>17</b>	<b>76</b>



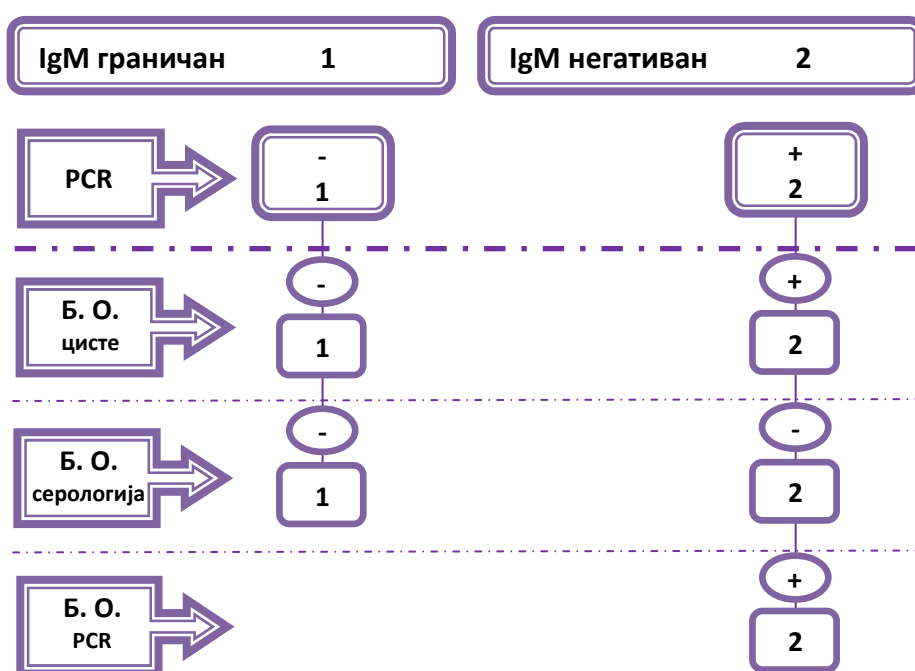
Највећа група узорака (n=51, 94,4%) пореклом је од пацијената са специфичним IgG антителима ниског авидитета и позитивним налазом специфичних IgM антитела. Код ове групе присуство ДНК пореклом од *T. gondii* доказано је у 29,4% (15/51) узорака, док је биолошким огледом 19,6% (10/51) узорака периферне крви било позитивно, било микроскопским прегледом било серолошки (Схема 1).

**Схема 1.** Резултати rtPCR и Б.О. из узорака крви која су садржала специфична IgG антитела ниског авидитета



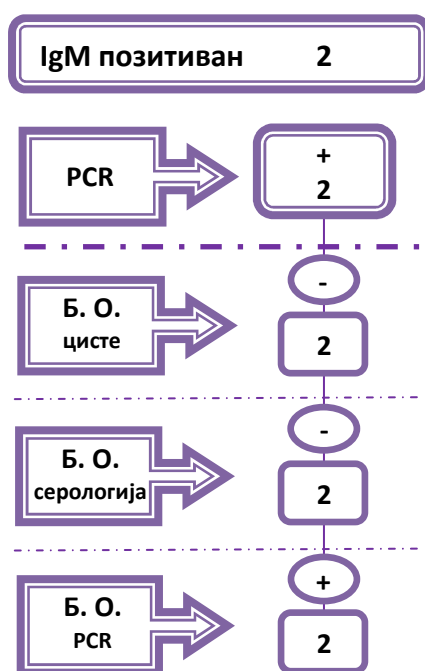
PCR је био позитиван и из два узорка са специфичним IgG антителима ниског авидитета и негативним налазом специфичних IgM антитела, а да се ради о пацијентима у акутној инфекцији додатно је потврђено и биолошким огледима који су били позитивни на микроскопском прегледу и индиректним rtPCR-ом (rtPCR урађен из мозга мишева из биолошког огледа) (Схема 2).

**Схема 2.** Резултати rtPCR и Б.О. из узорака крви која су садржала специфична IgG антитела ниског авидитета



Било је укупно два узорка са специфичним IgG антителима граничног авидитета и са позитивним налазом специфичних IgM антитела, од којих је rtPCR био позитиван у оба и то директно из узорака и из хомогената мозга мишева из биолошких огледа (Схема 3).

**Схема 3.** Резултати rtPCR и Б.О. из узорака крви која су садржала специфична IgG антитела граничног авидитета



Када су у питању узорци који су садржали специфична IgG антитела високог авидитета значајно је да је код једног узорка са негативним налазом специфичних IgM антитела серолошки налаз из биолошког огледа био позитиван као и rtPCR урађен директно и из Б.О. (Схема 4)

**Схема 4.** Резултати rtPCR и Б.О. из узорака крви која су садржала специфична IgG антитела високог авидитета

	IgM позитиван 2		IgM негативан 1
PCR	+ 1	- 1	+ 1
Б. О. цисте	- 1	- 1	- 1
Б. О. серологија	- 1	- 1	+ 1
Б. О. PCR	+ 1		+ 1

Међу узорцима у којима није рађен авидитет специфичних IgG антитела такође се може видети позитивна корелација налаза специфичних IgM антитела и PCR-а где је чак 80% (4/5) узорака са доказаним специфичним IgM антителима било rtPCR позитивно. Биолошким огледом је, било микроскопским прегледом било серолошки, било позитивно 40% (2/5) узорака. Међу узорцима у којима нису доказана специфична IgM антитела 16,7% (2/12) је било позитивно rtPCR-ом док је 25% (3/12) било позитивно биолошким огледом (Схема 5).

**Схема 5.** Резултати rtPCR и Б.О. из узорака крви код којих није рађен авидитет специфичних IgG антитела

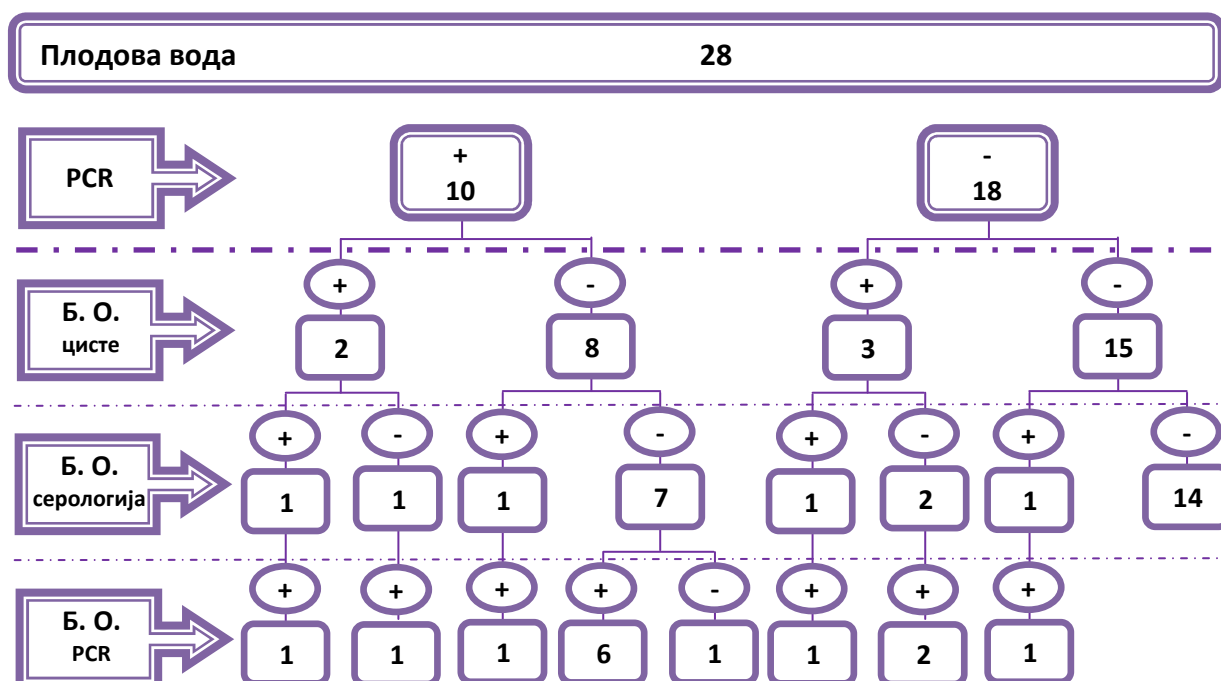


#### 4.1.2.2. Плодова вода

Резултати молекуларне детекције токсоплазме су у узорцима плодове воде поређени у односу на резултате биолошког огледа. Анализе су показале да је од 28 анализираних плодова вода 35,7% (10) било позитивно rtPCR-ом, док је 25% (7/28) узорака било позитивно биолошким огледом (на микроскопском прегледу

и/или серолошки) (Схема 6). Међутим, међу 18 узорака плодове воде који су били негативни директним rtPCR-ом (rtPCR урађен директно из узорка), 4 (22,2%) је било позитивно у Б.О. и то 3 налазом циста, 1 серолошки а сва 4 индиректним rtPCR-ом.

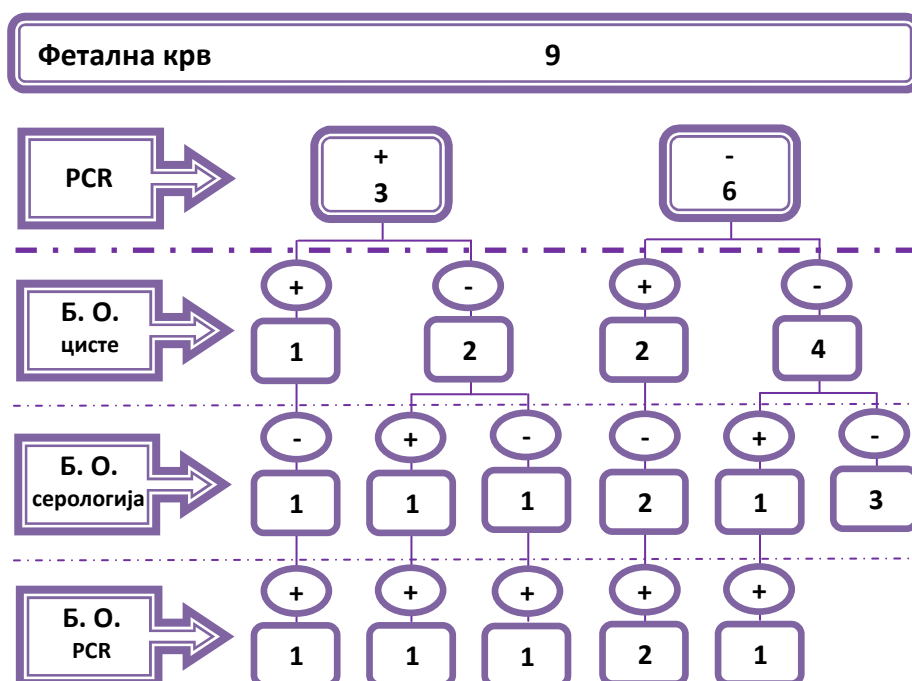
Схема 6. Резултати rtPCR и Б.О. из узорака плодове воде



#### 4.1.2.3. Фетална крв

ДНК *T. gondii* је доказана у 33,3% (3/9) узорака феталне крви, док су резултати биолошког огледа били позитивни, било микроскопским прегледом било серолошки, у 55,5% (5/9) узорака (Схема 7).

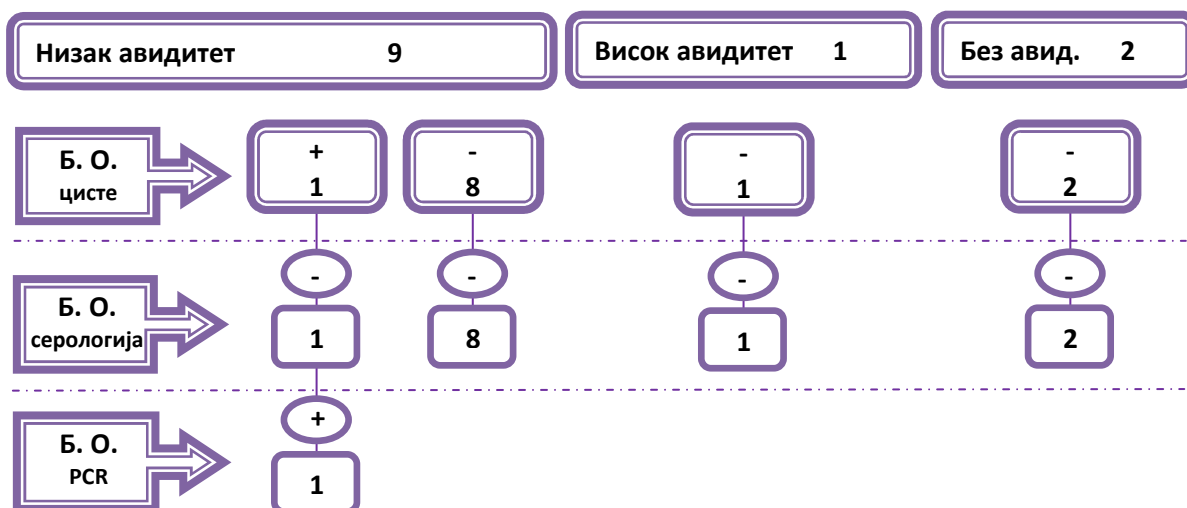
Схема 7. Резултати rtPCR и Б.О. из узоака феталне крви



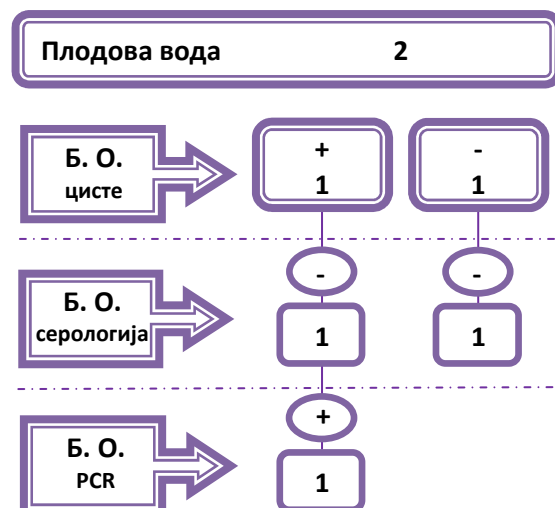
#### 4.1.3. Анализа успешности доказивања ДНК *T. gondii* из биолошког огледа (индиректни rtPCR)

На крају, анализиран је и мањи број узоака периферне крви (n=12) и плодове воде (n=2) код којих су урађене само серолошке анализе и биолошки огледи а не и директни rtPCR (Схема 8 и 9). Цисте *T. gondii* су биолошким огледом изоловане из мозга миша из једног (11,1%) узорка крви, у коме су постојали серолошки маркери акутне инфекције (низак авидитет специфичних IgG антитела са доказаним специфичним IgM антителима), као и из једног (50%) узорка плодове воде. Интересантно је да је позитивност биолошких огледа потврђена и rtPCR-ом тј. налазом ДНК *T. gondii* у мозгу мишева.

**Схема 8.** Резултати Б.О. из периферне крви са доказаним специфичним IgM антителима у односу на авидитет специфичних IgG антитела у којима није урађен директни rtPCR



**Схема 9.** Резултати Б.О. из плодова вода без директно урађеног rtPCR



Значајно је истаћи да су резултати индиректног rtPCR у 92,9% (52/56) случајева потврдили резултате rtPCR који је рађен директно из узорка или резултате микроскопског прегледа и серологије мишева што сматрамо да може бити од посебног значаја код постављања коначне дијагнозе.



## 4.2. Резултати rtPCR-а у материјалу животињског порекла

Материјал животињског порекла који је анализиран у овом истраживању обухватио је мозгове пореклом од 156 глодара и то 144 пацова врсте *Ratus norvegicus* и 12 мишева врсте *Mus musculus*, као и 80 серума пореклом само од пацова.

Од свих сакупљених серума 22 (27.5%) су била позитивна на специфична IgG антитела. Од тога је 13 било позитивно у титру 1:25, 7 у титру 1:50 и по 1 у титру 1:100 и 1:200 (Графикон 1). Од 22 серолошки позитивна пацова код два су микроскопским прегледом нађене цисте и то код оних који су имали специфична IgG антитела у титру 1:25. Цисте су такође уочене и код 9 серонегативних животиња (Табела 25). Ове цисте су биле дијаметра од 13 до 42  $\mu\text{m}$  (Слика 18).

На присуство ДНК *T. gondii* било је позитивно 15 (10.4%) пацова од којих је пет имало морфолошки препознатљиве цисте. Међутим ни један од биолошких огледа постављених од хомогенизованих мозгова пацова који су имали *T. gondii* цисте, није био позитиван ни на микроскопском прегледу ни серолошки што указује на то да микроскопски детектоване цисте нису биле вијабилне.

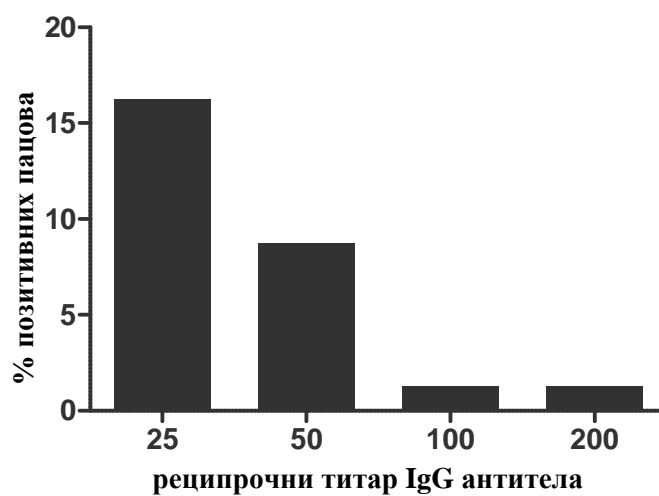
За разлику од пацова, међу мишевима је код чак 10 (83.3%) животиња доказана ДНК *T. gondii*, од којих су три (25%) имале морфолошки препознатљиве цисте (Табела 25; Графикон 1).

Сви продукти rtPCR су анализирани електрофорезом на 3% гелу и сви узорци су били исте величине као и позитивна контрола, 81 бп (Слика 17). Репрезентативан пример изгледа софтверски анализираних резултата rtPCR приказан је на Слици 19.

**Табела 25.** Резултати микроскопског прегледа и молекуларне детекције

Врсте	Број (%) животиња позитивних на <i>T. gondii</i>		
	ДНК	цисте	цисте + ДНК
<b>Пацови (n=144)</b>	15 (10.4%)	11 (7.6%)	<b>5 (3.5%)</b>
<b>Мишеви (n=12)</b>	10 (83.3%)	3 (25%)	<b>3 (25%)</b>

**Графикон 1.** Дистрибуција налаза *T. gondii* специфичних IgG антитела код пацова.



**Слика 17.** PCR продукти на 3% агарозном гелу (1, 2 позитивне контроле - *T. gondii* RH; 3, 4 негативне контроле (вода без нуклеаза и неинфициран мозак миша); 5-12 узорци мозгава пацова), репрезентативан пример



### 4.3. Генотипизација

Одређивање клонског типа *T. gondii* покушано је из узорака код којих је Ct вредност на rtPCR била мања од 30 што је еквивалентно броју од око 170 паразита/mL. Анализирано је укупно 22 узорка, од којих је 19 било хуманог порекла а 3 пореклом од пацова. Генотипизација је била успешна у пет узорака (22.7%), свих пет пореклом од људи. Генотипизирани сојеви су потицали из различитих типова материјала, а сама процедура је извођена идиректно и после обogaћивања (Табела 26).

Табела 26. Генотипизирани узорци

број узорка	ознака	тип материјала	клинички ентитет	генотипизација
1	БНТ	крв	акутна инфекција у трудноћи	после обogaћивања
2	ЧТН	плодова вода	конгенитална токсоплазмоза	после обogaћивања
3	ФАЗ	крв	конгенитална токсоплазмоза	после обogaћивања
4	ВРК*	крв	трансплантација	директно из узорка
5	ВРБ*	bronхоалвеоларни лават	трансплантација	директно из узорка

\*узорци потичу од истог пацијента код кога је извршена трансплантација костне сржи

Деловањем рестрикционих ензима на PCR продукте пореклом од контрола сва три *T. gondii* типа као и од пет анализираних узорака (Табела 27), и анализом добијених фрагмената (Табела 28) утврђено је да четири узорка (БНТ, ЧТН, ВРК, ВРБ) припадају типу II а да један узорак (ФАЗ) припада типу I (Слике 20-27). Јасно се види да сви узорци који припадају типу II на свим маркерима имају алеле који одговарају овом клоналном типу, изузев узорака ВРК и ВРБ. Ова два на маркеру GRA 7, који је умножен паром прајмера GRA 7- GRA 2В имају алеле типа I и алеле типа II (Табела 27, 28, Слика 26в). Код узорка ФАЗ, услед недовољне количине ДНК генотипизација је дала резултат само на једном маркеру, GRA 6, на основу кога овај изолат припада типу I (Слика 21).

Табела 27. Деловање рестрикционих ензима на PCR продукт

	маркер	SAG 1	SAG 2 А	SAG 2 В	GRA 6	GRA 7 7/2B		GRA 7 3/4
	ензим	Dde I	Mbo I	Hha I	Tru1 I	Mbo II	Eco RI	Bse GI
	сече тип	I	III	II	све	све	све сем I	III
1	RH тип I	+	-	-	+	+	-	-
2	BGD1 тип II	-	-	+	+	+	+	-
3	NED тип III	-	+	-	+	+	+	+
4	БНТ	-	-	+	+	+	+	-
5	ЧТН	-	-	+	+	+	+	-
6	ФАЗ	није било довољно ДНК			+	није било довољно ДНК		
7	ВРК	-	-	+	+	+	+	-
8	ВРБ	-	-	+	+	+	+	-

+ ензим је исекао PCR продукт

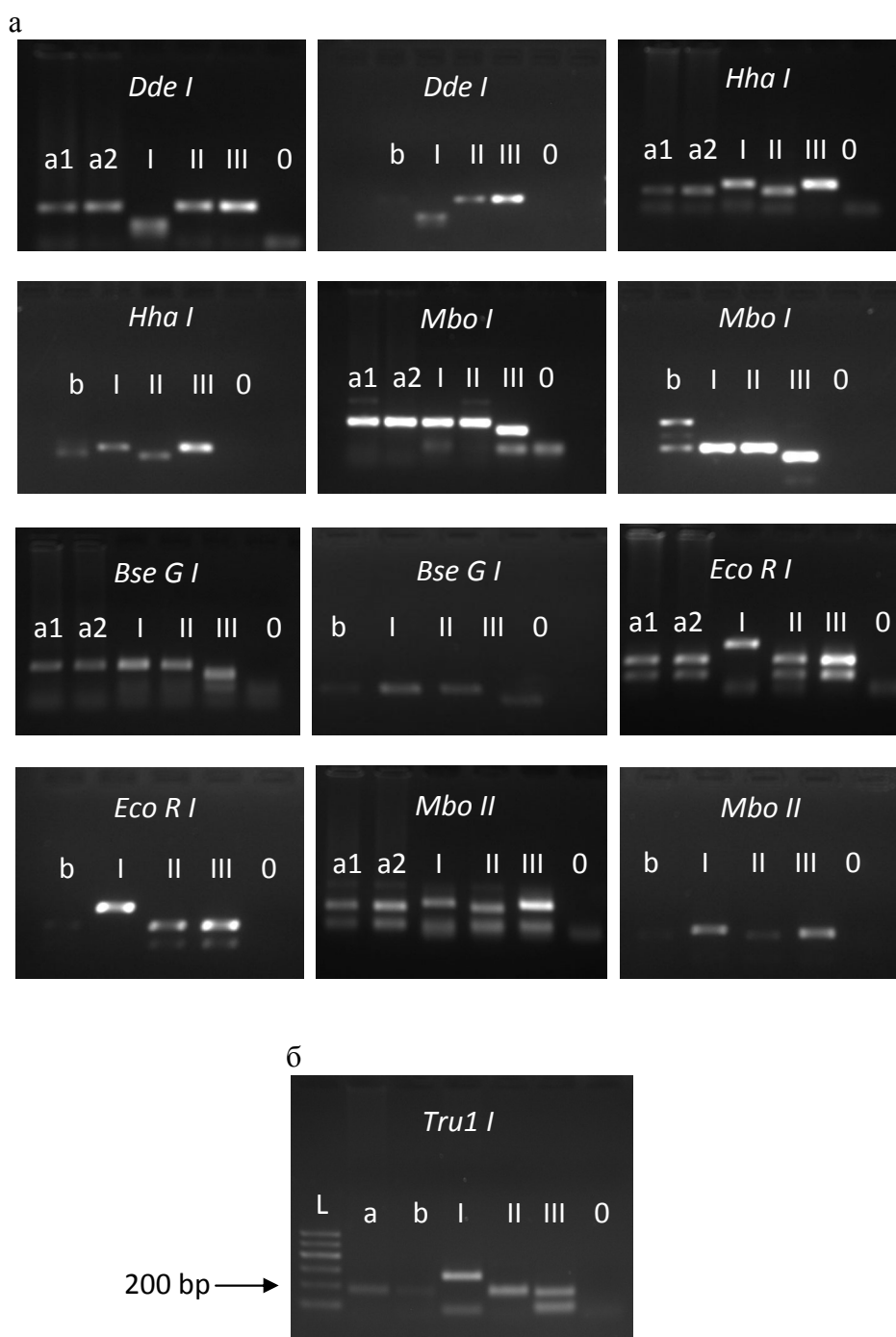
- ензим није исекао PCR продукт

1-3 позитивне контроле (типични представници клонских типова I-III)

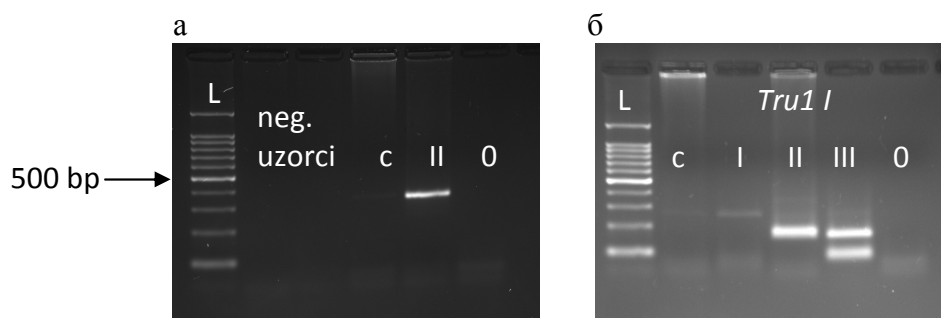
4-8 изолати из клиничког материјала

Табела 28. Резултати генотипизације за изоловане сојеве *T. gondii*

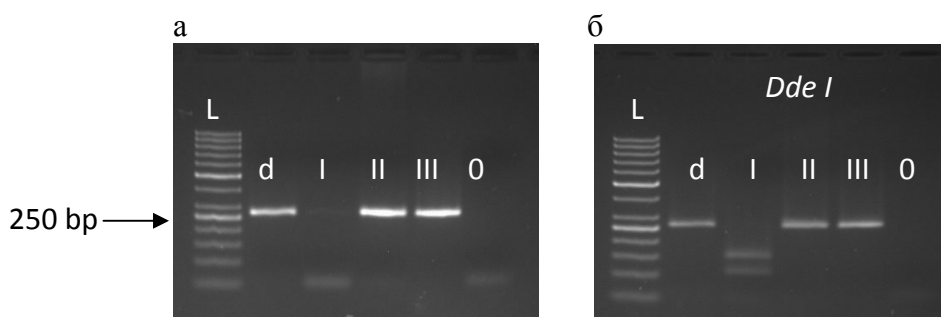
узорак	маркер							генотип
	SAG 1	SAG 2 А	SAG 2 В	GRA 6	GRA 7 7/2B	GRA 7 3/4		
БНТ	II или III	I или II	II	II	II	II	I или II	II
ЧТН	II или III	I или II	II	II	II	II	I или II	II
ФАЗ	-	-	-	I	-	-	-	I
ВРК	II или III	I или II	II	II	I	II	I или II	II
ВРБ	II или III	I или II	II	II	I	II	I или II	II



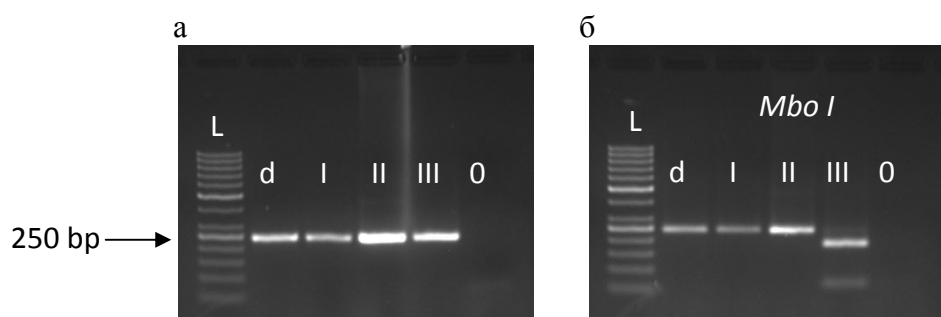
**Слика 20.** Узорци БНТ и ЧТН; Фрагменти добијени деловањем рестрикционих ензима: а) маркери SAG1, SAG2 и GRA7; б) маркер GRA6 (a1, a2 – узорак БНТ, b – узорак ЧТН ; I, II, III – позитивне контроле тип I, II, III; 0 – негативна контрола)



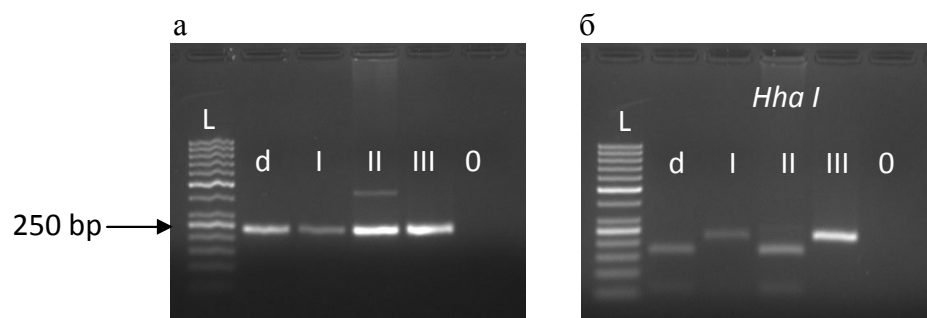
**Слика 21.** Узорак ФАЗ; маркер GRA6: а) PCR продукт; б) Фрагменти добијени деловањем рестрикционог ензима (с-узорак ФАЗ; II – позитивна контрола тип II; 0 – негативна контрола; L- маркер)



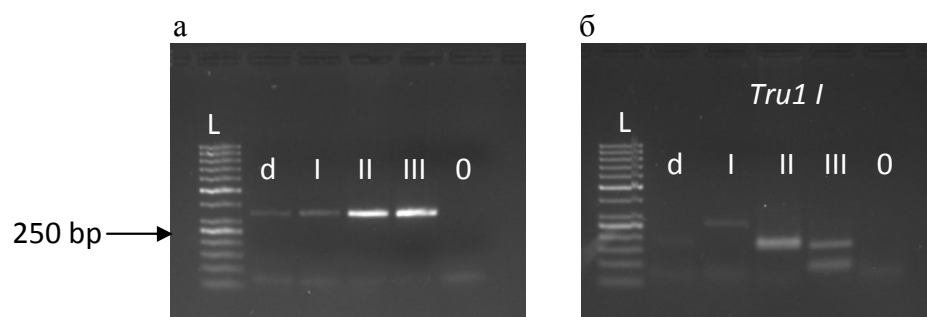
**Слика 22.** Узорак ВРК; маркер SAG1: а) PCR продукт ; б) Фрагменти добијени деловањем рестрикционог ензима (d - узорак ВРК; I, II, III – позитивне контроле тип I, II, III; 0 – негативна контрола; L- маркер)



**Слика 23.** Узорак ВРК; маркер SAG2: а) PCR продукт умножен паром прајмера A1-A2; б) Фрагменти добијени деловањем рестрикционог ензима (d - узорак ВРК; I, II, III – позитивне контроле тип I, II, III; 0 – негативна контрола; L - маркер)

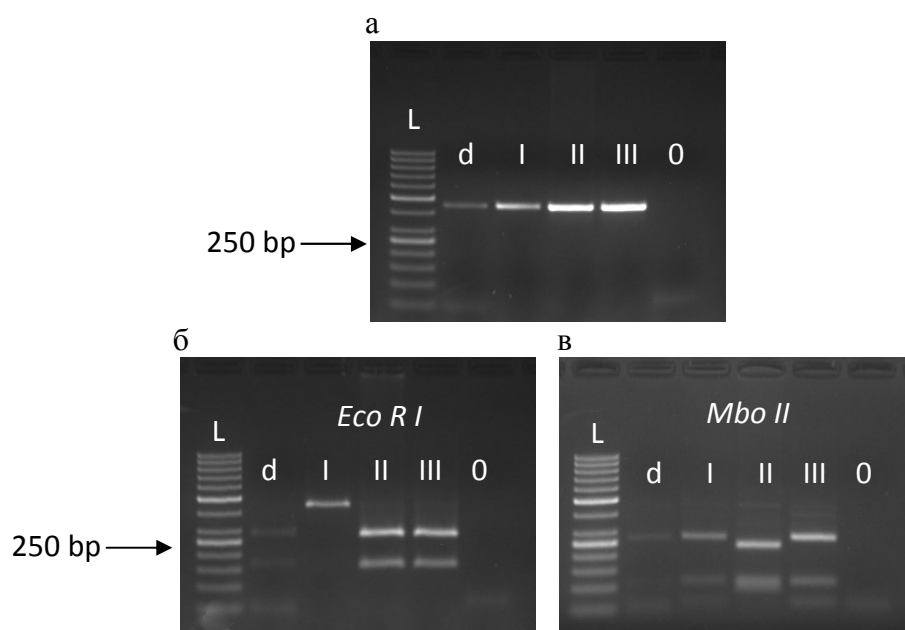


**Слика 24.** Узорак ВРК; маркер SAG2: а) PCR продукт умножен паром прајмера В1-В2; б) Фрагменти добијени деловањем рестрикционог ензима (d - узорак ВРК; I, II, III – позитивне контроле тип I, II, III; 0 – негативна контрола; L - маркер)

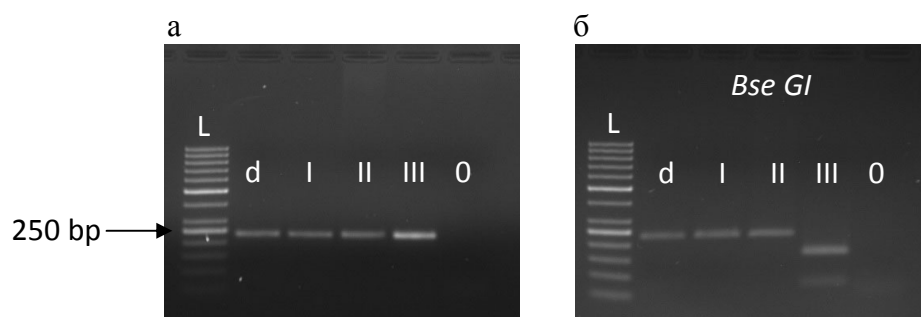


**Слика 25.** Узорак ВРК; маркер GRA6: а) PCR продукт; б) Фрагменти добијени деловањем рестрикционог ензима (d - узорак ВРК; I, II, III – позитивне контроле тип I, II, III; 0 – негативна контрола; L - маркер)





**Слика 26.** Узорак ВРК; маркер GRA7: а) PCR продукт умножен паром прајмера GRA7-GRA2B; б) и в) Фрагменти добијени деловањем рестрикционих ензима (d - узорак ВРК; I, II, III – позитивне контроле тип I, II, III; 0 – негативна контрола; L - маркер)



**Слика 27.** Узорак ВРК; маркер GRA7: а) PCR продукт умножен паром прајмера GRA3-GRA4 б) Фрагменти добијени деловањем рестрикционог ензима (d - узорак ВРК; I, II, III – позитивне контроле тип I, II, III; 0 – негативна контрола; L - маркер)

Узорци ВРК и ВРБ потичу од истог пацијента и с обзиром на то да су резултати генотипизације потпуно исти за оба узорка, анализа електрофорезом за узорак ВРБ није приказана.

***ДИСКУСИЈА***

Приликом постављања дијагнозе токсоплазмозе веома је важно прецизно датирање инфекције мајке, брза дијагноза феталне инфекције, као и дијагноза специфичних ентитета изазваних паразитом *T. gondii* као што су очна токсоплазмоза или токсоплазмоза CNS-а код имуносупримираних особа. Серолошке методе представљају окосницу клиничке дијагностике токсоплазмозе али интерпретација резултата серолошких анализа може бити компликована. На пример, услед недостатка IgM одговора код новорођенчади због незрелости имунског система, неопходно је серолошко праћење детета до прве године живота како би се искључила конгенитална токсоплазмоза. Интерпретацију резултата серолошких метода отежава такође и продужено одржавање IgM антитела код неких имунокомпетентних особа (Brooks и сар., 1987; Vobić и сар., 1991). Иако постоје серолошки тестови за одређивање авидитета специфичних IgG антитела, који омогућава прецизније одређивање времена када је наступила инфекција, откриће PCR-а представља методу која значајно доприноси бржем и прецизнијем постављању дијагнозе. Отуда је увођење молекуларних метода базираних на PCR-у довело до значајног напретка у дијагностици токсоплазмозе.

Молекуларна дијагностика токсоплазмозе није пре истраживања приказаних у овом раду била уведена у Србији, а овде приказани резултати упоредног испитивања молекуларним и конвенционалним методама пацијената суспектних на токсоплазмозу представљају прве податке о примени молекуларних техника у дијагностици токсоплазмозе у нашој земљи. Међутим, битно је нагласити да молекуларна дијагностика, будући да представља савремену методологију која се још увек усавршава, није стандардизована ни међу водећим

светским лабораторијама. Разлике су велике и бројне, и обухватају све сегменте поступка, почев од различитих таргет гена и различитих маркера за генотипизацију, до технолошких као што су апарати за амплификацију различитих произвођача, различите технологије за визуелизовање регистрованих сигнала и протоколи за извођење који се могу разликовати у већем броју детаља (концентрација прајмера и проба, интерне контроле итд.).

Отуда је, не само за потребе овог истраживања већ и за примену у дијагностици, било неопходно одабрати а затим и оптимизовати протокол који ће дати најбоље резултате. Досадашње бројне студије и клиничка испитивања су показала да је доказивање присуства ДНК пореклом од *T. gondii* умножавањем кратког фрагмента AF146527 региона помоћу rtPCR-а показало највећу осетљивост и специфичност (Reischl и сар., 2003; Cassaing и сар., 2006; Edvinsson и сар., 2006; Kasper и сар., 2009). С обзиром на то да се овај фрагмент, у литератури познат још и као 529bp регион, налази у 200-300 копија у геному токсоплазме, одабран је протокол који се заснива управо на његовој детекцији. Оптимизација овог протокола, а самим тим и методе, урађена је кроз серију реакција у којима су коришћене различите концентрације прајмера и пробе, и различити програми у којима су модификоване температуре везивања прајмера као и број циклуса.

Молекуларна детекција у овом истраживању је урађена у узорцима периферне крви пацијената суспектних на акутну токсоплазмозу, плодове воде и феталне крви фетуса и периферне крви новорођенчади суспектних на конгениталну токсоплазмозу, као и у узорцима очне воде и ликвора пацијената суспектних на очну односно церебралну токсоплазмозу.

У случају узорака периферне крви, присуство ДНК пореклом од *T. gondii* доказано је код око једне трећине (31%) случајева. Сличним истраживањем које је урађено на узорцима периферне крви, који потичу од пацијената са акутном лимфаденопатијом изазваном *T. gondii*, показана је детекција паразитске ДНК у око 35% узорака (Guу и Joynson, 1995). У студији пацијената са акутном токсоплазмозом из Југоисточног Бразила, стопа узорака периферне крви позитивних на ДНК паразита износила је 48.6% (17/35) (Kompalic-Cristo и сар., 2007). У обе ове студије као маркер коришћен је B1 ген који је показао мању

осетљивост у односу на маркер AF146527 који смо ми користили, али је укупан број узорака био мањи. Још један разлог за вишу стопу позитивних налаза у бразилској студији вероватно лежи у чињеници да је у нашем истраживању екстракција ДНК вршена из пуне крви а у бразилском из леукоцитно-тромбоцитне фазе (енгл. *buffy coat*) а управо су леукоцити онај елемент крви у коме се налази највећи број тахизоита због чега се однедавно и у нашој лабораторији екстракција врши из ове фазе (Menotti и сар., 2003; Jalal и сар., 2004).

С обзиром на то да је показано да није могуће детектовати ДНК токсоплазме из периферне крви пацијената са акутном токсоплазматском лимфаденопатијом после 5,5-13 недеља од почетка лимфаденопатије (Guу и Joynson, 1995) сама PCR детекција ДНК *T. gondii* индикује скорашњу инфекцију. Међутим, мора се узети у обзир да PCR детектује само ДНК паразита што не значи да ће детектовати и вијабилне паразите. Иmunски систем брзо убија циркулишуће паразите али ДНК *T. gondii* се још неко време задржава у циркулацији. Исто тако, у хроничној фази инфекције *T. gondii* цисте се налазе у мишићима и CNS-у и могуће је, мада веома ретко, детектовати у крви ДНК из циста и када није присутна активна паразитемија. С друге стране, негативним PCR-ом се не може искључити скорашња инфекција због тога што је могуће да број паразита који циркулишу у крви буде мали, период паразитемије кратак а тачна кинетика паразитемије код људи није још увек позната. Такође, количина узорка из кога се ради екстракција је мала у односу на укупну количину крви у организму, а узорци крви садрже и инхибиторе PCR реакције и то пре свега хем, хемоглобин, лактоферин и имуноглобулин G.

Резултати директног *rtPCR*-а из узорака периферне крви пореклом од пацијената који су суспектни на токсоплазмозу анализирани су и у односу на серолошке критеријуме акутне инфекције, тј. у односу на висину авидитета специфичних IgG антитела и налаз специфичних IgM антитела. Показано је да су на нашем материјалу резултати *rtPCR*-а знатно боље корелирали са налазом специфичних IgM антитела него са висином авидитета специфичних IgG антитела.

Поређење молекуларне детекције са биолошким огледом као једном од конвенционалних метода урађено је из узорака периферне крви пацијената код

којих је налаз специфичних IgG антитела ниског авидитета и специфичних IgM антитела указивао на акутну токсоплазмозу. Показано је да је код близу једне трећине (29%) присутна ДНК пореклом од *T. gondii*, док је око 20% постављених биолошких огледа било позитивно. Овај налаз неоспорно указује на вишу осетљивост rtPCR методе у односу на биолошки оглед.

Међутим, молекуларна детекција ДНК паразита из периферне крви има највећу примену код имуносупримираних пацијената, код којих је то практично и једина метода како за постављање дијагнозе тако и за праћење терапијског ефекта примењених антипаразита. Управо то је показано и у овом истраживању код једног пацијента код кога је rtPCR-ом доказана реактивација хроничне инфекције, са значајном концентрацијом паразита у крви и са тенденцијом опадања у току примене терапије. На значај rtPCR методе код имуносупримираних пацијената указују и слична истраживања у којима су праћени пацијенти код којих је извршена трансплантација костне сржи, односно јетре и код којих је овом методом ефикасно праћена кинетика инфекције (Costa и сар., 2000; Botterel и сар., 2002; Edvinsson и сар., 2008; Daval и сар., 2010).

Иако у периферној крви одраслих детекција паразитске ДНК не мора увек бити директан доказ активне паразитемије, ДНК *T. gondii* детектована у узорцима који потичу од фетуса и новорођенчета увек има клиничку важност јер не постоји могућност детекције ДНК заостале од раније инфекције. Стога, молекуларна дијагностика има највећу примену при постављању дијагнозе конгениталне токсоплазмозе, јер је показано да је изолација паразита на култури ћелија недовољно осетљива (Thulliez и сар., 1992; Foulon и сар., 1999) а за изолацију биолошким огледом потребно је 6 недеља те детекција ДНК вишеструко скраћује период добијања резултата. Такође, у последње време се све више указује на значај детекције *T. gondii* у плодовој води употребом rtPCR-а за предикцију феталне инфекције која непосредно омогућава одређивање одговарајућег третмана и надзора (Menotti и сар., 2010; Wallon и сар., 2010).

Тако је ово истраживање обухватило 28 плодових вода пореклом од трудница код којих је до инфекције дошло за време трудноће као и 9 крви из пупчаника пореклом од фетуса суспектних на конгениталну токсоплазмозу. Методом rtPCR је доказано присуство паразита у око 36% узорака плодових вода.

Биолошким огледима који су постављени из ових плодова вода доказана је *T. gondii* у 25% случајева. У поређењу са нашим резултатима, нешто нижа стопа позитивности добијена је студијом која је рађена у Египту где је такође испитано присуство *T. gondii* у плодовој води биолошким огледом и PCR-ом. Конгенитална инфекција је молекуларном методом доказана у 20% (17/85) случајева, а биолошким огледом у 16.5% (14/85) случајева (Eida и сар., 2009). Нижа стопа позитивних резултата у студији Eida и сар. може се објаснити мањом осетљивошћу методе јер су аутори применили конвенционални PCR са P30 геном као маркером који је мање осетљив од AF146527 репетитивног елемента.

Како у многим објављеним истраживањима није дошло до потпуног поклапања резултата rtPCR-а и биолошког огледа из плодова вода, што је случај и са овим истраживањем, и како се конгенитална инфекција не може искључити уколико се добије негативан резултат PCR-а (Romand и сар., 2001; Golab и сар., 2002), за предикцију конгениталне токсоплазмозе најбоље је комбиновати резултате молекуларне детекције и биолошког огледа. У једној студији пренаталне дијагностике конгениталне токсоплазмозе код пацијената из 6 европских референтних центара показано је да PCR из плодове воде има вишу осетљивост (81%) и од биолошког огледа (58%) и од ћелијске културе (15%) (Foulon и сар., 1999). Комбинација PCR и биолошког огледа повећава осетљивост чак на 91%, те представља и најбољи дијагностички приступ (Foulon и сар., 1999). Тако је и у овом истраживању на основу комбинованих резултата директног rtPCR-а урађеног из плодова вода и биолошког огледа, 50% (14/28) узорака било позитивно на *T. gondii*.

У неким европским земљама, као што су Француска и Аустрија, законом је регулисано редовно серолошко праћење трудница на присуство антитела специфичних за *T. gondii* што омогућава да се открије у ком триместру трудноће је дошло до сероконверзије и могуће инфекције плода. Код обимних студија у којима су случајеви конгениталне токсоплазмозе праћени и постнатално, посебно се истиче значај молекуларних метода због веће осетљивости од конвенционалних паразитолошких тестова. Тако је у дугогодишњој студији изведеној у Француској, од 2632 жене код којих је инфекција наступила у трудноћи, конгенитална токсоплазмоза доказана конвенционалним методама код 34 фетуса и код свих је

PCR био позитиван из плодове воде и/или из феталне крви. Осим код ових, код три фетуса код којих није била доказана инфекција другим методама, резултати PCR-а су били позитивни што је касније и потврђено аутопсијом или серолошким праћењем детета (Hohlfeld и сар., 1994). Такође, сличном студијом која је рађена у Аустрији праћен је исход могуће конгениталне токсоплазматске инфекције код деце до прве године живота да би се проценила валидност резултата PCR-а из плодове воде. Код 22.4% (11/49) деце код којих је PCR из плодове воде био позитиван, конгенитална инфекција је потврђена серолошким праћењем (Gratzl и сар., 1998).

Анализом крви из пупчаника *rtPCR*-ом, у овом истраживању позитивно је било 33% узорака. Међутим, резултати једног истраживања које је рађено у Француској нису показали ниједан једини позитиван налаз PCR-ом међу 19 испитаних узорака крви из пупчаника пореклом од деце са доказаном конгениталном токсоплазмозом (Filisetti и сар., 2003). Ово се може објаснити коришћењем конвенционалне PCR методе која има далеко нижу осетљивост у односу на *rtPCR*, као и присуством инхибитора. Од свих узорака крви из пупчаника у овом раду, постављени су биолошки огледи и стопа позитивности је износила 55.5%. Већа стопа изолације вијабилних паразита биолошким огледом него детекција паразитске ДНК може се објаснити већом количином узорка који се узима за постављање биолошког огледа у односу на количину која се користи за екстракцију ДНК, као и могућег присуства инхибитора PCR-а. Као што је случај и са периферном крви, фетална крв такође има компоненте које могу инхибирати PCR реакцију због чега се ређе користи у молекуларној дијагностици конгениталне токсоплазмозе мада је у једном истраживању обављеном на репрезентативном узорку трудница у Кини добијена слична стопа позитивних резултата *rtPCR* из узорака плодове воде и феталне крви (Ma и сар., 2003). Из свега изложеног произилази да дијагностика конгениталне токсоплазмозе из феталне крви треба да се заснива на комбиновању биолошког огледа са молекуларном детекцијом јер ове две методе у комбинацији показују највећу осетљивост. То потврђују и резултати добијени у овом истраживању, где је комбиновањем резултата *rtPCR* и биолошког огледа из узорака феталне крви добијена стопа позитивности од 66.7%.



Када је у питању очна токсоплазмоза, лабораторијска дијагностика се до скоро углавном заснивала на поређењу нивоа антитела детектованих у очној водици и серуму у циљу детектовања интраокуларне синтезе специфичних антитела (*Witmer-Goldman*-ов коефицијент). Данас и у случају очне токсоплазмозе молекуларно-биолошке методе полако почињу да постају стандард. Већи број истраживања је већ показало да позитиван резултат PCR-а није увек праћен локалном синтезом IgG антитела (Villard и сар., 2003; Talabani и сар., 2009) те је тако и једини доказ за потврђивање дијагнозе (Okhravi и сар., 2005). Ово истраживање је обухватило 10 очних водика код којих је 60% (6/10) било позитивно rtPCR-ом. Сличан резултат добијен је у једној студији у Француској где је показано да је 55% (22/40) узорка очне водике било позитивно rtPCR-ом детекцијом маркера AF146527 (Talabani и сар., 2009). Коришћењем rtPCR и детекцијом истог маркера, AF146527 у још једној француској студији добијена је нешто нижа стопа позитивних узорка, 38.2% (13/34) (Fekkar и сар., 2008). Интересантно је да је у овој другој студији запремина узорка за екстракцију ДНК била веома мала (10  $\mu$ L) што је свакако могло да утиче на успешност PCR реакције. Међутим, у раду који је урађен у лабораторији у Стразбуру коришћен је конвенционални PCR за амплификацију дела B1 и 18S rRNA гена и добијено је да је 28% (5/18) очних водика било позитивно на присуство ДНК *T. gondii* (Villard и сар., 2003).

Церебрална токсоплазмоза која се најчешће јавља код имуносупримираних пацијената, и која се завршава фаталним исходом ако се не лечи, најчешће је последица реактивације хроничне инфекције. Дефинитивна дијагноза се поставља доказивањем присуства тахизоита у узорку ткива мозга добијеног биопсијом али се ова метода због своје инвазивности у пракси не примењује, посебно од кад је у употреби PCR (Vidal и сар., 2004). Ово истраживање обухватило је 7 узорка цереброспиналног ликвора од којих је 57% било позитивно rtPCR-ом. Студијом која се бавила испитивањем церебралне токсоплазмозе код пацијената инфицираних *HIV* вирусом у Бразилу показано је да је 27.4% (14/51) цереброспиналних течности било позитивно rtPCR-ом (Mesquita и сар., 2010). У Бразилу је међутим анализиран знатно већи број узорка али је екстракција ДНК

рађена фенол-хлороформском методом код које фенолне резидуе често могу инхибирати PCR реакцију.

У овом истраживању урађен је и rtPCR из мозга мишева у циљу одређивања концентрације паразитске ДНК неопходне за генотипизацију сојева изолованих биолошким огледом. У највећем броју случајева резултати овог rtPCR-а су се поклапали са серолошким налазом из крви мишева из биолошког огледа и/или уоченим цистама на микроскопском прегледу. Међутим у једном мањем броју узорака, код којих серологија није указивала на акутну инфекцију, али је директан PCR из узорка био позитиван, биолошким огледом су добијени негативни резултати. На основу свих методолошких и дијагностичких критеријума код ових случајева бисмо довели у сумњу резултат rtPCR-а. Међутим позитиван rtPCR из мозга мишева је указао на то да и серологија, посебно код мишева, као и микроскопски преглед, могу дати негативан резултат уколико се ради о јако малом броју паразита, односно циста. Дијагностички потенцијал rtPCR анализе материјала из биолошког огледа није још увек јасан а како нигде у свету не представља део уобичајеног протокола за дијагнозу токсоплазмозе, потребно је наставити наша оригинална испитивања овог поступка да би се одредио његов клинички значај.

Стога, имајући у виду резултате приказане у овом раду, генерални закључак овог истраживања је да молекуларне методе имају огроман потенцијал у дијагностици токсоплазмозе и да нам, због њихове велике осетљивости и специфичности, омогућавају, заједно са конвенционалним паразитолошким методама, правовремено постављање дијагнозе посебно у случајевима конгениталне токсоплазмозе, као и код имунокомпромитованих пацијената.

Део овог истраживања је посвећен и испитивању потенцијала молекуларне детекције *T. gondii* код животиња, и то на примеру глодара. Изабрали смо глодаре јер они могу представљати значајан резервоар токсоплазматске инфекције. Неке врсте глодара су још од постанка људских насеља били и остали њихови стални пратиоци од којих су најважније, познате још и као синантропне врсте, црни пацов, *Rattus rattus*, браон или сиви пацов, *Rattus norvegicus*, и домаћи или кућни миш, *Mus musculus*. Овим истраживањем су обухваћени браон пацови и кућни мишеви који су сакупљани на територији Београда.

У досадашњим истраживањима преваленце природно инфицираних глодара паразитом *T. gondii* показан је велики диверзитет, посебно код пацова. Серолошке студије показују опсег од 0% до 100% инфицираних пацова, док је серопреваленца од 27.5% која је приказана у овом истраживању једна од виших у односу на досадашње европске студије (Dubey и Frenkel, 1998). С друге стране релативно високе стопе позитивних налаза показане су у студијама које су базиране на детекцији паразитске ДНК. У истраживању које је обухватило 43 пацова из урбаних области Манчестера у Енглеској чак 42% животиња је било позитивно (Hughes и сар., 2006). У овом истраживању ДНК *T. gondii* у мозговима пацова доказана је у 10.4% животиња, што је веома слично стопи од 10.3% нађеној на три органске фарме свиња у Холандији (Kijlstra и сар., 2008). Код мишева ДНК *T. gondii* је детектована у 83% случајева, укључујући и све мишеве код којих су доказане цисте у мозгу. Међутим, како је узорак био мали (12 животиња) резултати за мишеве не могу се сматрати репрезентативним. Веће стопе детектоване ДНК *T. gondii*, од 53% и 59%, забележена је код урбаних мишева који су сакупљени у околини Манчестера у Енглеској у стамбеним кућама са окућницом (Marshall и сар., 2004; Hughes и сар., 2006; Murphy и сар., 2008).

Микроскопским прегледом мозга пацова показано је да је 7.6% (11/144) животиња имало *T. gondii* цисте, док је 3.5% (5/144) имало и цисте и ДНК *T. gondii*. Међутим, резултати rtPCR-а и микроскопског прегледа мозга пацова нису у потпуности сагласни. Разлог томе поново лежи у малој количини узорка који се користи за екстракцију ДНК, а који представља веома мали део укупног можданог ткива пацова (200  $\mu$ L хомогената мозга тј, око 7% целокупног мозга). Ово је индиректно подржано налазима код мишева, код којих су сви налази са цистама потврђени rtPCR-ом, при чему је због разлике у величини мозга између ове две врсте сразмерно три пута већи део мозга мишева узиман за PCR. Са друге стране, случајеви када у мозгу пацова нису детектоване цисте, а rtPCR је био позитиван, могу се објаснити тиме што микроскопска детекција има праг осетљивости од 10 циста по mL што је код мишева 10 а код пацова око 40 циста по мозгу.

Dubey је показао да идентификација паразита *Toxoplasma gondii* у размазу хомогената мозга није осетљива колико и биолошки оглед (Dubey, 2010). Међутим, ни један биолошки оглед постављен од мозга пацова код којих су доказане цисте у овом истраживању није био позитиван, вероватно због тога што цисте нису биле вијабилне. Изолација вијабилних паразита *T. gondii* из пацова биолошким огледом и генерално је ретка. Тако је у истраживањима преваленце токсоплазмозе код пацова у Јапану и Панами добијена само по једна изолација овог паразита од 11 односно 23 испитивана серопозитивна пацова (Iseki и сар., 1972; Frenkel и сар., 1995). На фармама Илиноиса изолована је токсоплазма из само једног од 107 пацова (0.9%), од којих је 6.3% пацова било серопозитивно (Dubey и сар., 1995). У Хрватској је изолација токсоплазме биолошким огледом постављеним од ткива мозга била успешна код 2 (1.4%) од 142 пацова на фарми и ни код једног од 86 анализираних мишева, непознатог серолошког статуса (Kutičić и сар., 2005). Такође, у литератури је описана и изолација вијабилних *T. gondii* биолошким огледом из серонегативних пацова и мишева (Dubey и сар., 1995; Araujo и сар., 2010). Иако у овом истраживању нису изоловане цисте биолошким огледом, код 9 серонегативних пацова детектоване су цисте. Досадашња истраживања су показала да се паразити из пацова са доказаном инфекцијом не инцистирају увек у мишјем мозгу, што се објашњава посебним одликама имунског система пацова да индукује мутације у генима токсоплазме који контролишу способност паразита да формира цисте као и његову патогеност (Dubey и Frenkel, 1998). Зато је важно да се идентификација токсоплазматске инфекције код синантропних глодара заснива, поред серолошких испитивања, и на изолацији вијабилних паразита биолошким огледом и на детекцији паразитске ДНК у ткивима животиња.

Резултати добијени овим истраживањем показују значајан ниво токсоплазматске инфекције код пацова и мишева сакупљених у Београду. Постојање урбаних глодара као резервоара инфекције чини веома важну карику у епидемиологији токсоплазмозе и указује на то да пацови и мишеви инфицирани *T. gondii* представљају ризик по јавно здравље у људским насељима. Како је ова студија била ограничена на стопу токсоплазматске инфекције код глодара у насељима са изразито нехигијенским условима, било би значајно упоредити их са

налазима код глодара из области са бољим животним условима. Да се реално процени потенцијални ризик од инфицираних глодара за људско здравље у нас потребна су обимна истраживања преваленце инфекције код мачака, као и степена предаторства мачака према глодарима.

Коначно, део истраживања приказаних у овом раду је био посвећен одређивању генотипа изолата *T. gondii*. Најновија филогенетска истраживања указују на то да је популациона структура паразита *T. gondii* знатно комплекснија него што је у почетку сматрано. Иако је непобитно утврђено да је тип II преобладајући у Европи и Северној Америци (Darde и сар., 1992; Howe и Sibley, 1995; Howe и сар., 1997) постоје значајне регионалне разлике. Тако су истраживања у Португалу и Шпанији показала присуство и типова I и III на овом подручју (Fuentes и сар., 2001; de Sousa и сар., 2006), док је генотипизација изолата са Крита и Кипра показала преобладајућност типа III (Messaritakis и сар., 2008); мора се међутим узети у обзир да су ова испитивања рађена коришћењем само једног маркера (SAG2 или GRA6). Такође, анализа изолата *T. gondii*, која су тек од скора започела у Јужној Америци, Азији и Африци, показују значајну генетску разноврсност сојева овог паразита.

Реалну слику о дистрибуцији генотипова у Европи је тешко добити и због тога што се истраживања *T. gondii* не врше у истој размери и истим методама у свим земљама. До сада је највећи број изолата генотипизиран у Француској, првенствено због тога што је у тој земљи законски обавезно тестирање трудница на токсоплазмозу и самим тим је доступност материјала за истраживање много већа. У једној таквој студији је показано да од 86 изолата пореклом од случајева суспектне и потврђене конгениталне токсоплазмозе 85% припада типу II (Ajzenberg и сар., 2002 б). На преобладајућност истог типа је указала и студија која је је урађена у Пољској, где је генотипизација такође рађена из клиничких узорка пореклом из случајева конгениталне токсоплазмозе (Nowakowska и сар., 2006). На подручју Југоисточне Европе први сој, изолован из случаја конгениталне токсоплазмозе, такође припада типу II и потиче из наше земље (Djurković-Djaković и сар., 2006). И у овом истраживању резултати генотипизације два изолата, који потичу из једног случаја конгениталне токсоплазмозе и једног случаја акутне токсоплазмозе код труднице код које је

дошло до смрти плода, указују на присуство типа II у Србији. Међутим, осим ових, показано је и да један изолат из узорка периферне крви новорођенчета са суспектном конгениталном токсоплазмозом припада клонском типу I. Изолација овог типа из узорака пореклом од случајева конгениталне токсоплазмозе је већ описана у литератури, али у знатно мањој стопи него тип II, као што показују резултати истраживања у Француској где је од 86 генотипизираних изолата 4 припадало типу I (Howe и Sibley, 1995; Ajzenberg и сар., 2002 б).

У овом раду типизирана су и два узорка, крв и бронхоалвеоларни лават, пореклом од имунокомпромитованог пацијента код кога је извршена трансплантација костне сржи, за које је утврђено да припадају типу II. У једној студији генотипизације сојева изолованих код имунокомпромитованих пацијената, инфицираних *HIV* вирусом или пацијената код којих је извршена трансплантација органа, показано је да је тип II преобладајући код пацијената који су инфицирани у Европи. Изолати који не припадају овом типу углавном потичу од људи који су се инфицирали токсоплазмом ван Европе. Други по заступљености је тип III док је тип I био редак у овој групи пацијената (Ajzenberg и сар., 2009). И у другим студијама на имунокомпромитованим пацијентима (оболели од сиде или од лимфома, или трансплантирани пацијенти), који су углавном потицали из Француске, показано је да је међу изолатима тип II такође преобладајући и подједнако заступљен, а да су у мањој мери изоловани и типови I и III (Howe и сар., 1997; Honore и сар., 2000). С друге стране, у једном истраживању у Америци у ком је урађена генотипизација сојева изолованих из цереброспиналне течности пореклом од 8 *HIV* позитивних пацијената показано је да је већина била инфицирана сојевима типа I или сојевима која имају тип I алеле (Khan и сар., 2005). Иако постоје различита мишљења о могућој повезаности клиничке слике са неким од генотипова *T. gondii* највероватније је да резистентност или осетљивост на неки одређени тип, посебно код имунокомпромитованих пацијената, зависе пре свега од индивидуалних фактора (Ajzenberg и сар., 2009).

Највећи проблем са генотипизацијом из клиничких узорака јавља се због најчешће малог броја паразита који се налазе у узорцима због чега је и количина екстраховане ДНК пореклом од *T. gondii* такође мала. Овај се проблем делимично

може отклонити обогаћивањем узорка кроз биолошки оглед или ћелијску културу али чак и најосетљивије молекуларне методе, као што је *multiplex nested PCR*, имају висок праг од 50 односно 25 паразита у mL (Khan и сар., 2005; Nowakowska и сар., 2006). Протокол по коме је рађена генотипизација PCR-RFLP методом у овом истраживању је имала осетљивост од око 170 паразита по mL што је најзначајнији разлог због чега није успела типизација већег броја изолата.

Иако су се бројне студије популационе структуре *T. gondii* заснивале само на генотипизацији помоћу једног маркера, најчешће SAG2 (Howe и сар., 1997; Fuentes и сар., 2001; Sabaj и сар., 2010) или GRA6 (Fazaeli и сар., 2000; Messaritakis и сар., 2008) генотипизација је у овом истраживању рађена по протоколу који је првобитно подразумевао употребу 3 маркера, SAG1, SAG2 и GRA7 (Richomme и сар., 2009; Aubert и сар., 2010). Познато је да типизација једним маркером не омогућава идентификацију неклонских сојева а да би се што прецизније одредило присуство полиморфизама у популацији неопходна је примена мултилокусних PCR-RFLP и микросателитских анализа на више маркера (Ajzenberg и сар., 2005; Su и сар., 2006). Због тога је у ово истраживање уведен још један генски маркер, GRA6, који се због своје полиморфности веома често користи у генотипизацији изолата *T. gondii* у сличним студијама које су описане у литератури (Fazaeli и сар., 2000; Miller и сар., 2004; Dubey и сар., 2007; Prestrud и сар., 2008). Увођење овог маркера у протокол се показало као оправдано управо због тога што је код једног од изолата пореклом из узорка крви новорођенчета са суспектном конгениталном токсоплазмозом, у коме смо располагали малом количином ДНК *T. gondii*, умножен GRA6 генски маркер на основу чега је одређено да припада типу I. Анализа само помоћу GRA6 маркера је могућа, и понекад довољна, због тога што је на основу њега могуће разликовати три основна клонска типа (Fazaeli и сар., 2000) који су иначе преобладајући на европском континенту. Међутим чак ни коришћење већег броја маркера не даје увек задовољавајуће резултате углавном због недовољне количине екстраховане паразитске ДНК у узорку. Због тога се дешава да се не умноже сви маркери код сваког узорка као што можемо видети у истраживањима урађеним у Америци и Пољској где је PCR-RFLP анализа рађена такође помоћу четири генска маркера SAG2, SAG3, GRA6 и BTUB (Khan и сар., 2005; Nowakowska и сар., 2006).

Помоћу ових генских маркера могли су се разликовати типови I, II и III, али су се такође могли генотипизирати и сојеви који имају генотип са мешаним алелима, као што је случај и са једним узорком из овог истраживања за који се после дигестије продуката за GRA7 ген испоставило да поседује алеле и I и II типа.

Последњих година се у неким лабораторијама врши генотипизација која се заснива на великом броју RFLP маркера, 9 или чак 10 (Su и сар., 2006; Dubey и Su, 2009), иако се сматра да је ограничење PCR-RFLP методе то што није могуће разликовати блиско сродне изолате у оквиру једне клонске линије. Због тога су анализе микросателита знатно информативније за разликовање скоро насталих мутација код блиско сродних изолата исте линије, док су RFLP маркери много бољи за откривање временског периода у коме је дошло до раздвајања далеко сродних сојева у различите клонске гране (Su и сар., 2006). Из овога следи да би, иако је због једноставности и повољније цене неопходних реагенса, мултилокусна PCR-RFLP генотипизација још увек метода избора и заступљенија је у клиничким испитивањима, идеалан приступ генотипизацији обухватао примена обе методе.

Упоредо са истраживањима везаним за филогенију паразита *T. gondii* раде се и истраживања која имају за циљ да објасне могућу везу између различитих генотипова и облика односно клиничке слике обољења које изазива. Међутим досадашњи резултати највише упућују на то да везе или нема или је она знатно сложенија него што то нека истраживања показују. Иако је генерални закључак да тип II преоблада у случајевима конгениталне токсоплазмозе, макар у Европи и Северној Америци (Howe и Sibley, 1995; Howe и сар., 1997; Ajzenberg и сар., 2002 б; Darde и сар., 2007), у шта се уклапају и резултати генотипизације два изолата у овом истраживању, сојеви типа I такође могу бити повезани са неким тежим облицима овог обољења (Howe и сар., 1997; Fuentes и сар., 2001). Сојеви атипичних генотипова су изоловани код имунокомпетентних пацијената са тежим обликом стечене токсоплазмозе у Француској Гвајани (Carne и сар., 2002; Demar и сар., 2011), док су тип I и неки рекомбинантни сојеви изоловани код имунокомпетентних особа које су оболеле од теже или атипичне очне токсоплазмозе у Америци (Grigg и сар., 2001).



На крају, постоји много недоумица и опречних резултата на основу којих поједини аутори покушавају да укажу на или објасне могућу повезаност појединих генотипова, типичних и атипичних, са различитим облицима токсоплазмозе. Најновија сазнања у области популационе структуре *T. gondii* вероватно ће имати и значајне клиничке импликације. Многе догме, као што је случај са опште прихваћеним мишљењем да мајке које су биле инфициране неким од типичних сојева стичу имунитет и на могућу реинфекцију и да не могу пренети инфекцију на плод, почињу да се доводе у питање. Ово потврђује 6 пријављених случајева мајки са хроничном инфекцијом код којих је дошло до вертикалне трансмисије инфекције изазване другим, најчешће атипичним сојем (Lindsay и Dubey, 2011). Да бисмо стекли реалну слику о популационој структури паразита *T. gondii* и о њеним клиничким импликацијама у свету растућих миграција становништва међу континентима, потребна су шира истраживања која би била заснована на стандардизованим протоколом и која би обухватила не само клинички манифестне случајеве већ и индивидуе са асимптоматском инфекцијом.

***ЗАКЉУЧАК***

На основу резултата истраживања у којима је рађена детекција ДНК *T. gondii* на од 127 хуманих субјеката (160 узорака), као и од 156 глодара (144 пацова врсте *Rattus norvegicus* и 12 мишева врсте *Mus musculus*) могу се извести следећи закључци:

1. Из материјала који је потицао од пацијената суспектних на акутну токсоплазмозу, ДНК *T. gondii* је доказана директно из узорака крви вишеструко чешће него биолошким огледом. Овај резултат неоспорно одражава знатно вишу осетљивост *rtPCR* у односу на конвенционални биолошки оглед; међутим, у клиничкој дијагностици се не може сматрати директним дијагностичким параметром јер се не може искључити могућност да је *rtPCR*-ом детектована ДНК невијабилних паразита.
2. Међу серолошким маркерима акутне инфекције, боља корелација резултата *rtPCR* била је са налазом специфичних *IgM* антитела него са висином авидитета специфичних *IgG* антитела.
3. Из материјала који је потицао од фетуса и новорођенчади суспектних на конгениталну токсоплазмозу, показана је такође вишеструко виша стопа детекције ДНК *T. gondii* од изолације паразита биолошким огледом. Међутим, насупротив одраслим пацијентима, код фетуса и новорођенчади *rtPCR* налаз је директно дијагностички јер не постоји могућност постојања ДНК фрагмената заосталих од раније инфекције, те је молекуларна детекција и метода избора.
4. Код пацијената суспектних било на акутну било на конгениталну инфекцију код којих је биолошки оглед био позитиван, забележена је и ниска стопа

- (~20%) негативних резултата rtPCR-a, што указује на потребу за даљим усавршавањем методологије.
5. Успешност доказивања ДНК *T. gondii* у материјалу хуманог порекла зависила је од типа материјала, и то тако да што је мањи волумен материјала од кога се узима узорак успешност rtPCR већа (60% у очној водици, 57,1% у ликвору а 35,7% у плодовој води).
  6. PCR је успешно оптимизован и за детекцију инфекције код синантропних глодара. Већа учесталост детекције *T. gondii* PCR-ом него биолошким огледом и код мишева и код пацова потврђује високу осетљивост примењене методе.
  7. Одређивање клонског типа *T. gondii* покушано је из 22 узорка, 19 пореклом од људи а 3 пореклом од пацова. Успешно је генотипизирано 5 узорака пореклом од људи, од којих 4 припадају типу II а један типу I. Налазом само ова 2 генотипа, са преминацијом типа II, Србија се уклапа у досадашњи мозаик популационе структуре *T. gondii* у Европи.

Оправданост увођења метода заснованих на детекцији *T. gondii* на молекуларном нивоу показује повећање стопе постављених дијагноза комбиновањем конвенционалних паразитолошких са rtPCR-ом. Отуда се може закључити да је у овом тренутку најбољи дијагностички приступ комбинација конвенционалне и молекуларне методологије.

Осим за практичну клиничку дијагностику инфекције човека, резултати овог рада су показали потенцијал rtPCR-a за детекцију *T. gondii* из ткива животиња, на примеру синантропних глодара. С друге стране, сама стопа детекције ДНК *T. gondii* код пацова и мишева сакупљених у Београду потврђује да су ове животиње резервоар инфекције у нашој средини те представљају ризик за јавно здравље.

Коначно, у овом раду су приказани први подаци о популационој структури *T. gondii* у Србији. Показано је да су на нашем подручју, као и у већем делу Европе, присутни пре свега генотип II а знатно мање и генотип I. Међутим, с обзиром на то да се читав регион Балканског полуострва налази у контактном подручју са Азијом и Африком, на којима је популациона структура знатно

другачија, може се очекивати и присуство клонског типа III или чак неких атипичних сојева, нарочито код дивљих животиња, због чега је веома важно наставити започета истраживања у овом правцу.

## ***ЛИТЕРАТУРА***

- Ajioka JW, Boothroyd JC, Brunk BP, Hehl A, Hillier L, Manger ID, Marra M, Overton GC, Roos DS, Wan KL, Waterston R, Sibley LD (1998): Gene discovery by EST sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequences restricted to the Apicomplexa. *Genome Res* 8, 1: 18-28.
- Ajzenberg D, Banuls AL, Su C, Dumetre A, Demar M, Carme B, Darde ML (2004): Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 34, 10: 1185-1196.
- Ajzenberg D, Banuls AL, Tibayrenc M, Darde ML (2002a): Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int J Parasitol* 32, 1: 27-38.
- Ajzenberg D, Cogne N, Paris L, Bessieres MH, Thulliez P, Filisetti D, Pelloux H, Marty P, Darde ML (2002b): Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis* 186, 5: 684-689.
- Ajzenberg D, Collinet F, Mercier A, Vignoles P, Darde ML (2010): Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 48, 12: 4641-4645.
- Ajzenberg D, Dumetre A, Darde ML (2005): Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 43, 4: 1940-1943.
- Ajzenberg D, Yera H, Marty P, Paris L, Dalle F, Menotti J, Aubert D, Franck J, Bessieres MH, Quinio D, Pelloux H, Delhaes L, Desbois N, Thulliez P, Robert-Gangneux F, Kauffmann-Lacroix C, Pujol S, Rabodonirina M, Bougnoux ME, Cuisenier B, Duhamel C, Duong TH, Filisetti D, Flori P, Gay-Andrieu F, Pratlong F, Nevez G, Totet A, Carme B, Bonnabau H, Darde ML, Villena I (2009): Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. *J Infect Dis* 199, 8: 1155-1167.
- Araujo JB, da Silva AV, Rosa RC, Mattei RJ, da Silva RC, Richini-Pereira VB, Langoni H (2010): Isolation and multilocus genotyping of *Toxoplasma gondii* in seronegative rodents in Brazil. *Vet Parasitol* 174, 3-4: 328-331.
- Aspinall, T.V., Guy, E.C., Roberts, K.E., Joynson, D.H., Hyde, J.E., Sims, P.F., 2003, Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications. *Int J Parasitol* 33, 1: 97-103.
- Aubert D, Ajzenberg D, Richomme C, Gilot-Fromont E, Terrier ME, de Gevigney C, Game Y, Maillard D, Gibert P, Darde ML, Villena I (2010): Molecular and biological characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in France. *Vet Parasitol* 171, 3-4: 346-349.

- Bastien P, Jumas-Bilak E, Varlet-Marie E, Marty P (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, 4: 430-433.
- Bell A, Ranford-Cartwright L (2002): Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol* 18, 8: 338.
- Bobic B, Jevremovic I, Marinkovic J, Sibalic D, Djurkovic-Djakovic O (1998): Risk factors for Toxoplasma infection in a reproductive age female population in the area of Belgrade, Yugoslavia. *Eur J Epidemiol* 14, 6: 605-610.
- Bobic B, Nikolic A, Djurkovic-Djakovic O (2003): [Identification of risk factors for infection with *Toxoplasma gondii* in Serbia as a basis of a program for prevention of congenital toxoplasmosis]. *Srp Arh Celok Lek* 131, 3-4: 162-167.
- Bobic B, Nikolic A, Klun I, Djurkovic-Djakovic O (2011): Kinetics of Toxoplasma infection in the Balkans. *Wien Klin Wochenschr* 123, Suppl 1, 2-6.
- Bobic B, Nikolic A, Klun I, Vujanic M, Djurkovic-Djakovic O (2007): Undercooked meat consumption remains the major risk factor for Toxoplasma infection in Serbia. *Parassitologia* 49, 4: 227-230.
- Bobić B, Sibalić D, Djurković-Djaković O (1991): High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary toxoplasma infection. Case report. *Gynecol Obstet Invest* 31, 182-184.
- Borst P, Overdulve JP, Weijers PJ, Fase-Fowler F, Van den Berg M (1984): DNA circles with cruciforms from *Isospora (Toxoplasma) gondii*. *Biochim Biophys Acta* 781, 100-111.
- Botterel F, Ichai P, Feray C, Bouree P, Saliba F, Tur Raspa R, Samuel D, Romand S (2002): Disseminated toxoplasmosis, resulting from infection of allograft, after orthotopic liver transplantation: usefulness of quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 40, 5:1648-1650.
- Brooks RG, McCabe RE, Remington JS (1987): Role of serology in the diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy. *Rev Infect Dis* 9, 5: 1055-62.
- Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC (1989): Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27, 8: 1787-1792.
- Caldearo A, Piccolo G, Gorrini C, Peruzzi S, Zerbini L, Bommezzadri S, Dettori G, Chezzi C (2006): Comparison between two real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*. *Acta Biomed* 77, 2: 75-80.
- Carme B, Bissuel F, Ajzenberg D, Bouyne R, Aznar C, Demar M, Bichat S, Louvel D, Bourbigot AM, Peneau C, Neron P, Darde ML (2002): Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J Clin Microbiol* 40, 11: 4037-4044.
- Cassaing S, Bessieres MH, Berry A, Berrebi A, Fabre R, Magnaval JF (2006): Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 44, 3: 720-724.
- Conrad PA, Miller MA, Kreuder C, James ER, Mazet J, Dabritz H, Jessup DA, Gulland F, Grigg ME (2005): Transmission of Toxoplasma: clues from the study of sea otters as sentinels of Toxoplasma gondii flow into the marine environment. *Int J Parasitol* 35, 11-12: 1155-1168.
- Contini C, Seraceni S, Cultrera R, Incorvaia C, Sebastiani A, Picot S (2005): Evaluation of a Real-time PCR-based assay using the lightcycler system for detection of *Toxoplasma*



- gondii* bradyzoite genes in blood specimens from patients with toxoplasmic retinochoroiditis. *Int J Parasitol* 35, 3: 275-283.
- Cornelissen AW, Overdulve JP, van der Ploeg M (1984): Determination of nuclear DNA of five eucoccidian parasites, *Isospora (Toxoplasma) gondii*, *Sarcocystis cruzi*, *Eimeria tenella*, *E. acervulina* and *Plasmodium berghei*, with special reference to gamontogenesis and meiosis in *I. (T.) gondii*. *Parasitology* 88, (Pt 3): 531-553.
- Costa JM, Pautas C, Ernault P, Foulet F, Cordonnier C, Bretagne S (2000): Real-time PCR for diagnosis and follow-up of *Toxoplasma* reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *J Clin Microbiol* 38, 8: 2929-2932.
- Darde M, Ajzenberg D, Smith J (2007): Population Structure and Epidemiology of *Toxoplasma gondii*. In: Weiss, L.M., Kim, K. (Eds.) *Toxoplasma gondii* The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods. *Elsevier*, pp. 49-76.
- Darde ML (1996): Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol* 219, 27-41.
- Darde ML (2008) *Toxoplasma gondii*, "new" genotypes and virulence. *Parasite* 15, 3: 366-371.
- Darde ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M (1992): Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J Parasitol* 78, 5: 786-794.
- Daval S, Poirier P, Armenaud J, Cambon M, Livrelli V (2010): [Development of a real-time PCR assay for quantitative diagnosis of *Toxoplasma gondii* after allogeneic bone marrow transplantation]. *Pathol Biol (Paris)* 58, 1: 104-109.
- de Sousa S, Ajzenberg D, Canada N, Freire L, de Costa J, Darde ML, Thulliez P, Dubey JP (2006): Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. *Vet Parasitol* 135, 2: 133-137.
- Demar M, Ajzenberg D, Maubon D, Djossou F, Panchoe D, Punwasi W, Valery N, Peneau C, Daigre JL, Aznar C, Cottrelle B, Terzan L, Darde ML, Carme B (2007): Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clin Infect Dis* 45, 7: e88-95.
- Demar M, Hommel D, Djossou F, Peneau C, Boukhari R, Louvel D, Bourbigot AM, Nasser V, Ajzenberg D, Darde ML, Carme B (2011): Acute toxoplasmoses in immunocompetent patients hospitalized in an intensive care unit in French Guiana. *Clin Microbiol Infect* doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03648.x.
- Desmonts G, Naot Y, Remington JS (1981): Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. *J Clin Microbiol* 14, 5: 486-491.
- Desmonts G, Remington JS (1980): Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol* 11, 6: 562-568.
- Djurkovic-Djakovic O, Klun I, Khan A, Nikolic A, Knezevic-Usaj S, Bobic B, Sibley LD (2006): A human origin type II strain of *Toxoplasma gondii* causing severe encephalitis in mice. *Microbes Infect* 8, 8: 2206-2212.
- Djurkovic-Djakovic O, Milenković V (2000): Effect of refrigeration and freezing on survival of *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *Acta Vet (Belgrade)* 50, 375-380.

- Đurković-Đaković O (1995): Parazitske infekcije, U: Đurković-Đaković, O., Jovanović, T., Jevtović, Đ., (ured.) Perinatalne infekcije. Velarta, Beograd, 127-149.
- Đurković-Đaković O (1998): Toksoplazmoza i imunosupresija. *Srp Arh Celok Lek* 126, 5-6: 197-203.
- Dubey JP (1977): Persistence of *Toxoplasma gondii* in the tissues of chronically infected cats. *J Parasitol* 63, 1: 156-157.
- Dubey JP (1996): Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *J Parasitol* 82, 6: 957-961.
- Dubey JP (1997a): Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: a comparison of tissue cyst formation in organs of cats, and rodents fed oocysts. *Parasitology* 115, ( Pt 1): 15-20.
- Dubey JP (1997b): Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol* 44, 6: 592-602.
- Dubey JP (2001): Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. *J Parasitol* 87, 1: 215-219.
- Dubey JP (2002): Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. *J Parasitol* 88, 4: 713-717.
- Dubey JP (2010): *Toxoplasmosis of Animals and Humans*, Second edition Edition. CRC Press, 313 p.
- Dubey JP, Beattie CP (1988): *Toxoplasmosis of animals and man*. Boca Raton, CRC Press, 220 p.
- Dubey JP, Frenkel JK (1972): Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool* 19, 1: 155-177.
- Dubey JP, Frenkel JK (1976): Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J Protozool* 23, 4: 537-546.
- Dubey JP, Frenkel JK (1998): Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. *Vet Parasitol* 77, 1: 1-32.
- Dubey JP, Graham DH, da Silva DS, Lehmann T, Bahia-Oliveira LM (2003): *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. *J Parasitol* 89, 4: 851-853.
- Dubey JP, Kotula AW, Sharar A, Andrews CD, Lindsay DS (1990): Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *J Parasitol* 76, 2: 201-204.
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA (1998) Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 11, 2: 267-299.
- Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK (1970a): Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 56, 3: 447-456.
- Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK (1970b): The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J Exp Med* 132, 4: 636-662.
- Dubey JP, Speer CA, Shen SK, Kwok OC, Blixt JA (1997): Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol* 83, 5: 870-882.

- Dubey JP, Su C (2009): Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 2: 190-195.
- Dubey JP, Sundar N, Gennari SM, Minervino AH, Farias NA, Ruas JL, dos Santos TR, Cavalcante GT, Kwok OC, Su C (2007): Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Para state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Vet Parasitol* 143, 2: 182-188.
- Dubey JP, Thayer DW (1994): Killing of different strains of *Toxoplasma gondii* tissue cysts by irradiation under defined conditions. *J Parasitol* 80, 5: 764-767.
- Dubey JP, Weigel RM, Siegel AM, Thulliez P, Kitron UD, Mitchell MA, Mannelli A, Mateus-Pinilla NE, Shen SK, Kwok OC, et al., 1995, Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *J Parasitol* 81, 5: 723-729.
- Dubey JR, Bhaiyat MI, de Allie C, Macpherson CN, Sharma RN, Sreekumar C, Vianna MC, Shen SK, Kwok OC, Miska KB, Hill DE, Lehmann T (2005): Isolation, tissue distribution, and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens in Grenada, West Indies. *J Parasitol* 91, 3: 557-560.
- Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R (1999): Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet* 353, 9167: 1829-1833.
- Edvinsson B, Lappalainen M, Evengard B (2006): Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Clin Microbiol Infect* 12, 2: 131-136.
- Edvinsson B, Lundquist J, Ljungman P, Ringden O, Evengard B (2008): A prospective study of diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection after bone marrow transplantation. *APMIS* 116, 5: 345-351.
- Eida OM, Eida MM, Ahmed AB (2009): Evaluation of polymerase chain reaction on amniotic fluid for diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Egypt Soc Parasitol* 39, 2: 541-550.
- Fazaeli A, Carter PE, Darde ML, Pennington TH (2000): Molecular typing of *Toxoplasma gondii* strains by GRA6 gene sequence analysis. *Int J Parasitol* 30, 5: 637-642.
- Fekkar A, Bodaghi B, Touafek F, Le Hoang P, Mazier D, Paris L (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, 6: 1965-1967.
- Ferguson D, Dubremetz JF (2007): The Ultrastructure of *Toxoplasma gondii*, In: Weiss, L.M., Kim, K. (Eds.) *Toxoplasma gondii*. The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods. Elsevier, p. 777.
- Ferguson DJ, Birch-Andersen A, Siim JC, Hutchison WM (1979): Ultrastructural studies on the sporulation of oocysts of *Toxoplasma gondii*. III. Formation of the sporozoites within the sporocysts. *Acta Pathol Microbiol Scand B* 87, 4: 253-260.
- Filisetti D, Gorcii M, Pernot-Marino E, Villard O, Candolfi E (2003): Diagnosis of congenital toxoplasmosis: comparison of targets for detection of *Toxoplasma gondii* by PCR. *J Clin Microbiol* 41, 10: 4826-4828.
- Fischer HG, Stachelhaus S, Sahm M, Meyer HE, Reichmann G (1998): GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. *Mol Biochem Parasitol* 91, 2: 251-62.

- Foulon W, Pinon JM, Stray-Pedersen B, Pollak A, Lappalainen M, Decoster A, Villena I, Jenun PA, Hayde M, Naessens A (1999): Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: a multicenter evaluation of different diagnostic parameters. *Am J Obstet Gynecol* 181, 4: 843-847.
- Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL (1970): *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 167, 3919: 893-896.
- Frenkel JK, Hassanein KM, Hassanein RS, Brown E, Thulliez P, Quintero-Nunez R (1995): Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama City, Panama: a five-year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds, and soil. *Am J Trop Med Hyg* 53, 5: 458-468.
- Frenkel JK, Ruiz A, Chinchilla M (1975): Soil survival of toxoplasma oocysts in Kansas and Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg* 24, 3: 439-443.
- Freyre A, Dubey JP, Smith DD, Frenkel JK (1989): Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. *J Parasitol* 75, 5: 750-755.
- Fuentes I, Rubio JM, Ramirez C, Alvar J (2001): Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J Clin Microbiol* 39, 4: 1566-1570.
- Fulton JD, Turk JL (1959): Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. *Lancet* 2, 7111: 1068-1069.
- Genchi C, Polidori GA, Zaghini L, Lanfranchi P (1991): Aspetti epidemiologici della toxoplasmosi nell'allevamento intensivo del suino. *Arch. Vet. Ital.* 42, 105-111.
- Golab E, Nowakowska D, Waloch M, Dzbenski TH, Szaflik K, Wilczynski J (2002): [Detection of congenital toxoplasmosis in utero with a polymerase chain reaction on amniotic fluid]. *Wiad Parazytol* 48, 3: 311-315.
- Goldman M, Carver RK, Sulzer AJ (1958): Reproduction of *Toxoplasma gondii* by internal budding. *J Parasitol* 44, 2: 161-171.
- Gratzl R, Hayde M, Kohlhauser C, Hermon M, Burda G, Strobl W, Pollak A (1998): Follow-up of infants with congenital toxoplasmosis detected by polymerase chain reaction analysis of amniotic fluid. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17, 12: 853-858.
- Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC, Margolis TP (2001): Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J Infect Dis* 184, 5: 633-639.
- Grigg ME, Suzuki Y (2003): Sexual recombination and clonal evolution of virulence in *Toxoplasma*. *Microbes Infect* 5, 7: 685-690.
- Guy E, Joyson D (1995): Potential of the Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Active *Toxoplasma* Infection by Detection of Parasite in Blood. *J Infect Dis* 172, 1: 319-322.
- Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M (1994): Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med* 331, 11: 695-699.
- Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, Verschueren H (2000): Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol* 30, 1: 69-75.
- Honore S, Couvelard A, Garin YJ, Bedel C, Henin D, Darde ML, Derouin F (2000): [Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients]. *Pathol Biol (Paris)* 48, 6: 541-547.

- Howe DK, Honore S, Derouin F, Sibley LD (1997): Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 35, 6: 1411-1414.
- Howe DK, Sibley LD (1995): *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 172, 6: 1561-1566.
- Hughes, J.M., Williams, R.H., Morley, E.K., Cook, D.A., Terry, R.S., Murphy, R.G., Smith, J.E., Hide, G., 2006, The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. *Parasitology* 132, (Pt 1): 29-36.
- Hurtado A, Aduriz G, Moreno B, Barandika J, Garcia-Perez AL (2001): Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Vet Parasitol* 102, 1-2: 17-27.
- Hutchison, W.M., 1965, Experimental Transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature* 206, 961-962.
- Hutchison, W.M., Dunachie, J.F., Siim, J.C., Work, K., 1969, Life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Br Med J* 4, 5686: 806.
- Iseki M, Nishibayashi M, Sano R, Ogo T, Inamoto T, Shibuya J (1972): Prevalence of *Toxoplasma* antibodies in rats in Osaka. *Japanese Parasitol J* 21, 39-44.
- Jacobs L (1974): *Toxoplasma gondii*: parasitology and transmission. *Bull N Y Acad Med* 50, 2: 128-145.
- Jacobs L, Lunde MN (1957): Hemagglutination test for toxoplasmosis. *Science* 125, 3256: 1035.
- Jacobs L, Remington JS, Melton ML (1960): The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 46, 11-21.
- Jalal S, Nord CE, Lappalainen M, Evengard B (2004) Rapid and sensitive diagnosis of *Toxoplasma gondii* infections by PCR. *Clin Microbiol Infect* 10, 10: 937-939.
- Jauregui LH, Higgins J, Zarlenga D, Dubey JP, Lunney JK (2001): Development of a real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. *J Clin Microbiol* 39, 6: 2065-2071.
- Joiner KA, Fuhrman SA, Miettinen HM, Kasper LH, Mellman I (1990): *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science* 249, 4969: 641-646.
- Kasper DC, Sadeghi K, Prusa AR, Reischer GH, Kratochwill K, Forster-Waldl E, Gerstl N, Hayde M, Pollak A, Herkner KR (2009): Quantitative real-time polymerase chain reaction for the accurate detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis* 63, 1: 10-15.
- Kellen A, Ayllon-Leindl L, Labzoffsky N (1962): Indirect fluorescent antibody method in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Can J Microbiol* 8, 545-554.
- Khalifa K, Roth A, Roth B, Arasteh K, Janitschke K (1994): Value of PCR for Evaluating Occurrence of Parasitemia in Immunocompromised Patients with Cerebral and Extracerebral Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 32, 11: 2813-2819.
- Khan A, Jordan C, Muccioli C, Vallochi AL, Rizzo LV, Belfort RJr, Vitor RW, Silveira C, Sibley LD (2006): Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 12, 6: 942-949.

- Khan A, Su C, German M, Storch GA, Clifford DB, Sibley LD (2005): Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. *J Clin Microbiol* 43, 12: 5881-5887.
- Khan A, Taylor S, Su C, Sibley D, Paulsen IT, Ajioka JW (2007): Genetics and Genome Organization of *Toxoplasma gondii* In: Ajioka, J.W., Soldati, D. (Eds.) *Toxoplasma: Molecular and Cellular Biology*. Horizon Bioscience, p. 626.
- Kijlstra A, Meerburg B, Cornelissen J, De Craeye S, Vereijken P, Jongert E (2008): The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. *Vet Parasitol* 156, 3-4: 183-190.
- Klun I, Djurkovic-Djakovic O, Katic-Radivojevic S, Nikolic A (2006): Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors. *Vet Parasitol* 135, 2: 121-131.
- Kompalic-Cristo A, Frotta C, Suarez-Mutis M, Fernandes O, Britto C (2007): Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. *Parasitol Res* 101, 3: 619-625.
- Kotula AW, Dubey JP, Sharar AK, Andrews CD, Shen SK, Lindsay, DS (1991): Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *J Food Protection* 54, 9: 687-690.
- Kutičić V, Wikerhauser T, Gracner D (2005): A survey of rats and mice for latent toxoplasmosis in Croatia: a case report. *Vet. Med. – Czech* 50, 11: 513-514.
- Lecordier L, Moleon-Borodowsky I, Dubremetz J F, Tourvieille B, Mercier C, Deslee D, Capron A, Cesbron-Delauw M F (1995): Characterization of a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* (GRA6) associated to the network of the parasitophorous vacuole. *Mol Biochem Parasitol* 70, 1-2: 85-94.
- Lehmann T, Blackston CR, Parmley SF, Remington JS, Dubey JP (2000): Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. *J Parasitol* 86, 5: 960-971.
- Lekutis C, Ferguson DJ, Grigg ME, Camps M, Boothroyd JC (2001): Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int J Parasitol* 31, 12: 1285-92
- Lelong M, Bernard J, Desmonts G, Couvreur J (1960): [Acquired toxoplasmosis. (Study of 227 cases)]. *Arch Fr Pediatr* 17, 281-331.
- Liesenfeld O, Roth A, Weinke T, Foss HD, Hahn H (1994): A case of disseminated toxoplasmosis-value of PCR for the diagnosis. *J Infect* 29, 2: 133-138.
- Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP (2000): Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 38, 11: 4121-4125.
- Lin S, Ling ZC, Zeng BC, Yang HY (1990): Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in man and animals in Guangdong, Peoples Republic of China. *Vet Parasitol* 34, 4: 357-360.
- Lindsay DS, Dubey JP (2011): *Toxoplasma gondii*: the changing paradigm of congenital toxoplasmosis. *Parasitology* 138, 14: 1829-1831.
- Lubroth J, Dreesen D, Ridenhour R (1983): The role of rodents and other wildlife in the epidemiology of swine toxoplasmosis. *Prev Vet Med* 1, 169-178.
- Luft BJ, Remington JS (1992): Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis* 15, 2: 211-222.

- Ma YY, Mu RL, Wang LY, Jiang S (2003): [Study on prenatal diagnosis using fluorescence quantitative polymerase chain reaction for congenital toxoplasmosis]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 38, 1: 8-10.
- Manger ID, Hehl A, Parmley S, Sibley LD, Marra M, Hillier L, Waterston R, Boothroyd JC (1998): Expressed sequence tag analysis of the bradyzoite stage of *Toxoplasma gondii*: identification of developmentally regulated genes. *Infect Immun* 66, 4: 1632-1637.
- Marshall PA, Hughes JM, Williams RH, Smith JE, Murphy RG, Hide G (2004): Detection of high levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in natural urban populations of *Mus domesticus*. *Parasitology* 128, (Pt1): 39-42.
- Mehlhorn H, Frenkel JK (1980): Ultrastructural comparison of cysts and zoites of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis muris*, and *Hammondia hammondi* in skeletal muscle of mice. *J Parasitol* 66, 1: 59-67.
- Menotti J, Garin YJ, Thulliez P, Serugue MC, Stanislawiak J, Ribaud P, de Castro N, Houze S, Derouin F (2010): Evaluation of a new 5'-nuclease real-time PCR assay targeting the *Toxoplasma gondii* AF146527 genomic repeat. *Clin Microbiol Infect* 16, 4: 363-368.
- Menotti J, Vilela G, Romand S, Garin YJ, Ades L, Gluckman E, Derouin F, Ribaud P (2003): Comparison of PCR-enzyme-linked immunosorbent assay and real-time PCR assay for diagnosis of an unusual case of cerebral toxoplasmosis in a stem cell transplant recipient. *J Clin Microbiol* 41, 11: 5313-5316.
- Mesquita RT, Ziegler AP, Hiramoto RM, Vidal JE, Pereira-Chiocola VL (2010): Real-time quantitative PCR in cerebral toxoplasmosis diagnosis of Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients. *J Med Microbiol* 59, 6: 641-647.
- Messaritakis I, Detsika M, Koliou M, Sifakis S, Antoniou M (2008): Prevalent genotypes of *Toxoplasma gondii* in pregnant women and patients from Crete and Cyprus. *Am J Trop Med Hyg* 79, 2: 205-209.
- Miller MA, Grigg ME, Kreuder C, James ER, Melli AC, Crosbie PR, Jessup DA, Boothroyd JC, Brownstein D, Conrad PA (2004): An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. *Int J Parasitol* 34, 3: 275-284.
- Montoya JG, Liesenfeld O (2004): Toxoplasmosis. *Lancet* 363, 9425: 1965-1976.
- Murphy RG, Williams RH, Hughes JM, Hide G, Ford NJ, Oldbury DJ (2008): The urban house mouse (*Mus domesticus*) as a reservoir of infection for the human parasite *Toxoplasma gondii*: an unrecognised public health issue? *Int J Environ Health Res* 18, 3: 177-185.
- Naot Y, Desmots G, Remington JS (1981): IgM enzyme-linked immunosorbent assay test for the diagnosis of congenital Toxoplasma infection. *J Pediatr* 98, 1: 32-36.
- Nicolle C, Manceaux L (1908): Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Acad Sci* 147, 736.
- Nicolle C, Manceaux L (1909): Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C R Acad Sci* 148, 369.
- Nishi M, Hu K, Murray JM, Roos DS (2008): Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 121, (Pt 9): 1559-1568.
- Nowakowska D, Colon I, Remington JS, Grigg M, Golab E, Wilczynski J, Sibley LD (2006): Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multiplex PCR and peptide-based serological testing of samples from infants in Poland diagnosed with congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 44, 4: 1382-1389.

- Okhravi N, Jones CD, Carroll N, Adamson P, Luthert P, Lightman S (2005): Use of PCR to diagnose *Toxoplasma gondii* chorioretinitis in eyes with severe vitritis. *Clin Experiment Ophthalmol* 33, 2: 184-187.
- Pappas G, Roussos N, Falagas ME (2009): Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol* 39, 12: 1385-1394.
- Peloux Y, Couzineau P, Baufine-Ducrocq H, Tayot JL, Jacquot D (1973): [Direct agglutination test for toxoplasma. Role of immunoglobulins 19S and 7S. Preliminary notes]. *Ann Biol Clin (Paris)* 31, 3: 185-192.
- Perrin T, Brigham G, Pickens E (1943): Toxoplasmosis in wild rats. *J Infect Dis* 72, 91-96.
- Prestrud KW, Asbakk K, Mork T, Fuglei E, Tryland M, Su C (2008): Direct high-resolution genotyping of *Toxoplasma gondii* in arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in the remote arctic Svalbard archipelago reveals widespread clonal Type II lineage. *Vet Parasitol* 158, 1-2: 121-128.
- Reischl U, Bretagne S, Kruger D, Ernault P, Costa JM (2003): Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect Dis* 3, 7.
- Remington JS, McLeod R, Thuilliez P, Desmots G (2006): Toxoplasmosis, In: Remington, J.S., Klein, J.O., Wilson, C.B., Baker, C. (Eds.) *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. Elsevier Saunders, Philadelphia, PA, USA, pp. 947-1091.
- Remington JS, Miller MJ, Brownlee I (1968): IgM antibodies in acute toxoplasmosis. I. Diagnostic significance in congenital cases and a method for their rapid demonstration. *Pediatrics* 41, 6: 1082-1091.
- Richomme C, Aubert D, Gilot-Fromont E, Ajzenberg D, Mercier A, Ducrot C, Ferte H, Delorme D, Villena I (2009): Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from wild boar (*Sus scrofa*) in France. *Vet Parasitol* 164, 2-4: 296-300
- Romand S, Wallon M, Franck J, Thuilliez P, Peyron F, Dumon H (2001): Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. *Obstet Gynecol* 97, 2: 296-300.
- Sabaj V, Galindo M, Silva D, Sandoval L, Rodríguez JC (2010): Analysis of *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 gene (SAG2). Relevance of genotype I in clinical toxoplasmosis. *Mol Biol Rep* 37, 6: 2927-2933.
- Sabin AB (1941): Toxoplasmic encephalitis in children, *JAMA* 116: 807-714.
- Sabin AB, Feldman HA (1948): Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (Toxoplasma). *Science* 108, 2815: 660-663.
- Sabin AB, Olitsky PK (1937): Toxoplasma and Obligate Intracellular Parasitism. *Science* 85, 2205: 336-338.
- Sheffield HG, Melton ML (1968): The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 54, 2: 209-226.
- Sibley LD (2003): Recent origins among ancient parasites. *Vet Parasitol* 115, 2: 185-198.
- Sibley LD, Boothroyd JC (1992): Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359, 6390: 82-85.
- Sibley LD, Weidner E, Krahenbuhl JL (1985): Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* 315, 6018: 416-419.



- Smith KE, Zimmerman JJ, Patton S, Beran GW, Hill HT (1992): The epidemiology of toxoplasmosis on Iowa swine farms with an emphasis on the roles of free-living mammals. *Vet Parasitol* 42, 3-4: 199-211.
- Splendore A (1908): Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uoma. Nota preliminare pel. *Rev Soc Sci Sao Paulo* 3, 109-112.
- Su C, Evans D, Cole RH, Kissinger JC, Ajioka JW, Sibley LD (2003): Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science* 299, 5605: 414-416.
- Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP (2010): Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 137, 1: 1-11.
- Su C, Zhang X, Dubey JP (2006): Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *Int J Parasitol* 36, 7: 841-848.
- Switaj K, Master A, Skrzypczak M, Zaborowski P (2005): Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. *Clin Microbiol Infect* 11, 3: 170-176.
- Šibalić D, Radović M, Martinović M, Pralica J (1973) Pojavljivanje akvirirane toksoplazmoze kod ljudi. *Acta Parasitol Jug* 4, 107-118.
- Talabani H, Asseraf M, Yera H, Delair E, Ancelle T, Thulliez P, Brezin AP, Dupouy-Camet J (2009): Contributions of immunoblotting, real-time PCR, and the Goldmann-Witmer coefficient to diagnosis of atypical toxoplasmic retinochoroiditis. *J Clin Microbiol* 47, 7: 2131-2135.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM (2000): *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30, 12-13: 1217-1258.
- Thulliez P, Daffos F, Forestier F (1992): Diagnosis of *Toxoplasma* infection in the pregnant woman and the unborn child: current problems. *Scand J Infect Dis Suppl* 84, 18-22.
- Vidal JE, Colombo FA, de Oliveira AC, Focaccia R, Pereira-Chiocola VL (2004): PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. *J Clin Microbiol* 42, 10: 4765-4768.
- Villard O, Filisetti D, Roch-Deries F, Garweg J, Flament J, Candolfi E (2003): Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, immunoblotting, and PCR for diagnosis of toxoplasmic chorioretinitis. *J Clin Microbiol* 41, 8: 3537-3541.
- Villena I, Aubert D, Gomis P, Ferte H, Ingland JC, Denis-Bisiaux H, Dondon JM, Pisano E, Ortis N, Pinon JM (2004): Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. *Appl Environ Microbiol* 70, 7: 4035-4039
- Voller A, Bidwell DE, Bartlett A, Fleck DG, Perkins M, Oladehin B (1976): A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody. *J Clin Pathol* 29, 2: 150-153.
- Wallon M, Franck J, Thulliez P, Huissoud C, Peyron F, Garcia-Meric P, Kieffer F (2010): Accuracy of real-time polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. *Obstet Gynecol* 115, 4: 727-733.
- Work K, Hutchison WM (1969a): The new cyst of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol Microbiol Scand* 77, 3: 414-424.
- Work K, Hutchison WM (1969b): A new cystic form of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol Microbiol Scand* 75, 1: 191-192.

***ПРИЛОЗИ***

**Прилог 1.**

Нуклеотидна секвенца региона 529 бп *T. gondii* (прајмери 529fo и 529re за PCR у реалном времену су подвучени, а проба 529 је означена црвено):

```
>gi|5916167|gb|AF146527.1|AF146527 Toxoplasma gondii repeat region
CTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTGTTTTTTATTTTTTTCTTTTTGTTTTTCTGATTTTTGT
TTTTTTGACTCGGGCCCAGCTGCGTCTGTCGGGATGAGACCGCGGAGCCGAAGTGCCTTTT
CTTTTTTGACTTTTTTTGTTTTTTTCACAGGCAAGCTCGCCTGTGCTTGGAGCCACAGAAGG
GACAGAAGTCGAAGGGGACTACAGACGCGATGCCGCTCCTCCAGCCGTCTTGGAGGAGAGA
TATCAGGACTGTAGATGAAGGCGAGGGTGAGGATGAGGGGGTGGCGTGGTTGGGAAGCGAC
GAGAGTCGGAGAGGGAGAAGATGTTCCGGCTTGGCTGCTTTTCCTGGAGGGTGGAAAAAG
AGACACCGGAATGCGATCCAGACGAGACGACGCTTTCCTCGTGGTGATGGCGGAGAGAATT
GAAGAGTGGAGAAGAGGGGCGAGGGGAGACAGAGTCGGAGGCTTGGACGAAGGGAGGAGGA
GGGGTAGGAGAGGAATCCAGATGCACTGTGTCTGCAG
```

Нуклеотидна секвенца региона 529 бп *T. gondii* (прајмери HO1и HO2 за PCR у реалном времену су подвучени, а проба HOFT је означена црвено):

```
>gi|5916167|gb|AF146527.1|AF146527 Toxoplasma gondii repeat region
CTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTGTTTTTTATTTTTTTCTTTTTGTTTTTCTGATTTTTGT
TTTTTTGACTCGGGCCCAGCTGCGTCTGTCGGGATGAGACCGCGGAGCCGAAGTGCCTTTT
CTTTTTTGACTTTTTTTGTTTTTTTCACAGGCAAGCTCGCCTGTGCTTGGAGCCACAGAAGG
GACAGAAGTCGAAGGGGACTACAGACGCGATGCCGCTCCTCCAGCCGTCTTGGAGGAGAGA
TATCAGGACTGTAGATGAAGGCGAGGGTGAGGATGAGGGGGTGGCGTGGTTGGGAAGCGAC
GAGAGTCGGAGAGGGAGAAGATGTTCCGGCTTGGCTGCTTTTCCTGGAGGGTGGAAAAAG
AGACACCGGAATGCGATCCAGACGAGACGACGCTTTCCTCGTGGTGATGGCGGAGAGAATT
GAAGAGTGGAGAAGAGGGGCGAGGGGAGACAGAGTCGGAGGCTTGGACGAAGGGAGGAGGA
GGGGTAGGAGAGGAATCCAGATGCACTGTGTCTGCAG
```

**Прилог 2****SAG1 ген (прајмери 08 f и 010 r)**Умножени регион код *T. gondii* типа I (GT1 сој):

&gt;TGGT1\_chrVIII | | 2663159 to 2663427

TCCTGTCAAGTTGTCTGCGGAAGGACCCACTACAATGACCCTCGTGTGCGGAAAGATGGAG  
TCAAAGTTCCTCAAGACAACAATCAGTACTGTTCCGGGACGACGCTGACTGGTTGCAACGAG  
AAATCGTTCAAAGATATTTTGCCAAAATTAAGTGAGAACCCGTGGCAGGGTAACGCTTCGAG  
TGATAAGGGTGCCACGCTAACGATCAAGAAGGAAGCATTTCAGCCGAGTCAAAAAGCGTC  
ATTATTGGATGCACAGGGGGAT

Умножени регион код *T. gondii* типа II (ME49 сој):

&gt;TGME49\_chrVIII | | 2663210 to 2663478

TCCTGTCAAGTTGTCTGCGGAAGGACCCACTACAATGACCCTCGTGTGCGGAAAGATGGAG  
TCAAAGTTCCTCAAGACAACAATCAGTACTGTTCCGGGACGACGCTGACTGGTTGCAACGAG  
AAATCGTTCAAAGATATTTTGCCAAAATTAAGTGAGAACCCGTGGCAGGGTAACGCTTCGAG  
TGATAATGGTGCCACGCTAACGATCAACAAGGAAGCATTTCAGCCGAGTCAAAAAGCGTC  
ATTATTGGATGCACAGGGGGAT

Умножени регион код *T. gondii* типа III (VEG сој):

&gt;TGVEG\_chrVIII | | 2663135 to 2663403

TCCTGTCAAGTTGTCTGCGGAAGGACCCACTACAATGACCCTCGTGTGCGGAAAGATGGAG  
TCAAAGTTCCTCAAGACAACAATCAGTACTGTTCCGGGACGACGCTGACTGGTTGCAACGAG  
AAATCGTTCAAAGATATTTTGCCAAAATTAAGTGAGAACCCGTGGCAGGGTAACGCTTCGAG  
TGATAATGGTGCCACGCTAACGATCAACAAGGAAGCATTTCAGCCGAGTCAAAAAGCGTC  
ATTATTGGATGCACAGGGGGAT

Поравнање секвенци сва три клонска типа (разлике су означене црвено и без звездице):

```

Me49      TCCTGTCAAGTTGTCTGCGGAAGGACCCACTACAATGACCCTCGTGTGCGGAAAGATGG 60
VEG       TCCTGTCAAGTTGTCTGCGGAAGGACCCACTACAATGACCCTCGTGTGCGGAAAGATGG 60
GT1       TCCTGTCAAGTTGTCTGCGGAAGGACCCACTACAATGACCCTCGTGTGCGGAAAGATGG 60
          *****

Me49      AGTCAAAGTTCCTCAAGACAACAATCAGTACTGTTCCGGGACGACGCTGACTGGTTGCAA 120
VEG       AGTCAAAGTTCCTCAAGACAACAATCAGTACTGTTCCGGGACGACGCTGACTGGTTGCAA 120
GT1       AGTCAAAGTTCCTCAAGACAACAATCAGTACTGTTCCGGGACGACGCTGACTGGTTGCAA 120
          *****

Me49      CGAGAAATCGTTCAAAGATATTTTGCCAAAATTAAGTGAGAACCCGTGGCAGGGTAACGC 180
VEG       CGAGAAATCGTTCAAAGATATTTTGCCAAAATTAAGTGAGAACCCGTGGCAGGGTAACGC 180
GT1       CGAGAAATCGTTCAAAGATATTTTGCCAAAATTAAGTGAGAACCCGTGGCAGGGTAACGC 180
          *****

Me49      TTCGAGTGATAATGGTGCCACGCTAACGATCAACAAGGAAGCATTTCCAGCCGAGTCAAA 240
VEG       TTCGAGTGATAATGGTGCCACGCTAACGATCAACAAGGAAGCATTTCCAGCCGAGTCAAA 240
GT1       TTCGAGTGATAAGGGTGCCACGCTAACGATCAAGAAGGAAGCATTTCCAGCCGAGTCAAA 240
          *****

Me49      AAGCGTCATTTATTGGATGCACAGGGGGAT 269
VEG       AAGCGTCATTTATTGGATGCACAGGGGGAT 269
GT1       AAGCGTCATTTATTGGATGCACAGGGGGAT 269
          *****
    
```

Деловање рестрикционог ензима Dde I на ДНК *T. gondii* соја GT1 који припада типу I:



### Прилог 3

#### SAG2 ген (прајмери A1 f и A2 r)

Умножени региони код *T. gondii* типа I (GT1 сој):

```
>TGGT1_chrVIII | | 4756746 to 4756987
GAAATGTTTCAGGTTGCTGCAGTGACCCATCTGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATTCT
GTGTGTTGTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACTGAGTTGTGATTGTGCACAATTGCGGTGTG
ACACSTTCTGTCTCGTTCCAATCTTTGTCTTGTTCGGAACATGAGTTTCTCAAAGACCACGAG
CCTAGCGTCGCTAGCGCTCACGGGCTTGTTTGTGTTCAAGTTCGCTCTTGC
```

Умножени регион код *T. gondii* типа II (ME49 сој):

```
>TGME49_chrVIII | | 4753182 to 4753423
GAAATGTTTCAGGTTGCTGCAGTGACCCATCTGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATTCT
GTGTGTTGTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACTGAGTTGTGATTGTGCACAATTGCGGTGTG
ACACSTTCTGTCTCGTTCCAATCTTTGTCTTGTTCGGAACATGAGTTTCTCAAAGACCACGAG
CCTAGCGTCGCTAGCGCTCACGGGCTTGTTTGTGTTCAAGTTCGCTCTTGC
```

Умножени регион код *T. gondii* типа III (VEG сој):

```
>TGVEG_chrVIII | | 4757188 to 4757429
GAAATGTTTCAGGTTGCTGCAGTGACCCATCTGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATCCT
GTGTGTTGTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACTGAGTTGTGATTGTGCACAATTGCGGTGTG
ACACSTTCTGTCTCGTTCCAATCTTTGTCTTGTTCGGAACATGAGTTTCTCAAAGACCACGAG
CCTAGCGTCGCTAGCGCTCACGGGCTTGTTTGTGTTCAAGTTCGCTCTTGC
```

Поравнање секвенци сва три клонска типа (разлике су означене црвено и без звездице):

GT1	GAAATGTTTCAGGTTGCTGCAGTGACCCATCTGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATTCT	60
ME49	GAAATGTTTCAGGTTGCTGCAGTGACCCATCTGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATTCT	60
VEG	GAAATGTTTCAGGTTGCTGCAGTGACCCATCTGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATTCT	60
	*****	
GT1	CTGTGTGTTGTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACTGAGTTGTGATTGTGCACAATTGCG	120
ME49	CTGTGTGTTGTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACTGAGTTGTGATTGTGCACAATTGCG	120
VEG	CTGTGTGTTGTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACTGAGTTGTGATTGTGCACAATTGCG	120
	*****	
GT1	GTGTGACACSTTCTGTCTCGTTCCAATCTTTGTCTTGTTCGGAACATGAGTTTCTCAAAG	180
ME49	GTGTGACACSTTCTGTCTCGTTCCAATCTTTGTCTTGTTCGGAACATGAGTTTCTCAAAG	180
VEG	GTGTGACACSTTCTGTCTCGTTCCAATCTTTGTCTTGTTCGGAACATGAGTTTCTCAAAG	180
	*****	
GT1	ACCACGAGCCTAGCGTCGCTAGCGCTCACGGGCTTGTTTGTGTTCAAGTTCGCTCTT	240
ME49	ACCACGAGCCTAGCGTCGCTAGCGCTCACGGGCTTGTTTGTGTTCAAGTTCGCTCTT	240
VEG	ACCACGAGCCTAGCGTCGCTAGCGCTCACGGGCTTGTTTGTGTTCAAGTTCGCTCTT	240
	*****	
GT1	GC	242
ME49	GC	242
VEG	GC	242
	**	

Деловање рестрикционог ензима Mbo I на ДНК *T. gondii* соја VEG који припада типу III:



## SAG2 ген (прајмери B1 f и B2 r)

Умножени региони код *T. gondii* типа I (GT1 сој):

>TGGT1\_chrVIII | | 4757837 to 4758058

ATTCTCATGCCTCCGCTTCGAAATTGTCGTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATTGC  
GATTGTTCTTGGCGTAGATCCTGGGAGGAACGCGAGAAAATGTATTTCCGGATCTGCGATTA  
 TGTGACAGAGGAACCTGTTTGCCACACACTGCTGCAGTACTGTGCTTTCCGCCAGACACA  
 ACCAGTGTCCGGCGGGTGTGCCTTCGTGAAACGTT

Умножени регион код *T. gondii* типа II (ME49 сој):

>TGME49\_chrVIII | | 4754276 to 4754497

ATTTTCATGCCTCCGCTTCGAAATTGTCGTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATTGC  
GATTGTTCTTGGCGTAGATCCTGGGAGGAACGCGAGAAAATGTATTTCCGGATCTGCGATTA  
 TGTGACAGAGGAACCTGTTTGCCGACACACTGCTGCAGTACTGCGCTTTCCGCCAGACACA  
 ACCAGTGTCCGGCGGGTGTGCCTTCGTGAAACGTT

Умножени регион код *T. gondii* типа III (VEG сој):

>TGVEG\_chrVIII | | 4758279 to 4758500

ATTCTCATGCCTCCGCTTCGAAATTGTCGTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATTGC  
GATTGTTCTTGGCGTAGATCCTGGGAGGAACGCGAGAAAATGTATTTCCGGATCTGCGATTA  
 TGTGACAGAGGAACCTGTTTGCCACACACTGCTGCAGTACTGTGCTTTCCGCCAGACACA  
 ACCAGTGTCCGGCGGGTGTGCCTTCGTGAAACGTT

Поравнање секвенци сва три клонска типа (разлике су означене црвено и без звездице):

GT1	ATTCTCATGCCTCCGCTTCGAAATTGTCGTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATT	60
VEG	ATTCTCATGCCTCCGCTTCGAAATTGTCGTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATT	60
Me49	ATTTCATGCCTCCGCTTCGAAATTGTCGTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATT	60
	***	
GT1	GCGATTGTTCTTGGCGTAGATCCTGGGAGGAACGCGAGAAAATGTATTTCCGGATCTGCG	120
VEG	GCGATTGTTCTTGGCGTAGATCCTGGGAGGAACGCGAGAAAATGTATTTCCGGATCTGCG	120
Me49	GCGATTGTTCTTGGCGTAGATCCTGGGAGGAACGCGAGAAAATGTATTTCCGGATCTGCG	120
	*****	
GT1	ATTATGTGACAGAGGAACCTGTTTGCCACACACTGCTGCAGTACTGTGCTTTCCGCCA	180
VEG	ATTATGTGACAGAGGAACCTGTTTGCCACACACTGCTGCAGTACTGTGCTTTCCGCCA	180
Me49	ATTATGTGACAGAGGAACCTGTTTGCCACACACTGCTGCAGTACTGCGCTTTCCGCCA	180
	*****	
GT1	GACACAACCAGTGTTCGGCGGGTGTGCCTTCGTGAAACGTT	222
VEG	GACACAACCAGTGTTCGGCGGGTGTGCCTTCGTGAAACGTT	222
Me49	GACACAACCAGTGTTCGGCGGGTGTGCCTTCGTGAAACGTT	222
	*****	



Деловање рестрикционог ензима Hha I на ДНК *T. gondii* соја Me49 који припада типу II:



**Прилог 4****GRA6 (прајмери GRA6 f и GRA6 r)**

Умножени региони код *T. gondii* типа I (GT1 сој):

>TGGT1\_chrX | | 7194719 to 7195062 (reverse-complement)  
TTTCCGAGCAGGTGACCTGGGTCGCTTTTTTGAAACAGCAGGAAAACAGCTTCGTGGTGCCA  
 CGTAGCGTGCTTGTTGGCGACTACSTTTTTTCTTGGGAGTGTCGGCGAAATGGCACACGGT  
 GGCATCCATCTGAGGCAGAAGCGTAACTTCTGTCTGTAAGTGTCTCCACAGTTGCTGTGGT  
 CTTTGTAGTCTTCATGGGTGTAAGTCTGTCGTAATTCGTTGGGTGGAGTCGCTGTCGCAGCAGACA  
 GCGGTGGTGTTAAGCAGACCCCTTCGGAAACCGGTTTCGAGCGGTGGACAGCAAGAAGCAGT  
 GGGGACCACTGAAGACTATGTCAACTCTTCGGCGA

Умножени регион код *T. gondii* типа II (ME49 сој):

>TGME49\_chrX | | 7215572 to 7215915 (reverse-complement)  
TTTCCGAGCAGGTGACCTGGGTCGCTTTTTTGAAACAGCAGGAAAACAGCTTCGTGGTGCCA  
 CGTAGCGTGCTTGTTGGCGACTACSTTTTTTCTTGGGAGTGTCGGCGAAATGGCACACGGT  
 GGCATCTATCTGAGGCAGAAGCGTAACTTCTGTCTTTAACTGTCTCCACAGTTGCTGTGGTC  
 TTTGTAGTCTTCATGGGTGTAAGTCTGTCGTAATTCGTTGGGTGGAGTCGCTGTCGCAGCAGACAG  
 CCGTGGTGTTAAGCAGACCCCTTCGGAAACCGGTTTCGAGCGGTGGACAGCAAGAAGCAGTG  
 GGGACCACTGAAGACTATGTCAACTCTTCGGCGA

Умножени регион код *T. gondii* типа III (VEG сој):

>TGVEG\_chrX | | 7265986 to 7266329 (reverse-complement)  
TTTCCGAGCAGGTGACCTGGGTCGCTTTTTTGAAACAGCAGGAAAACAGCTTCGTGGTGCCA  
 CGTAGCGTGCTTGTTGGCGACTACSTTTTTTCTTGGGAGTGTCGGCGAAATGGCACACGGT  
 GGCATCCATCTGAGGCAGAAGCGTAACTTCTGTCTTTAACTGTCTCCACAGTTGCTGTGGTC  
 TTTGTAGTTTTTCATGGGTGTAAGTCTGTCGTAATTCGTTGGGTGGAGTCGCTGTCGCAGCAGACAGC  
 GATGGTGTTAAGCAGACCCCTTCGGAAACCGGTTTCGAGCGGTGGACAGCAAGAAGCAGTGG  
 GGACCACTGAAGACTATGTCAACTCTTCGGCGA

Поравнање секвенци сва три клонска типа (разлике су означене црвено и без звездице):

```

GT1      TTTCCGAGCAGGTGACCTGGGTCGCTTTTTTGAACAGCAGGAAAACAGCTTCGTGGTGC 60
VEG      TTTCCGAGCAGGTGACCTGGGTCGCTTTTTTGAACAGCAGGAAAACAGCTTCGTGGTGC 60
ME49     TTTCCGAGCAGGTGACCTGGGTCGCTTTTTTGAACAGCAGGAAAACAGCTTCGTGGTGC 60
          *****

GT1      CACGTAGCGTGCTTGTGGCGACTACCTTTTTTCTTGGGAGTGTGGCGAAATGGCACA 120
VEG      CACGTAGCGTGCTTGTGGCGACTACCTTTTTTCTTGGGAGTGTGGCGAAATGGCACA 120
ME49     CACGTAGCGTGCTTGTGGCGACTACCTTTTTTCTTGGGAGTGTGGCGAAATGGCACA 120
          *****

GT1      CGGTGGCATCCATCTGAGGCAGAAGCGTAACTTCTGTCCCTGTAAGTGTCTCCACAGTTGC 180
VEG      CGGTGGCATCCATCTGAGGCAGAAGCGTAACTTCTGTCCCTTAAAGTGTCTCCACAGTTGC 180
ME49     CGGTGGCATCTATCTGAGGCAGAAGCGTAACTTCTGTCCCTTAAAGTGTCTCCACAGTTGC 180
          *****

GT1      TGTGGTCTTTGTAGTCTTCATGGGTGTACTCGTCAATTCGTTGGGTGGAGTCGCTGTTCGC 240
VEG      TGTGGTCTTTGTAGTTTCATGGGTGTACTCGTCAATTCGTTGGGTGGAGTCGCTGTTCGC 240
ME49     TGTGGTCTTTGTAGTCTTCATGGGTGTACTCGTCAATTCGTTGGGTGGAGTCGCTGTTCGC 240
          *****

GT1      AGCAGACAGCGGTGGTGTTAAGCAGACCCCTTCGGAAACCGGTTTCGAGCGGTGGACAGCA 300
VEG      AGCAGACAGCGATGGTGTTAAGCAGACCCCTTCGGAAACCGGTTTCGAGCGGTGGACAGCA 300
ME49     AGCAGACAGCGGTGGTGTTAGCAGACCCCTTCGGAAACCGGTTTCGAGCGGTGGACAGCA 300
          *****

GT1      AGAAGCAGTGGGGACCACTGAAGACTATGTCAACTCTTCGGCGA 344
VEG      AGAAGCAGTGGGGACCACTGAAGACTATGTCAACTCTTCGGCGA 344
ME49     AGAAGCAGTGGGGACCACTGAAGACTATGTCAACTCTTCGGCGA 344
          *****

```

Деловање рестрикционог ензима Mse I на ДНК *T. gondii* соја GT1 који припада типу I:



Деловање рестрикционог ензима Mse I на ДНК *T. gondii* соја Me49 који припада типу II:



Деловање рестрикционог ензима Mse I на ДНК *T. gondii* соја VEG који припада типу III:



**Прилог 5****GRA7 (прајмери GRA7 и GRA2b)**

Умножени региони код *T. gondii* типа I (GT1 сој):

>TGGT1\_chrVIIa | | 2585352 to 2585789

TTCCGACGCTGAAGTGACTGACGACAACATCTACGAGGAGCACACTGATCGTAAAGTGGTTC  
 CGAGGAAGTTCGGAGGGCAAGCGAAGCTTCAAAGACTTGCTGAAGAAGCTCGCGCTGCCGGC  
 TGTTGGTATGGGTGCATCGTATTTTGCCGCTGATAGACTTGTGCCGGAACATAACAGAGGAGC  
 AACAGAGAGGCGACGAACCCCTAACACCCGGCCAGAATGTGGGCACTGTGTTAGGCTTCGC  
 AGCGCTTGCTGCTGCCGCAGCGTTCCTTGGCATGGGTCTCACGAGGACGTACCGACATTTTT  
 CCCACGCAAAAACAGATCACGGCAGCCTGCACTCGAGCAAGAGGTGCCTGAATCAGGCCGA  
 AGATGGGGAGGATGCCCCGCCAGTAGGATATGGGGGCTAATAAAAAGTGAGTAGGAGCTCGAG  
GACAGTGT

Умножени регион код *T. gondii* типа II (ME49 сој):

>TGME49\_chrVIIa | | 2568660 to 2569097

TTCCGACGCTGAAGTGACTGACGACAACATCTACGAGGAGCACACTGATCGTAAAGTGGTTC  
 CGAGGAAGTTCGGAGGGCAAGCGAAGCTTCAAAGACTTGCTGAAGAAGCTCGCGCTGCCGGC  
 TGTTGGTATGGGTGCATCGTATTTTGCCGCTGATAGAATTCTGCCGGAACATAACAGAGCAGC  
 AACAGACAGGCGAAGAACCCCTAACACCCGGCCAGAATGTGAGCACTGTGTTAGGCTTCGC  
 AGCGCTTGCTGCTGCCGCAGCGTTCCTTGGCATGGGTCTCACGAGGACGTACCGACATTTTT  
 CCCACGCAAAAACAGATCACGGCAGCCTGCACTCGAGCAAGAGGTGCCTGAATCAGGCCAA  
 AGATGGGGAGGATGCCCCGCCAGTAGGATATGGGGGCTAATAAAAAGTGAGTAGGAGCTCGAG  
GACAGTGT

Умножени регион код *T. gondii* типа III (VEG сој):

>TGVEG\_chrVIIa | | 2589232 to 2589669

TTCCGACGCTGAAGTGACTGACGACCACATCTACGAGGAGAACACTGATCGTAAAGTGGTTC  
 CGAGGAAGTTCGGAGGGCAAGCGAAGCTTCAAAGACTTGCTGAAGAAGCTCGCGCTGCCGGC  
 TGTTGGTATGGGTGCATCGTATTTTGCCGCTGATAGAATTCTGCCGGAACATAACAGAGCAGC  
 AACAGACAGGCGACGAACCCCTATCCACCCGGCCAGAATGTGAGCACTGTGATAGGCTTCGC  
 AGCGCTTGCTGCTGCCGTAGCGTTCCTTGGCCTGGGTATCAAGAGGACGTACCGACATTTTT  
 CCCACGCAAAAACAGATCACGGCAGCCTGACCCGAGCACGAGGTGCCTGAATCAGGCCGA  
 AGATAGGGAGGATGCCCCGCCAGTAGGATATGGGGGCTAATAAAAAGTGAGTAGGAGCTCGAG  
GACAGTGT

Поравнање секвенци сва три клонска типа (разлике су означене црвено и без звездице):

```

GT1      TTCCGACGCTGAAGTGACTGACGACACACATCTACGAGGAGCACACTGATCGTAAAGGTGGT 60
ME49    TTCCGACGCTGAAGTGACTGACGACACACATCTACGAGGAGCACACTGATCGTAAAGTGGT 60
VEG     TTCCGACGCTGAAGTGACTGACGACACACATCTACGAGGAGAACACTGATCGTAAAGTGGT 60
*****

GT1      TCCGAGGAAGTCGGAGGGCAAGCGAAGCTTCAAAGACTTGCTGAAGAAGCTCGCGCTGCC 120
ME49    TCCGAGGAAGTCGGAGGGCAAGCGAAGCTTCAAAGACTTGCTGAAGAAGCTCGCGCTGCC 120
VEG     TCCGAGGAAGTCGGAGGGCAAGCGAAGCTTCAAAGACTTGCTGAAGAAGCTCGCGCTGCC 120
*****

GT1      GGCTGTTGGTATGGGTGCATCGTATTTTGCCGCTGATAGACTTGTGCCGGAACATAACAGA 180
ME49    GGCTGTTGGTATGGGTGCATCGTATTTTGCCGCTGATAGAAATTCTGCCGGAACATAACAGA 180
VEG     GGCTGTTGGTATGGGTGCATCGTATTTTGCCGCTGATAGAAATTCTGCCGGAACATAACAGA 180
*****

GT1      GGAGCAACAGAGAGGCGACGAACCCCTAACACCGCCAGAATGTGGGCACTGTGTTAGG 240
ME49    GCAGCAACAGACAGGCGACGAACCCCTAACACCGCCAGAATGTGAGCACTGTGTTAGG 240
VEG     GCAGCAACAGACAGGCGACGAACCCCTAACACCGCCAGAATGTGAGCACTGTGATAGG 240
* *****

GT1      CTTTCGACGCTTGCTGCTGCCGACAGCGTTCCTTGGCATGGGTCTCACGAGGACGTACCG 300
ME49    CTTTCGACGCTTGCTGCTGCCGACAGCGTTCCTTGGCATGGGTCTCACGAGGACGTACCG 300
VEG     CTTTCGACGCTTGCTGCTGCCGTAGCGTTCCTTGGCATGGGTATCAAGAGGACGTACCG 300
*****

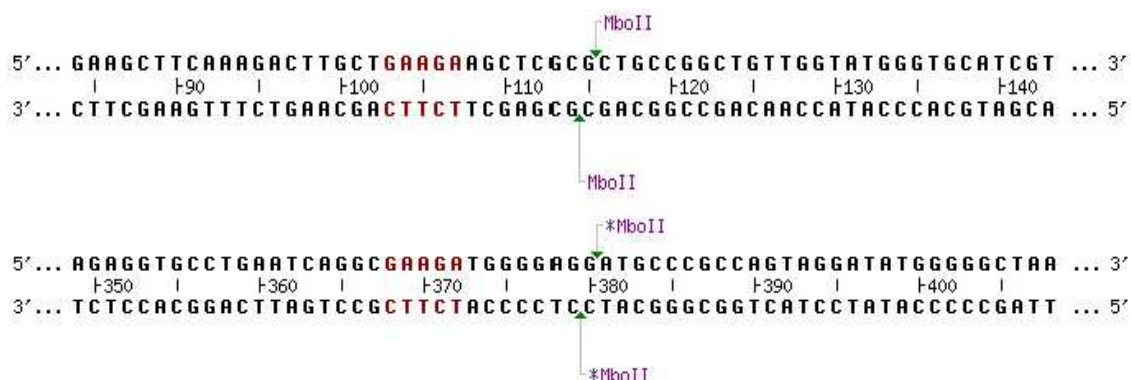
GT1      ACATTTTTCCCACGCAAAAACAGATCACGGCAGCCTGCACCTCGAGCAAGAGGTGCCTGA 360
ME49    ACATTTTTCCCACGCAAAAACAGATCACGGCAGCCTGCACCTCGAGCAAGAGGTGCCTGA 360
VEG     ACATTTTTCCCACGCAAAAACAGATCACGGCAGCCTGCACCCGAGCAAGAGGTGCCTGA 360
*****

GT1      ATCAGGCGAAGATGGGGAGGATGCCCGCCAGTAGGATATGGGGGCTAATAAAAAGTGAGTA 420
ME49    ATCAGGCAAGATGGGGAGGATGCCCGCCAGTAGGATATGGGGGCTAATAAAAAGTGAGTA 420
VEG     ATCAGGCGAAGATAGGGAGGATGCCCGCCAGTAGGATATGGGGGCTAATAAAAAGTGAGTA 420
*****

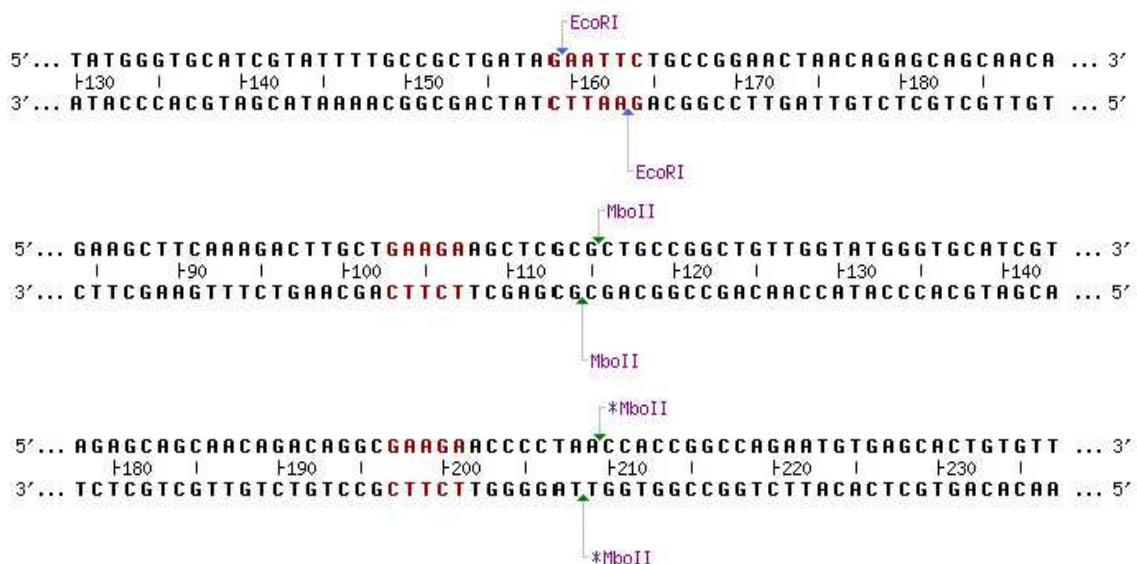
GT1      GGAGCTCGAGGACAGTGT 438
ME49    GGAGCTCGAGGACAGTGT 438
VEG     GGAGCTCGAGGACAGTGT 438
*****

```

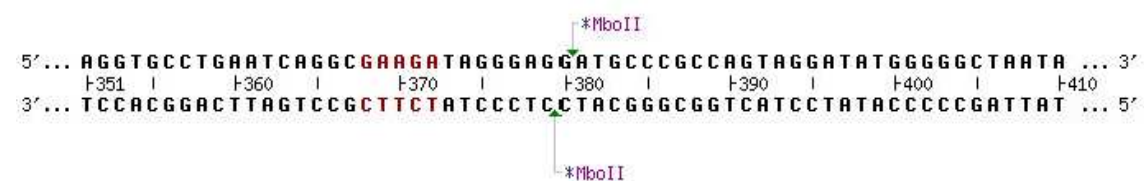
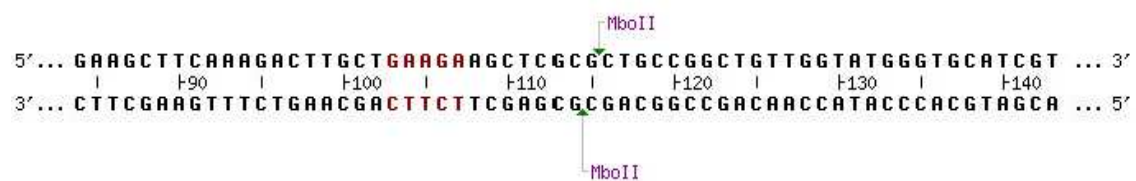
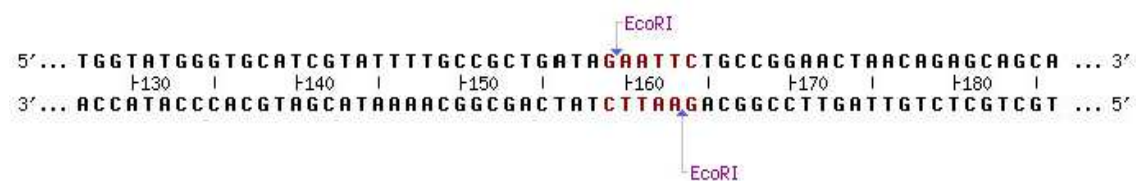
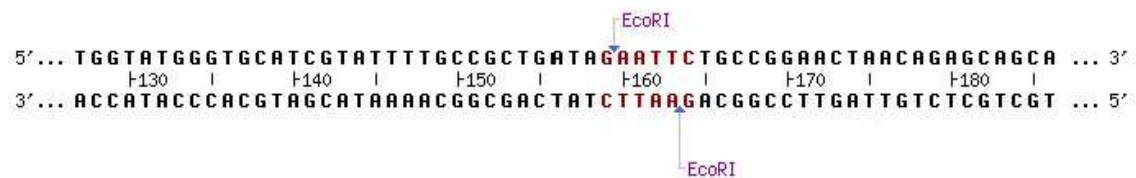
Деловање рестрикционог ензима на ДНК *T. gondii* соја GT1 који припада типу I:



Деловање рестрикционог ензима Eco RI и Mbo II на ДНК *T. gondii* соја Me49 који припада типу II:



Деловање рестрикционог ензима Eco RI на ДНК *T. gondii* соја VEG који припада типу III:





### GRA7 (прајмери GRA3 и GRA4)

Умножени региони код *T. gondii* типа I (GT1 сој):

>TGGT1\_chrVIIa | | 2584970 to 2585200

ACCCTATATTGGGGCTTGCTAACGTTTTGTATTAAAAGGGATTACTGCGGCGTCTCATTTC  
AAATGGCCCGACACGCAATTTTTTCGCGCTTTGTGTTTTAGGCCTGGTGGCGGCGGCTTTGC  
CCCAGTTCGCTACCGCGGCCACCGCGTCAGATGACGAACTGATGAGTCGAATCCGAAATTCT  
GACTTTTTCGATGGTCAAGCACCCGTTGACAGTCTCAGACCGA

Умножени регион код *T. gondii* типа II (ME49 сој):

>TGME49\_chrVIIa | | 2568278 to 2568508

ACCCTGTATTGGGGCTTGCTAACGTTTTGTATTAAAAGGGTTTACTGCGGCGTCTCATTTC  
AAATGGCCCGACACGCAATTTTTTCGCGCTTTGTGTTTTAGGCCTGGTGGCGGCGGCTTTGC  
CCCAGTTCGCTACCGCGGCCACCGCGTCAGATGACGAACTGATGAGTCGAATCCGAAATTCT  
GACTTTTTCGATGGTCAAGCACCCGTTGACAGTCTCAGACCGA

Умножени регион код *T. gondii* типа III (VEG сој):

>TGVEG\_chrVIIa | | 2588850 to 2589080

ACCCTATATTGGGGCTTGCTAACGTTTTGTATTAAAAGGGTTTACTGCGGCGTCTCATTTC  
AAATGGCCCGACACGCAATTTTTTCGCGCTTTGTGTTTTAGGCCTGGTGGCGGCGGCTTTGC  
CCCAGTTCGCTACCGCGGCCACCGCGTCGGATGACGAACTGATGAGTCGAATCCGAAATTCT  
GACTTTTTCGATGGTCAAGCACCCGTTGACAGTCTCAGACCGA

Поравнање секвенци сва три клонска типа (разлике су означене црвено и без звездице):

Me49	ACCCTG <b>T</b> ATATTGGGGCTTGCTAACGTTTTGTATTAAAAGGG <b>T</b> TACTGCGGCGTCTCATTT	60
VEG	ACCCT <b>A</b> TATTGGGGCTTGCTAACGTTTTGTATTAAAAGGG <b>T</b> TACTGCGGCGTCTCATTT	60
GT1	ACCCT <b>A</b> TATTGGGGCTTGCTAACGTTTTGTATTAAAAGGG <b>A</b> TACTGCGGCGTCTCATTT	60
	*****	
Me49	ССААААТGGCCCGACACGCAATTTTT <b>T</b> CGCGCTTTGTGTTTTAGGCCTGGTGGCGGCGG	120
VEG	ССААААТGGCCCGACACGCAATTTTT <b>T</b> CGCGCTTTGTGTTTTAGGCCTGGTGGCGGCGG	120
GT1	ССААААТGGCCCGACACGCAATTTTT <b>C</b> CGCGCTTTGTGTTTTAGGCCTGGTGGCGGCGG	120
	*****	
Me49	СТТТGCCCCAGTTCGCTACCGCGGCCACCGCGT <b>C</b> AGATGACGAACTGATGAGTCGAATCC	180
VEG	СТТТGCCCCAGTTCGCTACCGCGGCCACCGCGT <b>C</b> AGATGACGAACTGATGAGTCGAATCC	180
GT1	СТТТGCCCCAGTTCGCTACCGCGGCCACCGCGT <b>C</b> AGATGACGAACTGATGAGTCGAATCC	180
	*****	
Me49	GAAATTCTGACTTTTTTCGATGGTCAAGCACCCGTTGACAGTCTCAGACCGA	231
VEG	GAAATTCTGACTTTTTTCGATGGTCAAGCACCCGTTGACAGTCTCAGACCGA	231
GT1	GAAATTCTGACTTTTTTCGATGGTCAAGCACCCGTTGACAGTCTCAGACCGA	231
	*****	



**Прилог 6****Припрема BABS пуфера за HSDA тест:**

NaCl 7,012g

NaN<sub>3</sub> 1gH<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 3.092g

BSA 4g

Дестилована вода 1L

Концентровани NaOH за дотеривање рН вредности до 8,95

**Припрема PBS пуфера за HSDA тест:****10X концентровани**

NaCl 80g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2gNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11,5g

KCl 2g

Дестилована вода 1L

## Прилог 7

### Лабораторијска опрема

Mastercycler ep realplex S i PC са софтвером за *real-time* PCR (Eppendorf)  
Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)  
Опрема за електорфорезу (BioRad)  
Herasafe асептична комора са ламинарним протоком (Thermo Fisher Scientific)  
Мини асептичне коморе са ламинарним протоком (Ehret)  
Мешалица са термоблоком (Eppendorf)  
Лабораторијски замрзивач до -80°C са металним полицама и кутијама (Thermo Fisher Scientific)  
Лабораторијски замрзивач до -30°C са температурним писачем (Revco)  
Фрижидер (Liebherr)  
Гел документациони систем са софтвером за анализу и филтерима за SYBR Green и етидијум бромид (Biometra)  
Центрифуга са *swing-out* ротором и адаптерима (Hettich)  
Ултразвучни процесор (Hielscher Ultrasound Technology)  
Вортекс (BioRad)  
Миницентрифуга (BioRad)  
Центрифуга са ротором за микроплоче (Eppendorf)  
Центрифуга са хлађењем и ротором и адаптерима за микротубе (Eppendorf)  
Центрифуга са фиксним угаоним ротором (Hettich)  
Мини инкубатор (BioRad)  
Мини инкубатор (Heraeus)  
20 поликарбонатних кавеза са додатном опремом за држање експерименталних животиња - мишева (Tecniplast)  
Mini Vidas Blue (Bio-Mérieux)  
Истраживачки оптички контрафазни микроскоп са дигиталном камером и додатком за флуоресценцију (Carl Zeiss)  
Оптички микроскоп (Carl Zeiss)

Влажни стерилизатор (Kruuse)

Комплет хируршких инструмената

Спектрофотометар - Ultrospec 3300pro (Amersham Pharmacia Biotech, Велика Британија/Шведска)

## **БИОГРАФИЈА**

Марија Вујанић је рођена 03. децембра 1980. године у Београду, где је завршила основну школу и Земунску гимназију. Дипломирала је 31. јануара 2006. године на Биолошком факултету Универзитета у Београду са средњом оценом 9,47. Исте године уписала је и докторске студије на Биолошком факултету, студијски програм: Молекуларна биологија. Положила је све програмом предвиђене испите са средњом оценом 9,89. Од 01. марта 2006. године запослена је као истраживач приправник на Институту за медицинска истраживања у Београду, у Групи за паразитологију, а 12. децембра 2008. је изабрана у звање истраживач сарадник.

Од почетка свог рада у Институту активно учествује у биомедицинским истраживањима и то на више пројеката које је финансирало Министарство надлежно за науку, једном посебном пројекту Републичког Министарства пољопривреде (Управе за ветерину), на једном међународном FP6 програму за истраживања и технолошки развој Европске Уније SERBPARTOON (FP6-2005-INCO-CT/043702) и 3 билатерална пројекта (по 1 са Хрватском, Мађарском и Француском). Тренутно је са пуним радном временом ангажована на пројекту “Контрола инфекција апикомплексним патогенима: од нових места деловања лека до предикције” МПН 2011-2014. којим руководи Др Олгица Ђурковић-Ђаковић.

До сада је у сарадњи са другим ауторима објавила 42 библиографске јединице од којих је 11 објављено *in extenso*. Од радова објављених *in extenso* 3 су објављена у водећим часописима међународног значаја, 3 у истакнутим часописима међународног значаја, 4 у часописима међународног значаја и 1 у водећем часопису националног значаја. Први је аутор једног рада објављеног у водећем међународном часопису. Од радова објављених у изводу 30 су саопштења на међународним научним скуповима, а 1 рад је саопштење са научног скупа националног значаја.

Добитник је три награде за научни рад, и то две групне награде за најбољи рад Института за медицинска истраживања у 2010. и 2011., и једне појединачне награде за најбољи рад младог истраживача Института за медицинска истраживања у 2011. години.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Марија Вујанић

број индекса НО 060165

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Молекуларна детекција и генотипизација сојева паразита *Toxoplasma gondii*  
изолованих у Србији

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и . . .
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанта

У Београду, 23.05.2012.

Марија Вујанић

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Марија Вујанић

Број индекса НО 060165

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Молекуларна детекција и генотипизација сојева паразита  
*Toxoplasma gondii* изолованих у Србији

Ментор Др Владимир Ивовић

Потписани/а Марија Вујанић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанта

У Београду, 23.05.2012.

Марија Вујанић



Прилог 3.

### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Молекуларна детекција и генотипизација сојева паразита *Toxoplasma gondii*  
изолованих у Србији

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанта

У Београду, 23.05.2012.

Марија Вујановић