

# МОЛЕКУЛАРНА ДЕТЕКЦИЈА И ГЕНОТИПИЗАЦИЈА СОЈЕВА ПАРАЗИТА *Toxoplasma gondii* ИЗОЛОВАНИХ ИЗ ЉУДИ И ЖИВОТИЊА У СРБИЈИ

**Др Марија Марковић**

Национална референтна лабораторија за  
токсоплазмозу

Институт за медицинска истраживања  
Универзитет у Београду



# *Toxoplasma gondii*



- Изолован 1908. године (Nicolle и Manceaux, 1908) из слезине, јетре и крви северноафричког глодара *Stenodactylus gundi*
- Истовремено изолован из лабораторијског кунића (Splendore, 1908)
- Облигатно интрацелуларни паразит који припада разделу Apicomplexa

Раздео: Apicomplexa, Levine, 1970

Класа: Sporozoasida, Leukart, 1879

Подкласа: Coccidiasina, Leukart, 1879

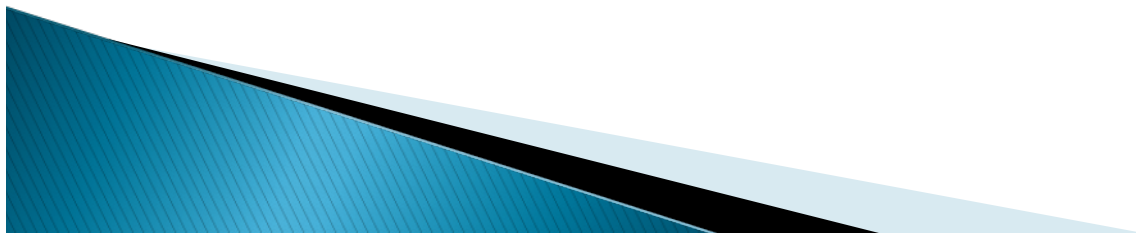
Ред: Eimeriorina, Leger, 1911

Фамилија: Toxoplasmatidae, Biocca, 1956

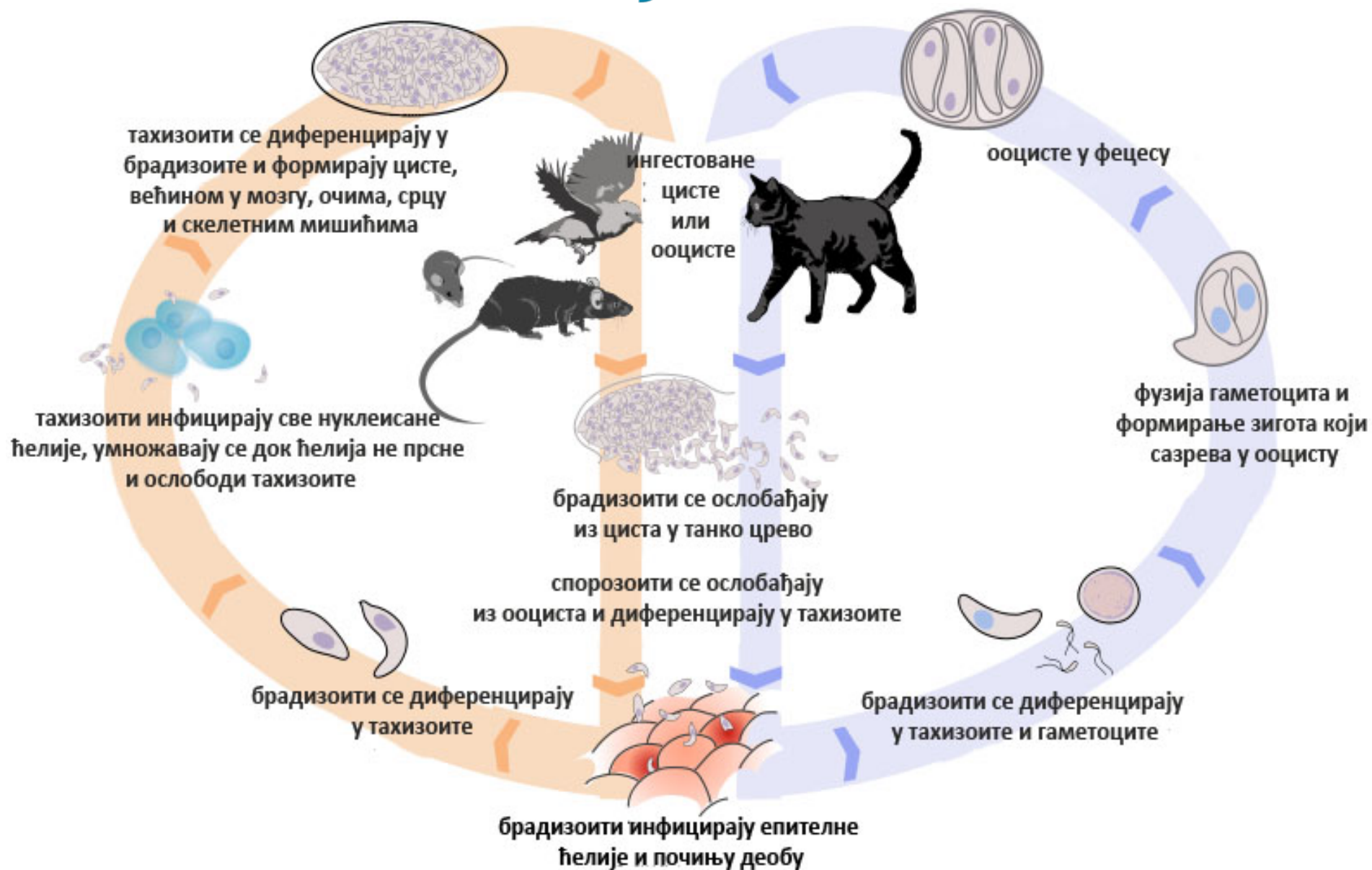
Род: Toxoplasma, Nicolle and Manceaux, 1909

# *Toxoplasma gondii*

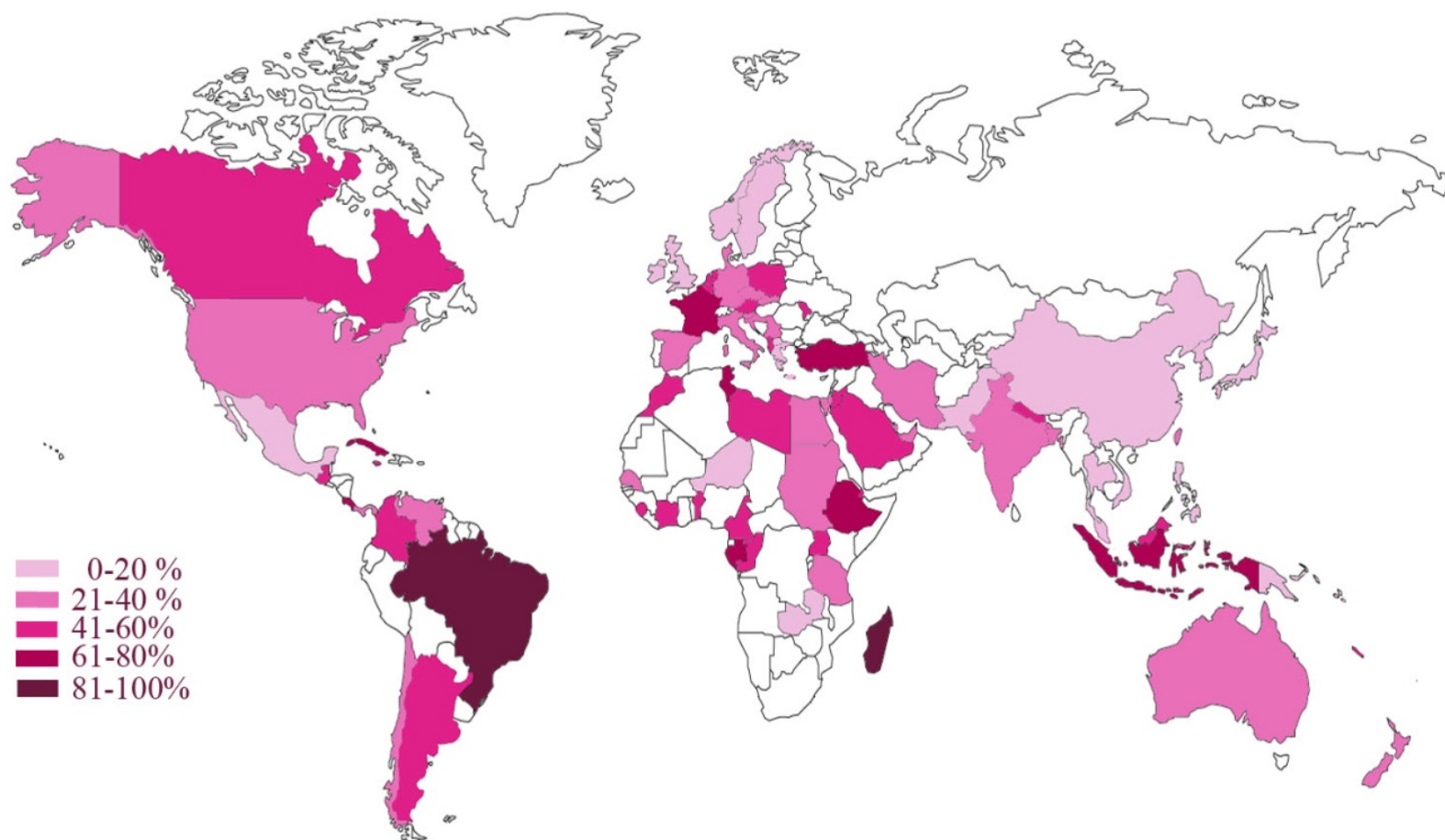
- ▶ Космополитско распрострањење и вероватно најшири опсег домаћина од свих паразита
- ▶ Старост рода се процењује на око 12 милиона година (Su и сар., 2003)
- ▶ Једна врста у оквиру рода
- ▶ Клонска популациона структура (типови I, II, III) – Европа и Северна Америка
- ▶ Атипични и рекомбинантни сојеви – Јужна Америка и Африка



# Животни циклус



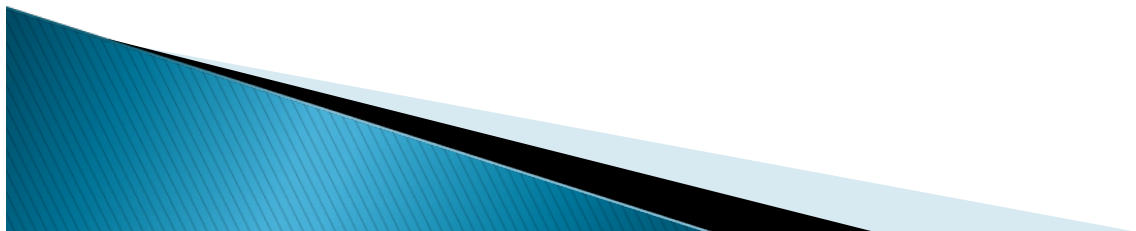
# Токсоплазмоза код људи



Серопревалнца *T. gondii* инфекције код људи, по Dubey, 2010 и Бобић и сар., 2011

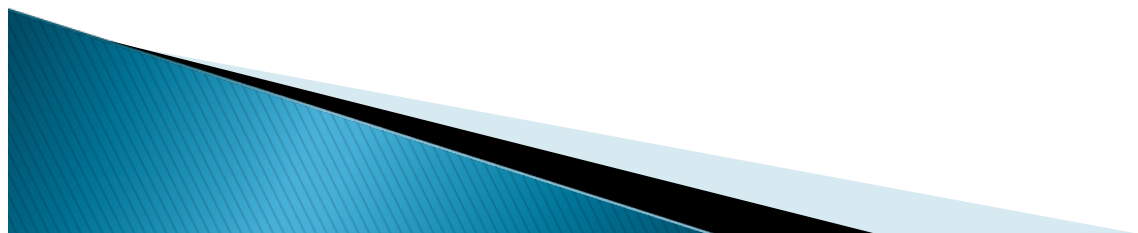
# Клинички значај инфекције *T. gondii*

- **Стечена токсоплазмоза**
  - инфекција у току живота
  - благо обољење, најчешће асимптоматско
  - код имуносупримираних може да угрози живот (опортунистичка инфекција)
- **Конгенитална токсоплазмоза**
  - инфекција мајке у трудноћи и транспланцентни прелазак паразита на плод
  - последице зависе највише од гестацијске зрелости плода
  - спонтани побачај, мртворођеност, или рођење живог новорођенчета које може бити оштећено или наизглед здраво



# Токсоплазмоза код животиња

- широко распрострањена код свих топлокрвних животиња
- доказана код практично свих домаћих животиња где представља озбиљан проблем
  - економски губици
  - најзначајнији фактор ризика за инфекцију људи
- инфицирани глодари могу бити резервоар и извор циста за карниворне домаћине (свиње, пси, мачке)



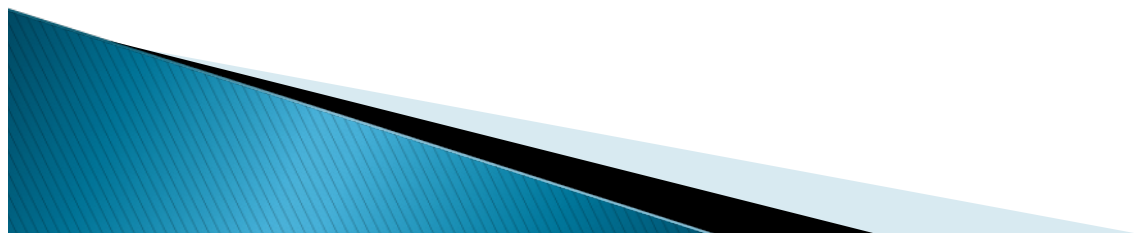
# Дијагностика токоплазмозе

## ▶ Директне методе

- налаз паразита у размазима телесних течности и ткива добијених *in vivo* или *post mortem*
- налаз паразита у препаратима добијеним вештачком дигестијом
- изолација паразита путем биолошког огледа на мишевима или мачкама
- изолација паразита у култури ћелија или ткива
- доказивање антигена у циркулацији, телесним течностима и ткивима
- молекуларне методе

## ▶ Индиректне методе

- серолошки тестови





# Молекуларне методе

## Маркери за PCR

Маркер	Бр.
B1	≈ 35
529 bp	200-300
ITS-1 или 18S	≈110
P30	1

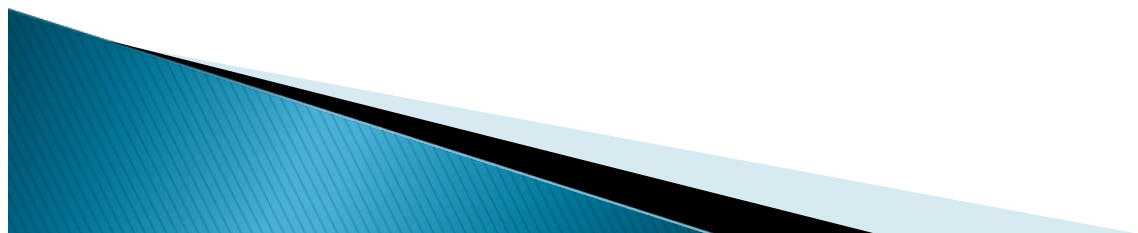
- конвенционални PCR
- *nested* PCR
- PCR у реалном времену (**Real-Time PCR**)
  
- анализа полиморфизма дужина рестрикционих фрагмената заснована на PCR-у (**PCR-RFLP**)
- анализа микросателита
- мултилокусно типизирање секвенце једне копије ДНК *T. gondii*

## Маркери за PCR-RFLP

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

# Циљеви и задаци рада

- ▶ Увођење молекуларних метода у дијагностику токсоплазмозе у Србији и оптимизација дијагностичких протокола
  - Избор и увођење основних молекуларних метода 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 Real-Time PCR-а у материјалу хуманог и животињског порекла
- ▶ Генотипизација изолованих сојева којом ће се добити први подаци о популационој структури *T. gondii* на нашем простору
  - Генотипизација изолованих сојева *T. gondii* помоћу PCR-RFLP методе



# Материјал и методе

## ▶ МАТЕРИЈАЛ ХУМАНОГ ПОРЕКЛА

Тип узорка	n
Крв	103
Фетална крв	9
БАЛ	1
Плодова вода	30
Очна водица	10
Ликвор	7
$\Sigma$	160

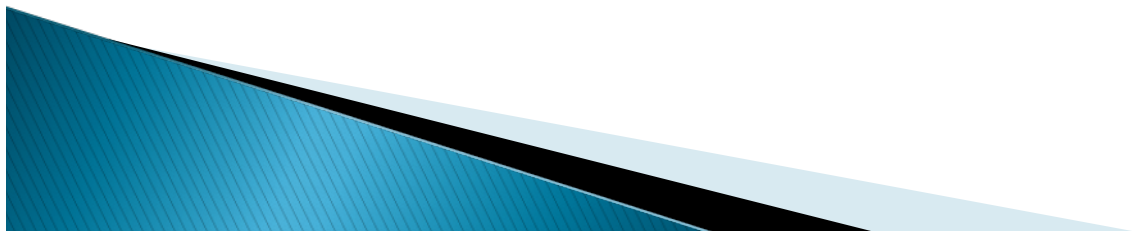
### 127 пацијената суспектних на токсоплазмозу

- одрасли суспектни на акутну инфекцију
- жене инфициране у трудноћи
- неонатуси са суспектном конгениталном токсоплазмозом
- пацијенти са очном и церебралном токсоплазмозом
- пацијент код кога је извршена трансплантација костне сржи

# Материјал и методе

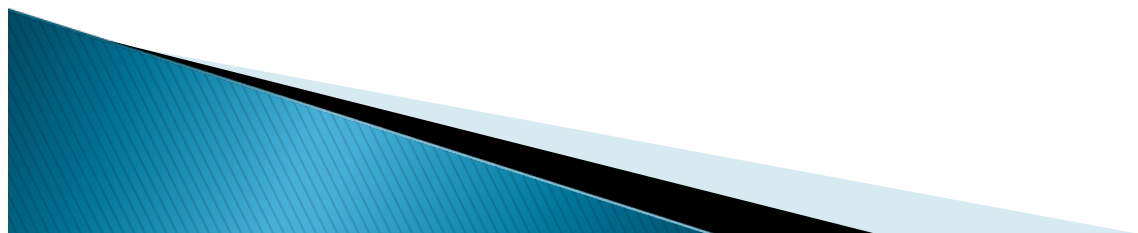
## ▶ МАТЕРИЈАЛ ЖИВОТИЊСКОГ ПОРЕКЛА

глодари	n	серум	мозак
Пацови	144	80	144
Мишеви	12		12

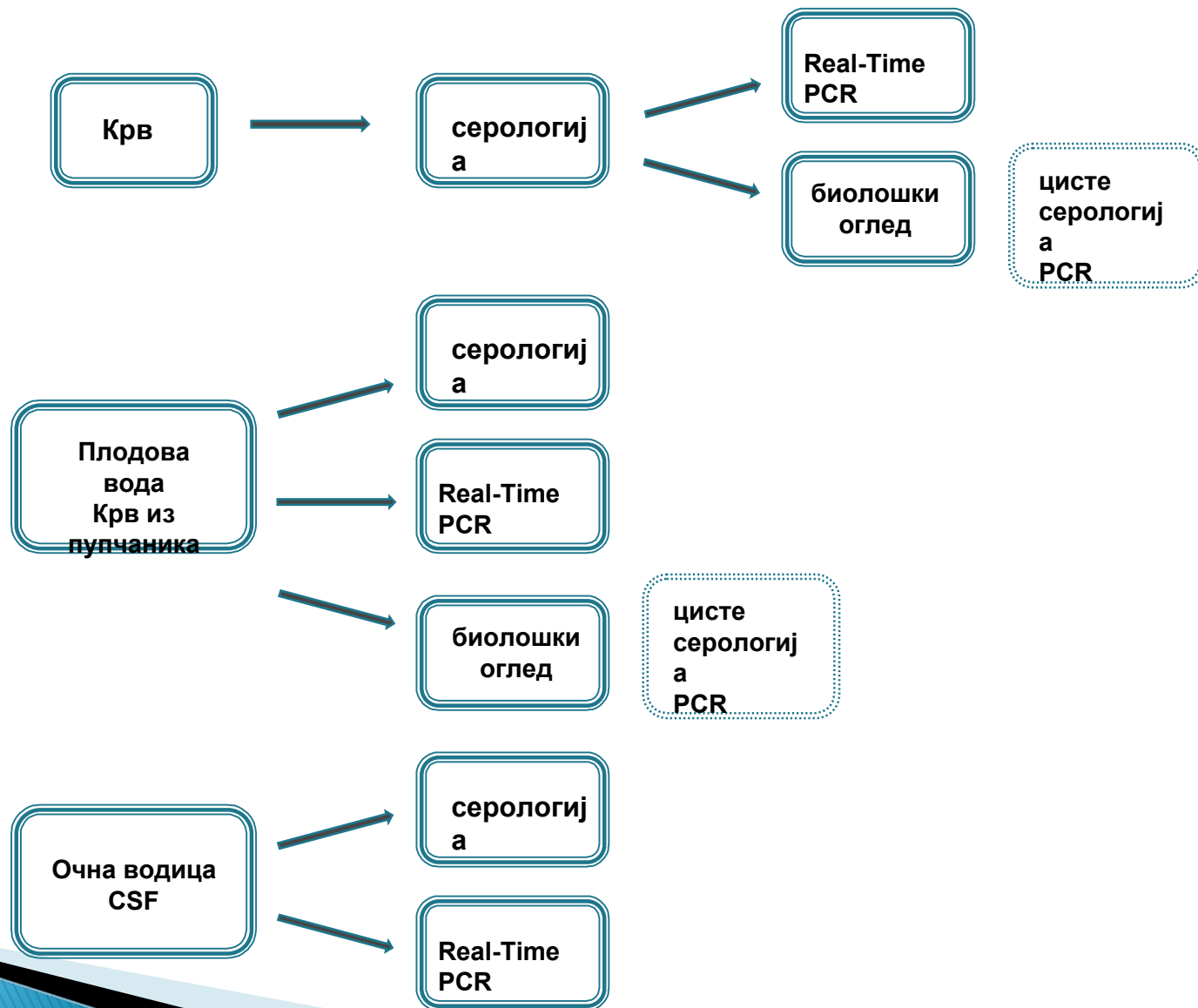


# Материјал и методе

- Серолошка испитивања
  - Комерцијални тестови (спец. IgM, IgG, авидитет IgG антитела)
  - Тест модификоване директне аглутинације (IgG антитела)
  - Имуносорбентни аглутинациони тест (IgM антитела)
- Биолошки оглед
- Молекуларне методе

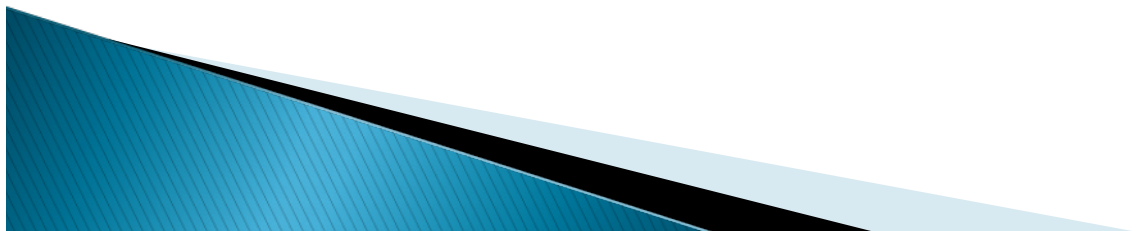


# Протокол за хумани материјал



# Молекуларне методе

- Екстракција ДНК
- Real-Time PCR – 529 бп репетитивни елемент  
(*GenBank accession number AF146527*)



# Молекуларне методе

## Молекуларна детекција

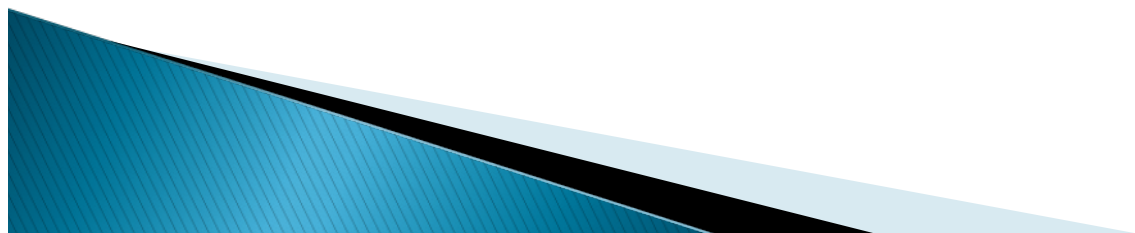
- Real-Time PCR

	Основни микс	Волумен у $\mu\text{L}$	Фин. конц.	
	<i>TaqMan</i> мастер микс	10		
Пра	проба НОFT (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0,3	150nM	Г СТ
П	прајмер НО1 (25 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0,3	375nM	GCG-
Rea	прајмер НО2 (25 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0,3	375nM	
PCR	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1	2.5mM	
	Вода	5,1		
	Укупна запремина	17		



# Резултати

Тип узорка	Серологија + rtPCR + Б.	Серологија + rtPCR	Серологија + Б. О.	$\Sigma$
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
$\Sigma$	114	32	14	<b>160</b>

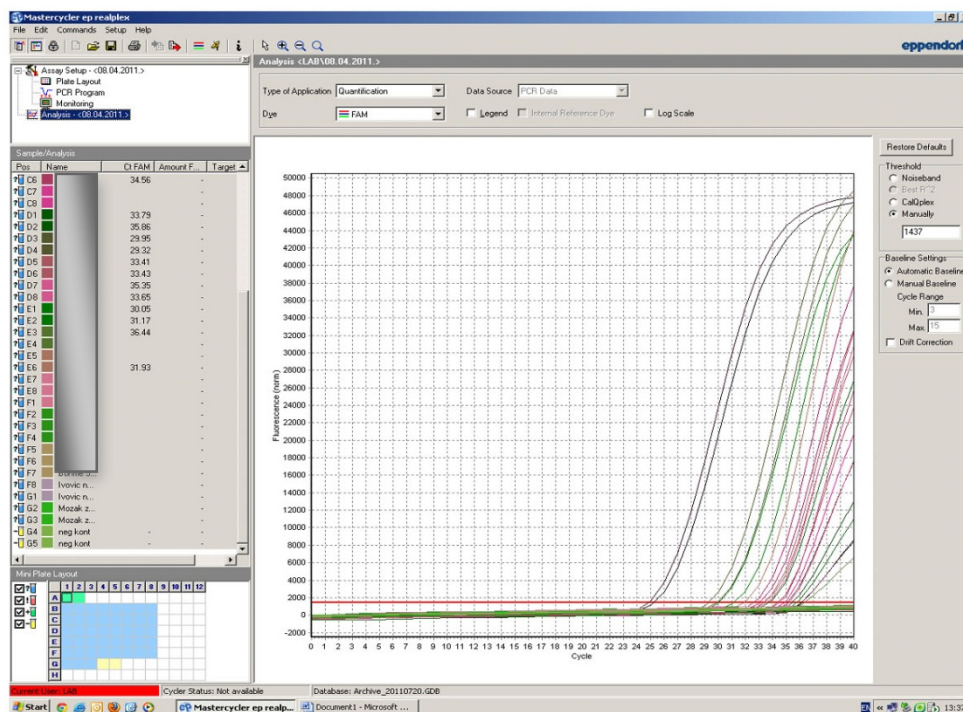


# Резултати

Тип узорка	Real-Time PCR 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)

*\*Ivović et al., 2012*

# Резултати



Real-Time PCR софтверска  
анализа резултата

PCR продукти на 3% агарозном ге.  
1,2 позитивне контроле - *T. gondii* |  
3-14 хумани узорци  
15- нег. контрола  
L- маркер

# Резултати Real-Time PCR-а у узорцима крви у односу на серолошке налазе

специфична IgG антитела ниског  
авидитета

IgM	Real-Time PCR позитиван	
	n	Бр. (%)
позитиван	54	16 (29,6)
граничан	1	0
негативан	3	0
Σ	58	16 (27,6)

специфична IgG антитела граничног  
авидитета

IgM	Real-Time PCR позитиван	
	n	Бр. (%)
позитиван	3	2 (66,7)
негативан	1	0
Σ	4	2(50)

специфична IgG антитела високог  
авидитета

IgM	Real-Time PCR позитиван	
	n	Бр. (%)
позитиван	7	3 (42,9)
негативан	2	1 (50)
Σ	9	4 (44,4)

није рађен авидитет спец. IgG антитела

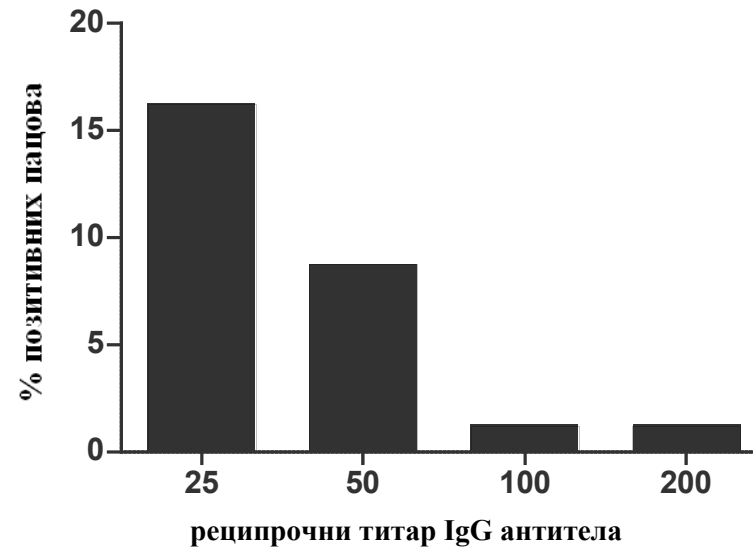
IgM	Real-Time PCR позитиван	
	n	Бр. (%)
позитиван	5	4 (80)
негативан	15	2 (13.3)
Σ	20	6 (30)

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

Тип узорка	n	Real-Time PCR позитиван	Б. О. позитиван		
			Цисте	Серологиј	$\Sigma$
		Бр. (%)	Бр. (%)	Бр. (%)	Бр. (%)
Крв	76	27 (35,5)	11 (14,5)	9 (11,8)	18 (23,7)
Фетална крв	9	3 (33,3)	3 (33,3)	2 (22,2)	5 (55,5)
БАЛ	1	1 (100)	0	0	0
Плодова вода	28	10 (35,7)	5 (17,9)	4 (14,3)	7 (25)
$\Sigma$	114	41 (36)	19 (16,7)	15 (13,2)	30 (26,3)

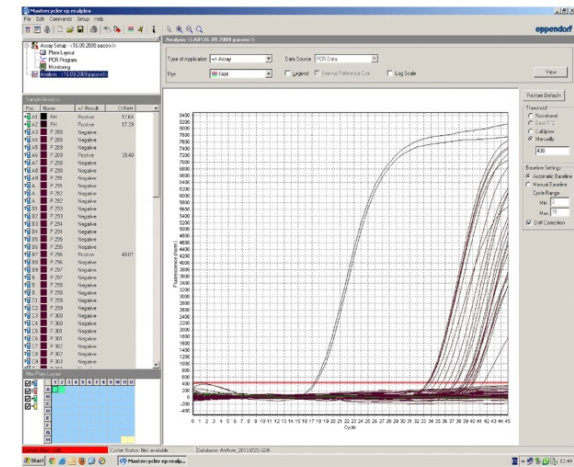
# Материјал животињског порекла

Врста	Бр. (%) животиња позитивних на <i>T. gondii</i>
	HSDA
Пацови (n=80)	22 (27.5%)

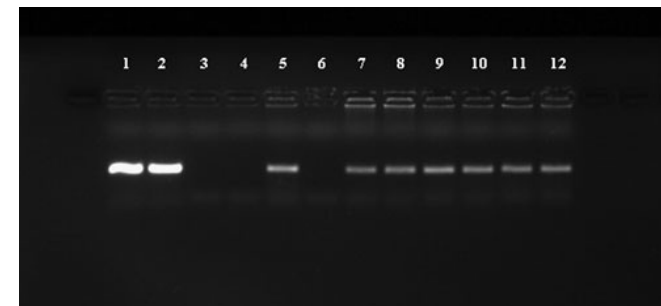
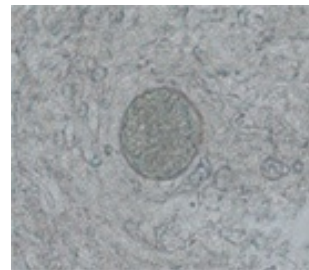


# Материјал животињског порекла

узорак	Бр. (%) животиња позитивних на <i>T. gondii</i>		
	ДНК	Цисте	Цисте+ДНК
Пацови (n=144)	15 (10,4%)	11 (7,6%)	5 (3,5%)
Мишеви (n=12)	10 (83,3%)	3 (25%)	3 (25%)



Real-Time PCR софтверска анализа резултата



1, 2-позитивна контрола (RH сој),  
3, 4-негативна контрола,  
5-12-узорци можданог ткива

# Закључак I

- ▶ ДНК *T. gondii* је доказана директно из узорака крви пацијената суспектних на акутну токсоплазмозу вишеструко чешће него биолошким огледом
  - знатно виша осетљивост Real-Time PCR у односу на конвенционални биолошки оглед
  - у клиничкој дијагностици се не може сматрати директним дијагностичким параметром јер се не може искључити могућност да је Real-Time PCR-ом детектована ДНК невијабилних паразита
- ▶ Виша стопа детекције ДНК *T. gondii* од изолације паразита биолошким огледом из материјала који је потицао од фетуса и новорођенчади суспектних на конгениталну токсоплазмозу
  - код фетуса и новорођенчади Real-Time PCR налаз је **директно дијагностички** јер не постоји могућност постојања ДНК фрагмената заосталих од раније инфекције, те је **молекуларна детекција и метода избора за дијагнозу конгениталне токсоплазмозе**



# Закључак I

- ▶ Успешност доказивања ДНК *T. gondii* у материјалу хуманог порекла зависила је од типа материјала
  - мањи волумен материјала од кога се узима узорак = успешност Real-Time PCR-а већа (60% у очној водици, 57,1% у ликвору а 35,7% у плодовој води)

Оправдано увођење метода заснованих на детекцији *T. gondii* на молекуларном нивоу - повећање стопе постављених дијагноза комбиновањем конвенционалних паразитолошких са Real-Time PCR-ом

**Најбољи дијагностички приступ комбинација  
конвенционалне и молекуларне методологије**

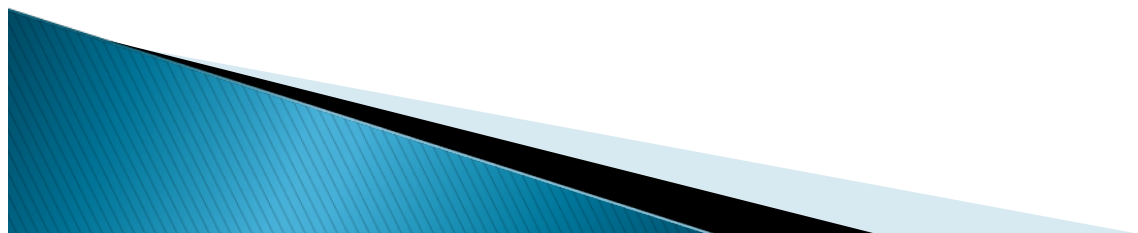


# Закључак I

- Real-Time PCR је успешно оптимизован 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

Показан је потенцијал Real-Time PCR-а за детекцију *T. gondii* из ткива животиња, на примеру синантропних глодара

Стопа детекције ДНК *T. gondii* код пацова и мишева сакупљених у Београду потврђује да су ове животиње резервоар инфекције и представљају извор контаминираниости наше средине



# Генотипизација

## PCR-RFLP

генски маркер	SAG 1	SAG 2		GRA 6	GRA 7		
ензим	<i>Dde I</i>	<i>Mbo I</i>	<i>Hha I</i>	<i>Tru1 I</i>	<i>Eco R I</i>	<i>Mbo II</i> 5'..GAAGA(N) <sub>8</sub> ↑..	<i>Bse G I</i> 5'..GGATGNN↑..
место исечања	5'..C↓TNAG..3'	5'..↓GATC..3'	5'..GCG↑C..3'	5'..T↓TAA..3'	5'..G↑AATTC..3'	3' 3'..CTTCT(N) <sub>7</sub> ↑..	3' 3'..CCTAC↑NN..5
PCR програм	SAG 2	A1	GAAATGTTTCAGGTTGCTGC	ФНРЛТ	5'	мин 95°C	20 сек 94°C
		A2	5'-				
ензим	SAG 2	B1	AACGTTTCACGAAGGCACAC	Su и cap., 2006.	3'	20 сек 60°C	30 сек 72°C
		B2	5'-TTTCCGAGCAGGTGACCT				
ензим	GRA 6	GRA6(f)	5'-TTTCCGAGCAGGTGACCT	Su и cap., 2006.	5'	мин 72°C	
		GRA6(r)	5'-TCCCGCAACACTTCACATAC				
ензим	GRA 7	GRA7	TTCCGACGCTGAAGTGACTG	ФНРЛТ	5'		<i>Bse G I</i>
		GRA2B	5'-				
дигестија	GRA 7	GRA3	ACCCTATATTGGGGCTTGCT	ФНРЛТ	5'		
		GRA4	5'-				
зауостављање е дигестије	4 сата 37°C	4 сата 37°C	4 сата 37°C	0,1M EDTA	4 сата 37°C	4 сата 55°C	10 мин 65°C
зауостављање е дигестије	10 мин 65°C	10 мин 65°C	10 мин 65°C	0,1M EDTA	10 мин 65°C	20 мин 80°C	

# SAG1

```

Me49      TCCTGTCAAGTTGTCTGCGGAAGGACCCACTACAATGACCCTCGTGTGCGGGAAAGATGG 60
VEG       TCCTGTCAAGTTGTCTGCGGAAGGACCCACTACAATGACCCTCGTGTGCGGGAAAGATGG 60
GT1       TCCTGTCAAGTTGTCTGCGGAAGGACCCACTACAATGACCCTCGTGTGCGGGAAAGATGG 60
*****

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

Me49      CGAGAAATCGTTCAAAGATATTTTGCCAAAATTAAGTGAGAACCCGTGGCAGGGTAAACGC 180
VEG       CGAGAAATCGTTCAAAGATATTTTGCCAAAATTAAGTGAGAACCCGTGGCAGGGTAAACGC 180
GT1       CGAGAAATCGTTCAAAGATATTTTGCCAAAATTAAGTGAGAACCCGTGGCAGGGTAAACGC 180
*****

Me49      TTCGAGTGATAAAGGTGCCACGCTAACGATCAACAAGGAAGCATTTCAGCCGAGTCAAA 240
VEG       TTCGAGTGATAAAGGTGCCACGCTAACGATCAACAAGGAAGCATTTCAGCCGAGTCAAA 240
GT1       TTCGAGTGATAAGGTGCCACGCTAACGATCAAGAAGGAAGCATTTCAGCCGAGTCAAA 240
*****

Me49      AAGCGTCATTATTGGATGCACAGGGGGAT 269
VEG       AAGCGTCATTATTGGATGCACAGGGGGAT 269
GT1       AAGCGTCATTATTGGATGCACAGGGGGAT 269
*****

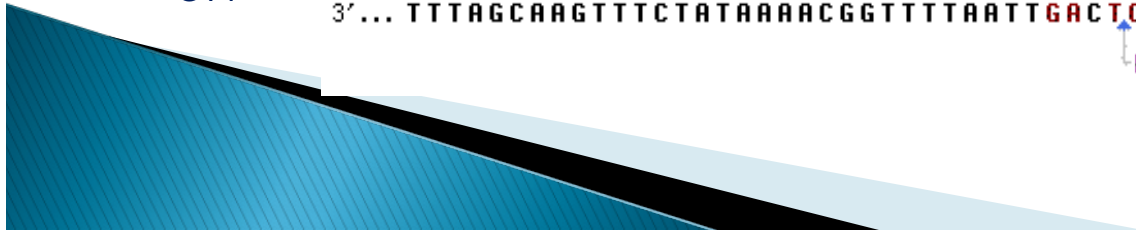
```

GT1

```

                    DdeI
                    |
5'... AAATCGTTCAAAGATATTTTGCCAAAATTAAGCTGAGAACCCGTGGCAGGGTAAACGCTTCG ... 3'
      |      |      |      |      |      |      |      |      |
      F130  |      F140  |      F150  |      F160  |      F170  |      F180
3'... TTAGCAAGTTTCTATAAAACGGTTTTAATTGACTCTTGGGCACCGTCCCATTGCGAAGC ... 5'
                    |
                    DdeI

```



# Материјал

## Хумани материјал

Тип узорка	n
Крв	103
Фетална крв	9
БАЛ	1
Плодова вода	30
Очна водица	10
Ликвор	7
$\Sigma$	160

## Животињски материјал

врста	n	крв	срце	мозак
пацови	144	80	-	144
голубови	72	72	72	-
овце	15	15	15	-

# Протокол за животињски материјал



Пацови

микроскопски  
преглед

Real-Time  
PCR

биолошки  
оглед



Голубови

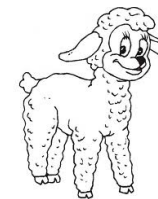
серологија

дигестија  
трипсином

Real-Time  
PCR

биолошки  
оглед

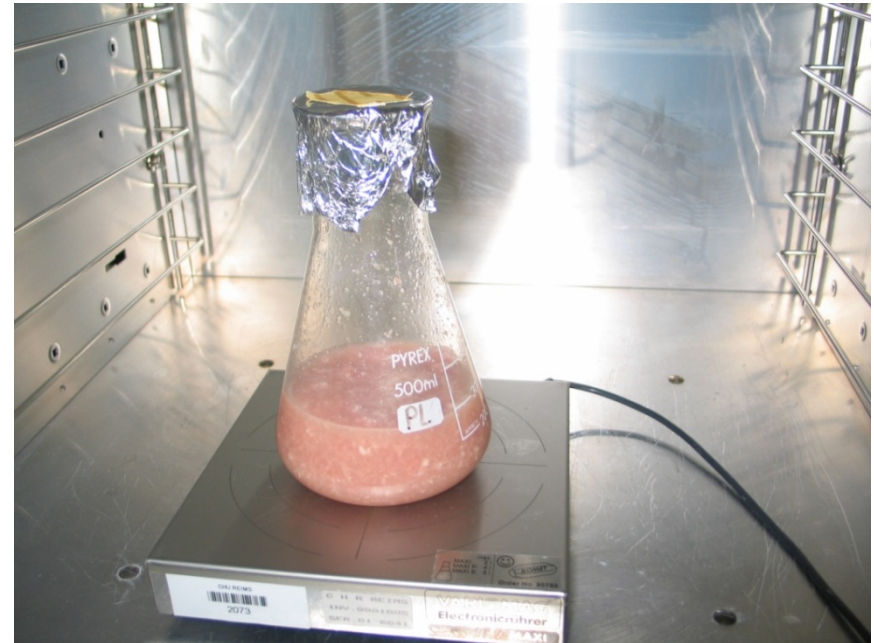
Овце



# Дигестија трипсином



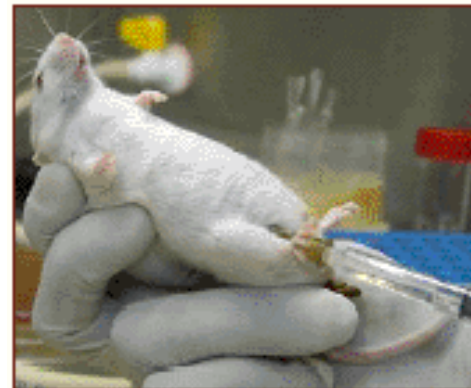
1h na 37C







**Позитиван  
Real-Time  
PCR**



# Резултати

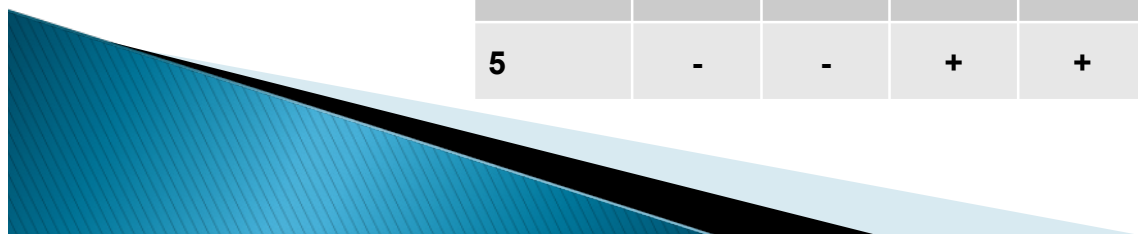
## хумани материјал

број узорка	тип материјала	клинички ентитет	генотип
1	периферна крв	токсоплазмоза у трудноћи	II
2	плодова вода	конгенитална токсоплазмоза	II
3	периферна крв	конгенитална токсоплазмоза	I
4	периферна крв	трансплантација костне сржи	II
5	bronхоалвеоларн и лават	трансплантација костне сржи	II

*\*Ivović et al., 2012*

# Генотипизација

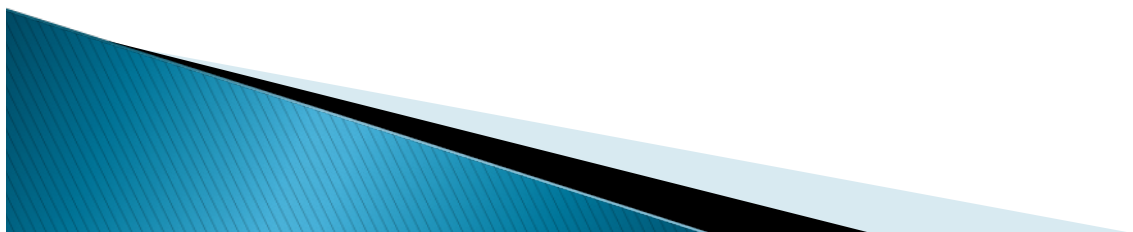
маркер	SAG 1	SAG 2 A	SAG 2 B	GRA 6	GRA 7 7/2B	GRA 7 3/4	SAG 1	
ензим	<i>Dde I</i>	<i>Mbo I</i>	<i>Hha I</i>	<i>Tru1 I</i>	<i>Mbo II</i>	<i>Eco RI</i>	<i>Bse GI</i>	
узорак	маркер							генотип
	SAG 1	SAG 2 A	SAG 2 B	GRA 6	GRA 7 7/2B	GRA 7 3/4		
1	II или III	I или II	II	II	II	II или III	I или II	II
2	II или III	I или II	II	II	II	II или III	I или II	II
3	-	-	-	I	-	-	-	I
4	II или III	I или II	II	II	I или III	II или III	I или II	II
5	II или III	I или II	II	II	I или III	II или III	I или II	II
4	-	-	+	+	+	+	-	
5	-	-	+	+	+	+	-	



# Пацови



	Бр. (%) животиња позитивних на <i>T. gondii</i>		
	ДНК	цисте	цисте+ ДНК
n=144	15 (10.4%)	11 (7.6%)	5 (3.5%)



# Голубови



бр. узорка	тип материјала	порекло	ГЕНОТИП
1	срце	голуб	II
2	срце	голуб	III
3	срце	голуб	II

# Овце



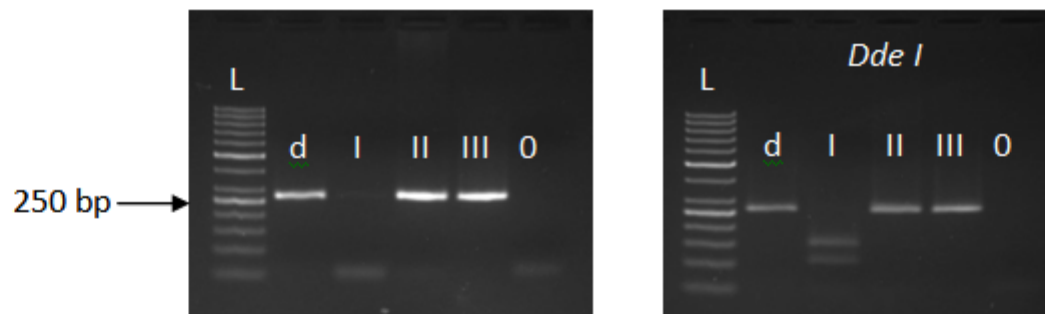
бр. узорка	тип материјала	порекло	генотип
1	срце	овца	II

# Результати

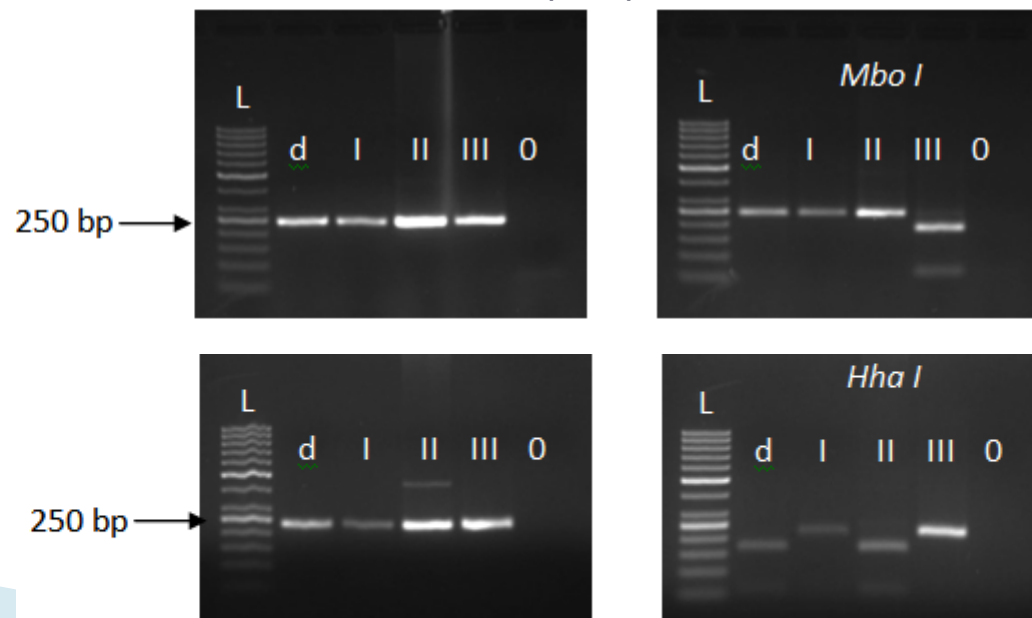
Бр. узорка	Тип узорка	Порекло	Генотип
1	крв	хумано	II
2	плодова вода	хумано	II
3	крв	хумано	I
4	крв	хумано	II
5	БАЛ	хумано	II
6	срце	голуб	II
7	срце	голуб	III
8	срце	голуб	II
9	срце	овца	II

# Резултати

Узорак 4. **SAG1** PCR продукт и продукти после деловања рестрикционог ензима



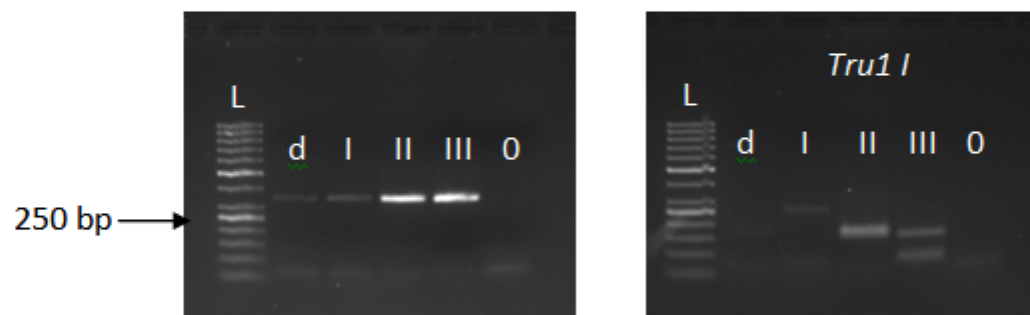
Узорак 4. **SAG2** PCR продукт и продукти после деловања рестрикционог ензима



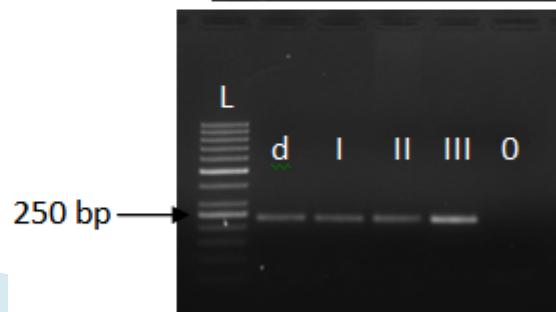
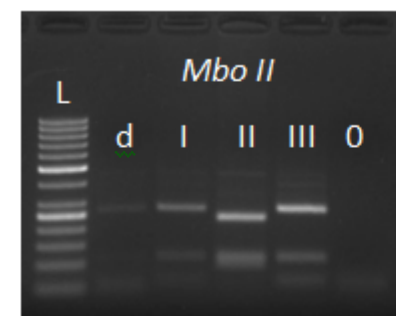
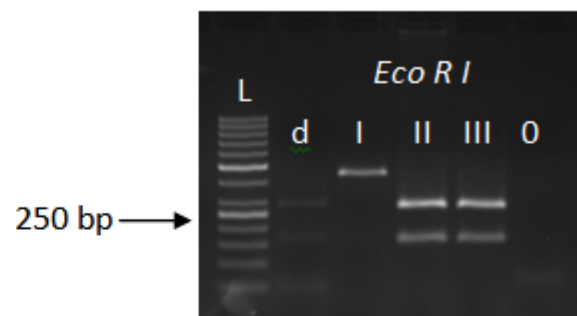
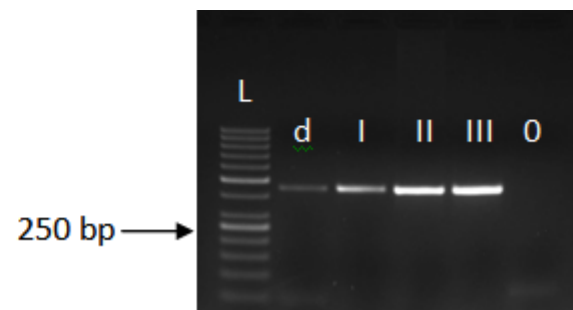


# Резултати

Узорак 4. **GRA6** PCR продукт и продукти после деловања рестрикционог ензима

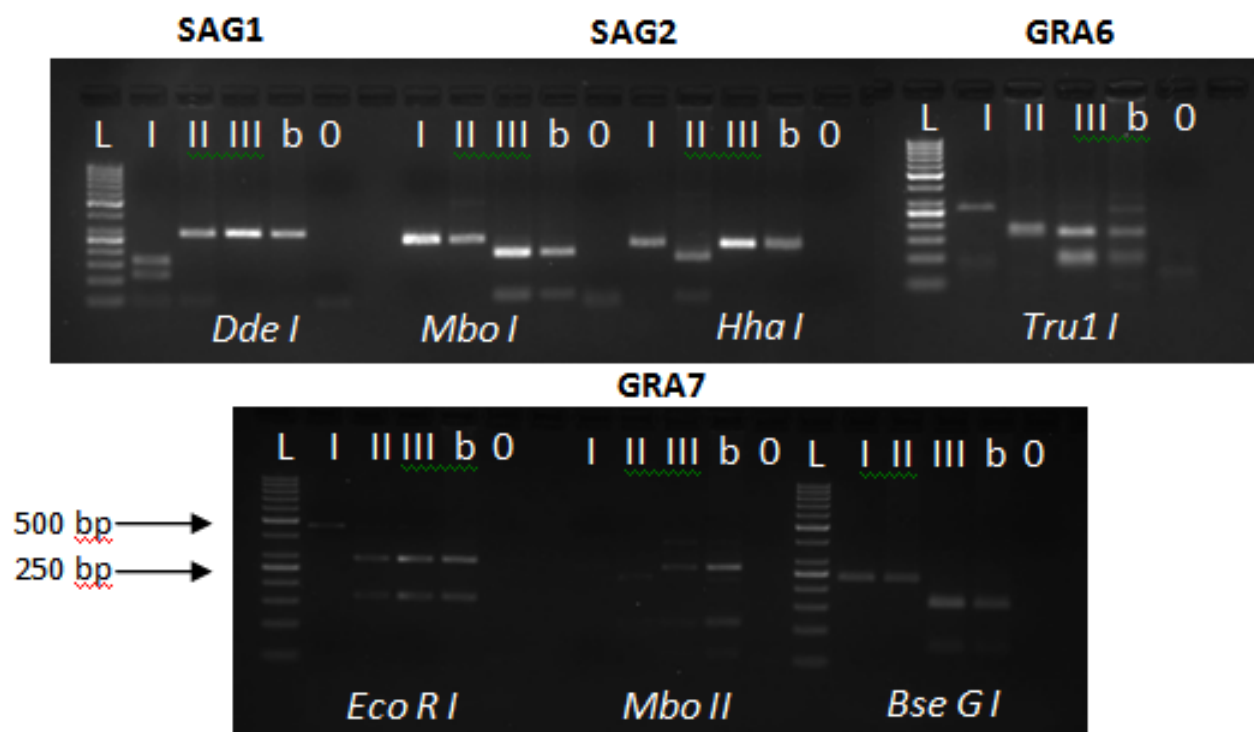


Узорак 4. **GRA7** PCR продукт и продукти после деловања рестрикционог ензима



# Резултати

Узорак 7. PCR продукти после дигестије рестрикционим ензимима



# Закључак II

На нашем подручју, као и у Европи, присутни пре свега генотип II а знатно мање и генотипови I и III

Резултати генотипизације изолованих сојева *T. gondii*



Први подаци о популационој структури на западном Балкану



Доприносе молекуларно епидемиолошкој мапи *T. gondii* у Европи





**ХВАЛА НА ПАЖЊИ**

