

**Διάγνωση Τοξοπλάσμωσης
σε Εγκύους & Ασθενείς με HIV
Μοριακή Τυποποίηση
& Φυλογενετική Σύγκριση Στελεχών του
*Toxoplasma gondii***

Διδακτορική Διατριβή

Χάρις Τζουβάλη

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

Ιούλιος 2004

**Diagnosis of Toxoplasmosis in Pregnant
Women & HIV Patients**
*Molecular Typing
& Phylogenetic Comparison
of Toxoplasma gondii Strains*

PhD Thesis

Haris Tzouvali

**UNIVERSITY OF CRETE
SCHOOL OF MEDICINE**

July 2004

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Τμήμα Ιατρικής

Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας

Παρασιτολογίας, Ζωνόσων

και Γεωγραφικής Ιατρικής

Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα

Διευθυντής: Καθηγ. Ι. Τσελέντης

**WHO Collaborating Center
For Research and Training in
Mediterranean Zoonoses**

**Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Παρασιτώσεων,
Ζωνόσων και Τροπικών Νόσων**

και υποστηρίχτηκε οικονομικά, εν μέρει

Από το Πρόγραμμα Ν^ο 1244 του
Ειδικού Λογαριασμού Κονδυλίων και Έρευνας (ΕΛΚΕ)
του Πανεπιστημίου Κρήτης

στον Δημήτριο, την Αρσινόη και τον Ηλία, όλοι τους Τζουβάλη

*Οι βάσεις της αρετής βρίσκονται στη φύση,
η καλλιέργειά της όμως, είναι έργο της παιδείας.*

Η φύση, χωρίς τη μάθηση είναι τυφλή.

Πλουτάρχου, "Ηθικά"

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	7
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	12
ΕΠΙΤΡΟΠΕΣ	13
ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	15
ΣΥΝΟΨΗ	17
SYNOPSIS.....	20
ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	23
VALUE OF THE PRESENT STUDY.....	24
Κεφάλαιο 1 <i>Toxoplasma gondii</i> & Τοξοπλάσμωση.....	25
ΤΟΧΟΠΛΑΣΜΑ GONDII.....	26
<i>Ανακάλυψη & Ταξινόμηση.....</i>	<i>26</i>
<i>Μολυσματικές Μορφές.....</i>	<i>27</i>
Ταχυζωΐδιο.....	27
Βραδυζωΐδιο & Ιστική Κύστη.....	28
Ωοκύστη.....	29
Προσκόλληση, Διείσδυση, & Ανάπτυξη.....	30
<i>Κύκλος Ζωής</i>	<i>32</i>
Αμφιγονικός Κύκλος Ζωής.....	32
Μονογονικός Κύκλος Ζωής.....	34
Οδοί Μετάδοσης	35
<i>Διαφορές Μεταξύ Στελεχών.....</i>	<i>35</i>
ΤΟΞΟΠΛΑΣΜΩΣΗ.....	36
Οξεία Τοξοπλάσμωση σε Ανοσοεπαρκή Άτομα.....	36
Συγγενής Τοξοπλάσμωση	37
Τοξοπλάσμωση σε Ανοσοκατεσταλμένα Άτομα	38
<i>Ανοσολογική Απόκριση Έναντι του <i>T. gondii</i>.....</i>	<i>39</i>
Ανοσοεπαρκή Άτομα	39
Ανοσοκατεσταλμένα Άτομα	39
<i>Επιδημιολογία Τοξοπλάσμωσης.....</i>	<i>40</i>
<i>Παράγοντες Κινδύνου & Προφύλαξη.....</i>	<i>43</i>
<i>Η Τοξοπλάσμωση στην Ελλάδα.....</i>	<i>44</i>
Κεφάλαιο 2 Ανάπτυξη Τεχνικών για Ανίχνευση του <i>T. gondii</i> και Διάγνωση	
Τοξοπλάσμωσης	46

PCR.....	47
<i>Εισαγωγή</i>	<i>47</i>
<i>Μεθοδολογία.....</i>	<i>48</i>
<i>Επιλογή Γονιδίου & Σχεδιασμός Εναρκτών</i>	<i>48</i>
<i>Παράγοντες Βελτιστοποίησης</i>	<i>49</i>
<i>Παρασκευή Πρότυπων Βιολογικών Δειγμάτων.....</i>	<i>50</i>
<i>Προσδιορισμός Ευαισθησίας & Ειδικότητας.....</i>	<i>51</i>
<i>Εκχύλιση DNA</i>	<i>51</i>
<i>Θερμικός Πολλαπλασιασμός</i>	<i>52</i>
<i>Αποτελέσματα & Συζήτηση</i>	<i>53</i>
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	56
<i>Εισαγωγή</i>	<i>56</i>
<i>Μεθοδολογία.....</i>	<i>57</i>
<i>Ιστοκαλλιέργειες</i>	<i>57</i>
<i>Καλλιέργειες σε Ποντίκια.....</i>	<i>60</i>
<i>Αποτελέσματα & Συζήτηση</i>	<i>61</i>
<i>Ιστοκαλλιέργειες</i>	<i>61</i>
<i>Καλλιέργειες σε Ποντίκια.....</i>	<i>64</i>
WESTERN BLOTTING	65
<i>Εισαγωγή</i>	<i>65</i>
<i>Μεθοδολογία.....</i>	<i>65</i>
<i>Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών.....</i>	<i>65</i>
<i>Ανοσοαποτύπωση</i>	<i>66</i>
<i>Αποτελέσματα & Συζήτηση</i>	<i>66</i>
Κεφάλαιο 3 Διάγνωση Συγγενούς Τοξοπλάσμωσης.....	69
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	70
<i>Ορολογική Διάγνωση: Ερμηνεία & Περιορισμοί</i>	<i>72</i>
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	74
<i>Ανάπτυξη Πρωτοκόλλου</i>	<i>74</i>
<i>Δείγματα</i>	<i>75</i>
<i>Ορολογικές Δοκιμασίες.....</i>	<i>77</i>
<i>PCR</i>	<i>77</i>
<i>Καλλιέργεια σε Ινοβλάστες.....</i>	<i>78</i>
<i>Καλλιέργεια σε Ποντίκια.....</i>	<i>78</i>
<i>Άμεση Παρατήρηση.....</i>	<i>79</i>
<i>Western Blotting.....</i>	<i>79</i>
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	79
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	83

Κεφάλαιο 4 Διάγνωση Τοξοπλάσμωσης σε Ασθενείς με HIV.....	88
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	89
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	91
<i>Δείγματα</i>	<i>91</i>
<i>Ορολογικές Δοκιμασίες.....</i>	<i>91</i>
<i>PCR.....</i>	<i>91</i>
<i>Καλλιέργεια σε Ινοβλάστες.....</i>	<i>92</i>
<i>Άμεση Παρατήρηση.....</i>	<i>92</i>
<i>Western Blotting.....</i>	<i>93</i>
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	94
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	95
Κεφάλαιο 5 Ανίχνευση του <i>Toxoplasma gondii</i> σε Ζώα	102
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	103
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	105
<i>Δείγματα</i>	<i>105</i>
<i>PCR.....</i>	<i>107</i>
<i>Καλλιέργεια σε Ποντίκια.....</i>	<i>107</i>
<i>Άμεση Παρατήρηση.....</i>	<i>108</i>
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	108
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	109
Κεφάλαιο 6 Μοριακή Τυποποίηση & Φυλογενετική Ταξινόμηση Στελεχών του <i>Toxoplasma gondii</i>.....	113
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	114
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	117
<i>Δείγματα</i>	<i>117</i>
<i>Μοριακή Τυποποίηση Στελεχών.....</i>	<i>117</i>
<i>Φυλογενετική Σύγκριση Στελεχών.....</i>	<i>120</i>
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	121
<i>Μοριακή Τυποποίηση Στελεχών.....</i>	<i>121</i>
<i>Φυλογενετική Σύγκριση Στελεχών.....</i>	<i>122</i>
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	127
I Βιβλιογραφία.....	132
II Παράρτημα	151
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ.....	152
<i>1.1 Επεξεργασία Βιολογικών Δειγμάτων για PCR και Καλλιέργεια</i>	<i>152</i>

1.1.1 Περιφερικό Αίμα.....	153
1.1.2 Αμνιακό Υγρό.....	154
1.1.3 Πλακούντας.....	154
1.1.4 Κόπρανα Γάτας.....	155
1.1.5 Εγκέφαλοι Αρουραίων/Ποντικών.....	155
<i>1.2 Ιστοκαλλιέργειες.....</i>	<i>156</i>
1.2.1 Γενικές Οδηγίες.....	156
1.2.2 Καλλιέργεια MRC-5.....	156
1.2.3 Καλλιέργεια <i>T. gondii</i> σε MRC-5.....	157
1.2.4 Διαχωρισμός MRC-5 από <i>T. gondii</i>	157
1.2.5 Μέτρηση Αριθμού Κυττάρων.....	158
1.2.6 Shell-Vials.....	158
1.2.7 Καλλιέργεια THP-1.....	159
1.2.8 Μόλυνση THP-1 με <i>T. gondii</i>	159
1.2.9 Διαχωρισμός Μολυσμένων THP-1 από <i>T. gondii</i>	159
<i>1.3 Καλλιέργεια σε Ποντίκια Balb/c.....</i>	<i>160</i>
1.3.1 Καλλιέργεια <i>T. gondii</i> σε Ποντίκια.....	160
1.3.2 Ενοφθαλμισμός Δειγμάτων σε Ποντίκια.....	160
1.3.3 Αιμοσυγκόλληση σε Αίμα Ποντικών.....	161
<i>1.4 Μικροσκοπικές Μέθοδοι.....</i>	<i>162</i>
1.4.1 Κυτταροφυγοκέντρηση.....	162
1.4.2 Χρώση Giemsa.....	162
1.4.3 Έμμεσος Ανοσοφθορισμός.....	163
<i>1.5 PCR για Ανίχνευση <i>T. gondii</i>.....</i>	<i>163</i>
1.5.1 Εκχύλιση DNA.....	163
1.5.1.a Βρασμός-Ψύξη.....	163
1.5.1.b Φαινόλη-Χλωροφόρμιο.....	164
1.5.1.c Qiagen DNA Blood Extraction Mini Kit.....	164
1.5.1.d Qiagen DNA Extraction Mini Kit.....	165
1.5.2 Αντιδράσεις.....	165
1.5.3 Παρασκευή Θετικού Μάρτυρα <i>T. gondii</i>	165
<i>1.6 Παγίδευση Αρουραίων και Ποντικών.....</i>	<i>166</i>
<i>1.7 Western Blotting.....</i>	<i>167</i>
1.7.1 Παρασκευή Αντιγόνου <i>T. gondii</i>	167
1.7.1.a Ποσοτικοποίηση Πρωτεΐνης (Bradford).....	167
1.7.2 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών.....	167
1.7.3 Ανοσοαποτύπωση.....	168
<i>1.8 PCR-RFLP.....</i>	<i>170</i>
1.8.1 Nested PCR.....	170

1.8.2 RFLP	170
<i>1.9 Κλωνοποίηση Προϊόντων PCR.....</i>	<i>172</i>
1.9.1 Ετοιμασία Ικανών Κυττάρων.....	172
1.9.2 Καθαρισμός Προϊόντων PCR	173
1.9.3 Απολίνωση Προϊόντων PCR.....	173
1.9.4 Μετασηματισμός Ικανών Κυττάρων.....	174
1.9.5 Έλεγχος των Μετασηματισμένων Αποικιών με PCR.....	174
<i>1.10 Αλληλούχιση.....</i>	<i>176</i>
1.10.1 Καθαρισμός Προϊόντων PCR	176
1.10.2 Αντιδράσεις Αλληλούχισης	176
1.10.3 Παρασκευή Γέλης Ακρυλαμίδης.....	176
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	177
<i>2.1 Western Blotting.....</i>	<i>177</i>
<i>2.2 Έμμεσος Ανοσοφθορισμός</i>	<i>178</i>
<i>2.3 Ιστοκαλλιέργειες.....</i>	<i>178</i>
<i>2.4 PCR.....</i>	<i>178</i>
<i>2.5 Κλωνοποίηση.....</i>	<i>178</i>
<i>2.6 Αλληλούχιση.....</i>	<i>179</i>
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΕΝΑΡΚΤΩΝ	179
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΥΛΙΚΩΝ.....	180
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5 ΚΛΕΙΔΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ	181
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6 ΥΠΟΔΙΑΙΡΕΣΕΙΣ ΜΟΝΑΔΩΝ	181
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 7 ΕΥΘΥΓΡΑΜΜΙΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ	182
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 8 ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ & ΣΥΜΒΟΛΑ	184

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους επιβλέποντες καθηγητές μου, Ιωάννη Τσελέντη, Καθηγητή Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης (ΠΚ) και Μαρία Αντωνίου, Επίκουρο Καθηγήτρια Παρασιτολογίας του ΠΚ, για την υποστήριξη και συμβουλή τους.

Παραμένω ευγνώμων στην Dr. Ana María Aransay Bañares, για τη φιλία της και τη βοήθειά της σε όλη τη διάρκεια της εργασίας μου. Ευχαριστώ τον Vladimir Ivonic για την βοήθειά του στις συλλογές ζώων. Την κ. Γεωργοπούλου για τις συλλογές δειγμάτων από νοσοκομεία της Αθήνας. Τα μέλη του εργαστηρίου Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΠΚ για την υποστήριξή τους.

Ευχαριστώ τους M. L. Dardé (Laboratoire de Parasitologie, Limoges), S. L. Croft (London School of Hygiene and Tropical Medicine) και Α. Μεντή (Ινστιτούτο Pasteur, Αθήνα) για την ευγενική παραχώρηση στελεχών αναφοράς.

Για τη συνεργασία τους στις συλλογές δειγμάτων ευχαριστώ: τον κ. Κουμαντάκη, Καθηγητή Γυναικολογίας του ΠΚ, και τον κ. Σηφάκη. Τον κ. Πάνου από το Α' ΙΚΑ Αθηνών. Ευχαριστώ την Κ. Καρτσάκη και την Γ. Φανουράκη από το Ορολογικό εργαστήριο του Πα.Γ.Ν.Η για την συνεργασία τους. Ευχαριστώ τον Κ. Κουρουνιώτη για την προμήθεια ποντικών balb/c.

Τέλος, τιμώ τους γονείς μου, Δημήτριο και Αρσινόη και τον μοναδικό αδελφό μου Ηλία, όλοι τους αστείρευτη πηγή δύναμης και έμπνευσης. Σας ευχαριστώ που κάνετε τα πάντα εφικτά.

Επιτροπές

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

- Ι. Τσελέντης Καθηγητής Παρασιτολογίας, ΠΚ
Μ. Αντωνίου Επίκουρος Καθηγήτρια Παρασιτολογίας, ΠΚ
Δ. Καραγωγέως Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Νευροεπιστημών, ΠΚ

Επταμελής Επιτροπή

- Ι. Τσελέντης Καθηγητής Παρασιτολογίας, ΠΚ
Ε. Κουμαντάκης Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, ΠΚ
Γ. Σαμώνης Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας ΠΚ
Μ. Καλμαντή Καθηγήτρια Ογκολογίας-Αιματολογίας Παίδων, ΠΚ
Δ. Καραγωγέως Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Νευροεπιστημών, ΠΚ
Μ. Αντωνίου Επίκουρος Καθηγήτρια Παρασιτολογίας, ΠΚ
Α. Γκίκας Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Παθολογίας, ΠΚ

Είναι καλύτερο να αποτύχεις σε μια πράξη που την έχεις καλοσκεφτεί, παρά να επιτύχεις σε κάτι που έκανες ασυλλόγιστα. Γιατί είναι καλύτερο να μη δικαιωθεί μια σωστή πορεία, παρά να δικαιωθεί τυχαία μια λανθασμένη πορεία.

Επίκουρου, "Επιστολή προς Μενουκέα"

Στόχοι της Μελέτης

1. Προσαρμογή και ανάπτυξη συνδυασμού τεχνικών για τη διάγνωση της τοξοπλάσμωσης και την ανίχνευση και απομόνωση του *Toxoplasma gondii* (Κεφάλαιο 2).
 - i. της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR), για την ταχεία και αξιόπιστη ανίχνευση του *T. gondii* σε διάφορα βιολογικά υλικά.
 - ii. των καλλιεργείων σε ποντίκια και κυτταρικές σειρές, για την ανίχνευση και απομόνωση του *T. gondii* από βιολογικά υλικά.
 - iii. του Western Blotting για την διάγνωση συγγενούς τοξοπλάσμωσης σε νεογνά, και τον εντοπισμό διαγνωστικών αντιγόνων του *T. gondii* σε ασθενείς με HIV.

2. Εφαρμογή των ανεπτυγμένων τεχνικών στη διάγνωση της τοξοπλάσμωσης και στην ανίχνευση και απομόνωση του *T. gondii* από πιθανές πηγές του.
 - i. σε δείγματα εγκύων γυναικών και νεογνών (Κεφάλαιο 3), ώστε:
 - να αναγνωριστούν τα στελέχη τα οποία εμπλέκονται σε μολύνσεις εγκύων και στη συγγενή τοξοπλάσμωση.
 - να υπολογιστεί ο επιπολασμός της τοξοπλάσμωσης
 - να υπολογιστεί ο ρυθμός διαπλακουντικής μετάδοσης του *T. gondii*.
 - να διερευνηθεί το αποτέλεσμα των κηύσεων εγκύων μολυσμένων *T. gondii*, με την εφαρμογή ειδικού πρωτοκόλλου
 - ii. σε δείγματα ασθενών με HIV (Κεφάλαιο 4), ώστε:
 - να αναγνωριστούν τα στελέχη τα οποία ευθύνονται για μολύνσεις σε ασθενείς με HIV.
 - να αναγνωριστούν αντιγόνα τα οποία να διαχωρίζουν την τοξοπλάσμική εγκεφαλίτιδα από τη λανθάνουσα λοίμωξη
 - iii. σε άγρια ποντίκια/αρουραίους, γάτες, και σε ιστούς ζώων παραγωγής (Κεφάλαιο 5), ώστε:
 - να αναγνωριστούν τα στελέχη τα οποία ευθύνονται για μολύνσεις σε ζώα.

- να αναγνωριστεί η κύρια πηγή μόλυνσης σε ανθρώπους στην Κρήτη.
- να συγκριθούν τα στελέχη προερχόμενα από ζώα με εκείνα προερχόμενα από ανθρώπους.

3. Μοριακή τυποποίηση και φυλογενετική σύγκριση των στελεχών του *T. gondii* που προέκυψαν (Κεφάλαιο 6).

- i. με ανάλυση πολυμορφισμού των κλασμάτων του DNA μετά από επίδραση περιοριστικών ενζύμων (Restriction Fragment Length Polymorphism) και
- ii. με αλληλούχιση του DNA (sequencing), ώστε:
 - να αναγνωριστούν οι τύποι των στελεχών που απαντώνται στην Ελλάδα.
 - να συσχετιστεί ο γονότυπος των συγκεκριμένων στελεχών με την πρόκληση ανθρώπινης νόσου.
 - Να συγκριθούν φυλογενετικά τα στελέχη που απαντώνται στην Ελλάδα με στελέχη τα οποία έχουν απομονωθεί σε άλλα μέρη του κόσμου

Σύνοψη

Ανάπτυξη Τεχνικών

Διερευνήθηκε η αξία μίας τροποποιημένης μεθόδου PCR (deoxyuridine triphosphate–uracil DNA glycosylase PCR) βασισμένης στην αλληλουχία του γονιδίου B1 του *T. gondii*, στην ανίχνευση του παρασίτου σε πειραματικά μολυσμένα βιολογικά δείγματα. Η προτεινόμενη τεχνική ανίχνευσε συστηματικά 1 παράσιτο *T. gondii* σε όλα τα είδη πειραματικών δειγμάτων. Η τεχνική των ιστοκαλλιέργειών αναπτύχθηκε με την καλλιέργεια ινοβλαστών MRC–5 σε shell–vials για την απομόνωση του *T. gondii*. Οι τεχνικές της καλλιέργειας σε ποντίκια και του Western Blotting (WB) βελτιστοποιήθηκαν σε ήδη υπάρχοντα στη βιβλιογραφία πρωτόκολλα.

Διάγνωση Συγγενούς Τοξοπλάσμωσης (ΣΤ)

Όταν μία έγκυος αναπτύξει οξεία μόλυνση με *T. gondii*, το παράσιτο δύναται να μεταδοθεί στο έμβρυο και να προκαλέσει σοβαρή βλάβη. Η έγκαιρη διάγνωση και χορήγηση θεραπείας αυξάνει τις πιθανότητες γέννησης υγιούς παιδιού. Σκοπός της μελέτης ήταν να υπολογιστεί (α) ο επιπολασμός της τοξοπλάσμωσης και (β) ο ρυθμός διαπλακουντικής μετάδοσης του *T. gondii*, (γ) να διερευνηθεί το αποτέλεσμα των κήσεων εγκύων μολυσμένων *T. gondii*, (δ) να αναπτυχθεί και να εφαρμοστεί ειδικό πρωτόκολλο για την παρακολούθηση και τον χειρισμό εγκύων, εμβρύων και νεογνών.

Στο πρωτόκολλο συμμετείχαν 5.532 γυναίκες σε διαφορετικά στάδια κύησης. Παρακολούθηση του 70,57% των οροαρνητικών εγκύων, ανίχνευσε ορομετατροπή σε μία περίπτωση. Από το 29,45% των οροθετικών εγκύων, 185 πληρούσαν τα ορολογικά κριτήρια για οξεία λοίμωξη κατά τη διάρκεια της κύησης (3,34%), και ελέγχθησαν περαιτέρω με PCR και καλλιέργειες. Η ορομετατροπή επιβεβαιώθηκε με ανίχνευση παρασιταϊμίας σε 5 γυναίκες, και διαπλακουντικής μετάδοσης σε 1 έμβρυο (0,11%). Κανένα νεογνό δεν παρουσίασε συμπτώματα ΣΤ κατά τη γέννηση και μέχρι 1 χρόνο μετά, όπως αποδεικνύεται από την ορολογική παρακολούθηση, το WB και την κλινική εξέταση.

Το πρωτόκολλο βοήθησε τους κλινικούς να προσφέρουν συμβουλή βασισμένη σε ολοκληρωμένα δεδομένα, οδηγώντας σε μείωση της ανησυχίας αυτών και του ζευγαριού, ενώ συνετέλεσε στη μείωση τερματισμών κήσεων λόγω υποψίας ΣΤ. Στην Ελλάδα, με πιθανό ρυθμό ορομετατροπής 3,34% και 70% των γυναικών σε

κίνδυνο να αναπτύξουν τοξοπλάσμωση, η εισαγωγή αντίστοιχου περιγεννητικού προγράμματος είναι δικαιολογημένη.

Διάγνωση Τοξοπλάσμωσης σε Ασθενείς με HIV

Με την εμφάνιση του ιού HIV και την επακόλουθη έλευση του AIDS, η διάδοση της τοξοπλάσμωσης εγκεφαλίτιδας (TE) έχει αυξηθεί, επηρεάζοντας το 40% ασθενών με HIV, με το 10–30% αυτών να υποκύπτουν στη νόσο. Η τυποποίηση μίας μεθόδου ικανής να διαχωρίσει την TE από τη λανθάνουσα λοίμωξη, θα επιτρέψει την ορθή και έγκαιρη χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής, περιορίζοντας την έκταση των εγκεφαλικών βλαβών. Χρησιμοποιήθηκε το WB για να διαπιστωθεί εάν ασθενείς με HIV μπορούσαν να αναγνωρίσουν, ποιοτικά, ειδικά αντιγόνα, τα οποία θα διαχώριζαν την TE από τη λανθάνουσα λοίμωξη. Παράλληλα, εφαρμόστηκαν η προτεινόμενη τεχνική της PCR και οι ιστοκαλλιέργειες.

Από 238 ασθενείς, το 28,57% είχε αντισώματα IgG, χωρίς IgM ή IgA. 83 ασθενείς, ένας από τους οποίους είχε κλινική TE, ελέγχθηκαν με WB. Παρατηρήθηκε αντιστοιχία του τίτλου αντισωμάτων με τον αριθμό των αναγνωριζόμενων αντιγόνων. Κανένα αντιγόνο δεν αναγνωρίστηκε από όλους τους ασθενείς ενώ υπήρχαν κοινά αντιγόνα σε αρκετούς ασθενείς. Οι ασθενείς με τίτλο μεγαλύτερο από 70 IU/ml είχαν όλα τα αντιγόνα κοινά εκτός από ένα των 56 kDa. Με τα διαθέσιμα δείγματα δεν κατέστη δυνατή η αναγνώριση διαγνωστικών αντιγόνων. Η PCR και οι ιστοκαλλιέργειες ήταν αρνητικές σε όλα τα δείγματα.

Ανίχνευση του *T. gondii* στο Περιβάλλον

Το *T. gondii* έχει ιδιαίτερο ιατρικό και κτηνιατρικό ενδιαφέρον, καθώς δύναται να προκαλέσει αποβολή και συγγενή νόσο στους ενδιάμεσους ξενιστές του. Κατά τη διάρκεια της εξέλιξής του, το *T. gondii* έχει αναπτύξει μεγάλο εύρος πιθανών οδών μετάδοσης, χωρίς να έχει διαλευκανθεί ποια από αυτές είναι σημαντικότερη επιδημιολογικά. Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να εντοπιστούν οι κύριες δεξαμενές του *T. gondii* στο περιβάλλον, και κατά συνέπεια να αναγνωριστεί η κύρια πηγή μόλυνσης σε ανθρώπους στην Κρήτη. Επίσης, να συγκριθούν τα στελέχη που θα απομονώνονταν από το περιβάλλον με τα στελέχη προερχόμενα από ανθρώπους.

Για τον σκοπό αυτό κατά τη διάρκεια 3 χρόνων, εξετάστηκαν 244 δείγματα καρδιών χοίρων, 99 δείγματα καρδιών αιγών, 346 δείγματα εγκεφάλων άγριων αρουραίων, και 73 δείγματα κοπράνων αδέσποτων γατών. Σε κανένα από τα δείγματα

τα οποία εξετάστηκαν δεν εντοπίστηκε παρουσία του *T. gondii*. Για την εξακρίβωση της σημασίας των διαφορετικών ξενιστών στην επιδημιολογία της τοξοπλάσμωσης μίας γεωγραφικής περιοχής, θα ήτανε περισσότερο χρήσιμη μία ορο-επιδημιολογική μελέτη η οποία θα εξερευνούσε στην παρουσία αντισωμάτων στους εμπλεκόμενους ξενιστές.

Μοριακή Τυποποίηση και Φυλογενετική Σύγκριση Στελεχών του *T. gondii*

Παρά το γεγονός ότι το *T. gondii* έχει την ευκαιρία για γενετικό ανασυνδυασμό στον τελικό ξενιστή η συντριπτική πλειοψηφία των στελεχών κατηγοριοποιούνται σε μία από μόνο τρεις ξεχωριστές κλωνικές γραμμές (τύπου I, II και III). Στόχος της έρευνας ήταν η τυποποίηση των στελεχών του *T. gondii* τα οποία απαντώνται στην Ελλάδα, ο συσχετισμός του γονότυπου των συγκεκριμένων στελεχών με την ανθρώπινη νόσο, και η φυλογενετική σύγκριση των στελεχών με άλλα στελέχη τα οποία έχουν απομονωθεί σε διαφορετικά μέρη του κόσμου.

Για πρώτη φορά στη Ελλάδα, τυποποιήθηκαν στελέχη του *T. gondii*. Με τη χρήση των τεχνικών της PCR-RFLP και sequencing στο γονίδιο *SAG2*, τυποποιήθηκαν 6 στελέχη του *T. gondii*: 5 από παρασιταίμιες εγκύων, και 1 από διαπλακουντική μετάδοση. Ένα από τα στελέχη ανήκει στα στελέχη τύπου I, 3 στα στελέχη τύπου III, ενώ 2 στελέχη φαίνεται να αποτελούν ανασυνδυασμό μεταξύ στελεχών τύπου II και στελεχών τύπου III. Το στέλεχος τύπου I προέκυψε από γυναίκα στην οποία προκλήθηκε αυτόματη αποβολή, παρουσιάζοντας ταυτόχρονα εικόνα έντονης λεμφαδενοπάθειας. Ένα από τα στελέχη τύπου III ανιχνεύθηκε σε αμνιακό υγρό, και οδήγησε σε γέννηση υγιούς νεογνού μετά από θεραπεία. Όσον αφορά στα υπόλοιπα στελέχη, δεν ανιχνεύθηκε διαπλακουντική μετάδοση του παρασίτου από εξέταση του αμνιακού υγρού, και τα νεογνά γεννήθηκαν υγιή.

Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν άμεση σχέση μεταξύ των στελεχών τύπου I με οξεία συμπτωματική μητρική τοξοπλάσμωση, με διαπλακουντική μετάδοση του *T. gondii*, και με την πρόκληση αυτόματης αποβολής.

Synopsis

Protocol Standardisation

The value of an altered PCR method (deoxyuridine triphosphate–uracil DNA glycosylase PCR), based on the sequence of the B1 gene of *T. gondii*, in the detection of *T. gondii* in experimentally infected samples was investigated. The proposed technique systematically detected a single parasite in all experimental samples. The method of tissue culture was developed with culturing MRC–5 fibroblasts in shell–vials for the isolation of *T. gondii*. The techniques of mice culture and Western Blotting (WB) were applied as described elsewhere, with a few modifications.

Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis (CT)

When a pregnant woman develops acute infection with *T. gondii*, the parasite can infect the fetus after transplacental transmission and cause serious damage. Early diagnosis and treatment raises the possibility of delivering a healthy neonate. The aim of this study was to calculate (a) the frequency of toxoplasmosis among pregnant women, (b) the rate of transplacental transmission of *T. gondii*, (c) to investigate the pregnancy outcome of women infected during pregnancy, (d) to devise and apply a specialized protocol for monitoring and handling pregnant women, embryos and neonates for *T. gondii* infection.

5,532 women at different gestational ages participated. Monitoring the 70.57% of seronegative women, detected seroconversion in one case. From 29.45% of seropositive women, 185 (3.34%) fulfilled the criteria set for acute toxoplasmosis during pregnancy and were further tested by PCR and culture. Seroconversion was verified with parasitemia detection in 5 women and transplacental transmission in 1 case (0.11%). No neonate presented symptoms of congenital toxoplasmosis (CT) at birth or during the first year of their lives, as shown by serological follow–up, WB and clinical evaluation.

The presented protocol assisted clinicians in providing informed counseling, which helped in anxiety reduction of both them and the couple, while it reduced the number of pregnancy terminations due to suspicion of CT. In Greece, with a possible seroconversion rate of 3.34% and 70% of women at risk of developing toxoplasmosis during pregnancy, the introduction of a perinatal program is justified.

Diagnosis of Toxoplasmosis in Patients with HIV

With the emergence of HIV and the advent of AIDS, the frequency of toxoplasmic encephalitis (TE) has increased, affecting up to 40% of HIV patients with a 10–30% of them submitting to the disease. The introduction of a method capable of differentiating between TE and chronic infection would allow the timely advent of medication, restricting the extension of cerebral damage. WB was used in order to investigate whether patients with HIV could recognize, qualitatively, special antigens that would allow differentiation between TE and chronic infection. PCR and culture were also performed.

From 238 patients 28.57% had IgG antibodies but no IgM or IgA. 83 patients, one with clinical TE, were tested by WB. There was clear correspondance of the antibody titer and the number of recognized antigens. No antigen was present in all samples tested, whereas there were many antigens recognized by a number of patients. Patients with a titer higher than 70 IU/ml had all antigens in common except one of 56 kDa. With the samples that were available for testing it was not possible to recognize any antigens of diagnostic value. PCR and culture were negative for all samples tested.

Detection of T. gondii in Nature

T. gondii is a parasite of special medical and veterinary importance, as it causes abortion and congenital disease in its intermediate hosts. In its course of evolution, *T. gondii* has developed a broad range of possible routes of transmission, without it being clear which one is epidemiologically most important. The aim of this study was to detect the principal pools of *T. gondii* in nature, and thus, identify the major route of transmission to humans in Crete. Finally, to compare the strains isolated from nature, with the ones isolated from humans.

For this purpose, during 3 years, 244 heart tissues from swine, 99 heart tissues of goats, 346 samples of rat's brains and 73 samples of stray cat's feces were tested. The presence of the infectious forms of *T. gondii* was not detected in any of the samples tested. For the understanding of the importance of different hosts in the epidemiology of toxoplasmosis in a given geographical area, a sero-epidemiological study in the implicated hosts would be helpful.

Molecular Typing and Phylogenetic Analysis of T. gondii Strains

Despite the fact that *T. gondii* has the opportunity for genetic recombination in the final host, the vast majority of the strains fall into only one of three distinct clonal lineages (designated as type I, II and III). The aim was to genetically type the strains that are found in Greece, to correlate the identified genotypes with human disease, and to infer phylogenetic relationships between these strains and strains isolated elsewhere.

For the first time in Greece, strains of *T. gondii* were genetically typed. The techniques of PCR–RFLP and sequencing were applied to the *SAG2* gene, to type 6 strains of *T. gondii*: 5 derived from parasitemias of pregnant women, and 1 from transplacental transmission. One strain belonged to type I, 3 to type III strains, while two strains seem to be recombinants between type II and type III strains. The single type I strain, was derived from a woman that underwent spontaneous abortion and was presented with severe lymphadenopathy. One of the type III strains was derived from the amniotic fluid of a pregnancy that resulted in the birth of a healthy child, after administration of therapy. Concerning the rest of the strains typed, transplacental transmission was not detected after testing of the amniotic fluid, and the children born were healthy. These results clearly exhibit a relationship of type I strains with acute symptomatic maternal infection, transplacental transmission, and the cause of spontaneous abortion.

Σημασία της Παρούσας Μελέτης

Αυτή είναι η πρώτη συστηματική και σφαιρική μελέτη του *T. gondii* στην Ελλάδα, η οποία περιέλαβε όλους τους παράγοντες που εμπλέκονται στον κύκλο ζωής του παρασίτου: εγκύους, νεογνά, ασθενείς με HIV, και ζώα.

Υπολογίστηκε ο επιπολασμός της τοξοπλάσμωσης σε έγκυες γυναίκες στην Κρήτη, και ο ρυθμός διαπλακουντικής μετάδοσης του *T. gondii* γεγονός σημαντικό στον καθορισμό της εισαγωγής ή όχι συγκεκριμένης στρατηγικής αντιμετώπισης τοξοπλάσμωσης κατά τη διάρκεια της κύησης. Για πρώτη φορά στην Ελλάδα, εφαρμόστηκε ειδικά σχεδιασμένο ολοκληρωμένο πρωτόκολλο για την παρακολούθηση και χειρισμό εγκύων γυναικών, εμβρύων και νεογνών, το οποίο συνδυάζει ορολογικές και μοριακές τεχνικές, και εμπλέκει γυναικολόγους, νεογνολόγους και παιδιάτρους. Η εφαρμογή του πρωτοκόλλου συνετέλεσε δραματικά στη μείωση τερματισμού κύσεων λόγω υποψίας ΣΤ.

Έγινε απόπειρα να τυποποιηθεί μία τεχνική ικανής να διαχωρίσει την ΤΕ από τη λανθάνουσα λοίμωξη ή οποία θα επιτρέψει την ορθή και έγκαιρη χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής, περιορίζοντας την έκταση των εγκεφαλικών βλαβών, σε ασθενείς με HIV. Έγινε απόπειρα να εντοπιστούν οι κύριες δεξαμενές του *T. gondii* στο περιβάλλον, και κατά συνέπεια να αναγνωριστεί η κύρια πηγή μόλυνσης σε ανθρώπους στην Κρήτη.

Για πρώτη φορά στην Ελλάδα, τυποποιήθηκαν μοριακά στελέχη του *T. gondii*, και πραγματοποιήθηκε συσχετισμός του γονότυπου των στελεχών με την πρόκληση μητρικής και εμβρυικής νόσου. Η τυποποίηση στελεχών του *T. gondii* δεν έχει μόνο ιστορικό ενδιαφέρον. Η σύγκριση των τύπων των στελεχών που απαντώνται σε ανθρώπους και ζώα, μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση των οδών μετάδοσης του *T. gondii*. Ο συσχετισμός του γονότυπου των στελεχών με την πρόκληση νόσου στον άνθρωπο μπορεί να βοηθήσει σημαντικά στην μείωση του αριθμού των εκτρώσεων και τη μείωση χορήγησης μη-απαραίτητης θεραπευτικής αγωγής. Τέλος, για πρώτη φορά, πραγματοποιήθηκε φυλογενετική σύγκριση των στελεχών με άλλα στελέχη τα οποία έχουν απομονωθεί σε διαφορετικά μέρη του κόσμου.

Value of the Present Study

This is the first systematic and spherical study of *T. gondii* in Greece, which included all members involved in the life cycle of the parasite: pregnant women, neonates, HIV patients, and animals.

The seroprevalence of toxoplasmosis in pregnant women in Crete and the rate of transplacental transmission were investigated, both of which are important in the determination of the introduction of not of a specific strategy for toxoplasmosis during pregnancy. For the first time in Greece, a specially designed protocol of monitoring and handling of pregnant women, embryos, and neonates that combines serological and molecular techniques and involves gynecologists, neonatologists and pediatricians, was introduced. The application of this protocol dramatically helped in the reduction of the number of pregnancy terminations due to suspected CT.

It was attempted to standardize a technique for the differentiation of TE from latent toxoplasmosis, which would allow orthological and timely administration of treatment, reducing the extend of brain damages in HIV patients. It was attempted to detect the main pools of *T. gondii* in nature, and therefore, to identify the main source of infection to humans in Crete.

For the first time in Greece, strains of *T. gondii* were typed by molecular methods, and the genotypes were correlated with maternal and neonatal disease. Typing of *T. gondii* strains is not only of historical interest. The comparison of strain types that are found in humans and animals could assist in the understanding of routes of transmission of *T. gondii*. The correlation of the genotypes with human disease could greatly assist in the reduction of pregnancy terminations and the administration of unnecessary treatment. Finally, for the first time, strains identified in Greece were phylogenetically compared with strains isolated in other parts of the world.

Κεφάλαιο 1

***Toxoplasma gondii* & Τοξοπλάσμωση**

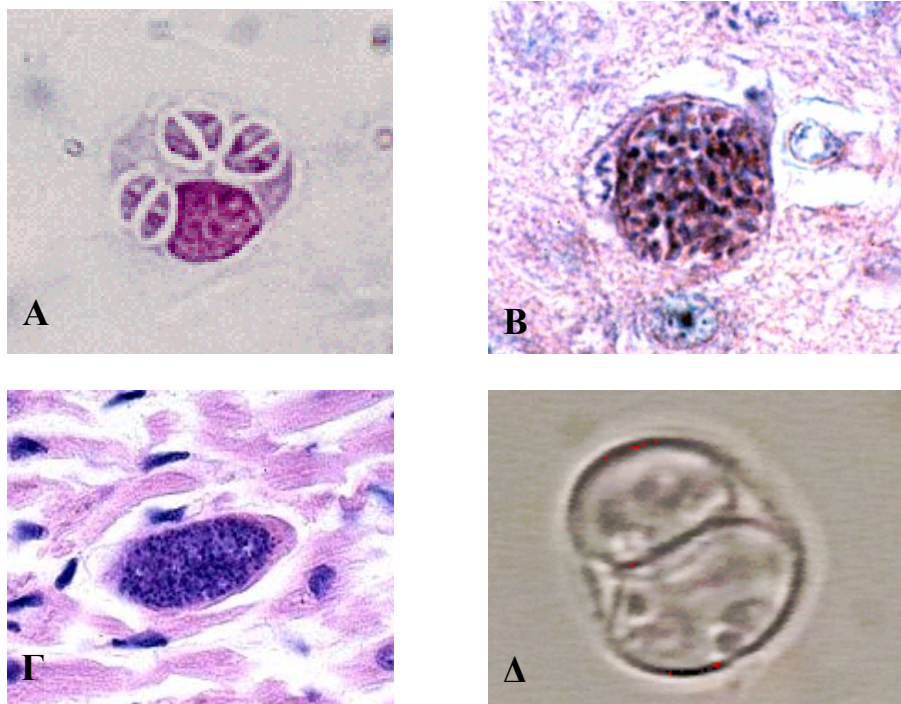
Toxoplasma gondii

Ανακάλυψη & Ταξινόμηση

Το *Toxoplasma gondii* είναι ένα ευρέως διαδεδομένο κοκκιδιακό πρωτοζωικό παράσιτο¹ ανθρώπων και ζώων, το οποίο ανακαλύφθηκε ταυτόχρονα στο Ίδρυμα Pasteur της Τυνησίας στο άγριο τρωκτικό *Ctenodactylous gondis* [Nicole & Manceaux 1908], και σε εργαστηριακό κουνέλι στη Βραζιλία [Splendore, 1908]. Το όνομα του γένους *Toxoplasma* προέρχεται από την ελληνική λέξη «τόξο», το οποίο αναφέρεται στο τοξοειδές σχήμα των εξωκυτταρικών μορφών του παρασίτου όπως φαίνονται *in vitro*, ενώ το όνομα του είδους «*gondii*» προέρχεται από το τρωκτικό στο οποίο ανακαλύφθηκε [Nicole & Manceaux, 1909]. Το *T. gondii* απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1923, σε αυτοψία, από τον αμφιβληστροειδή ενός παιδιού [Janke, 1923].

Το *T. gondii* είναι το μοναδικό γνωστό είδος του γένους *Toxoplasma*. Ανήκει στο βασίλειο των *Eukaryotae*, φύλο *Apicomplexa*, ομοταξία *Coccidia*, τάξη *Eimeriida*, οικογένεια *Sarcocystidae*, και γένος *Toxoplasma* [Levine *et al.*, 1980].

¹ **Παράσιτο:** οργανισμός που απαιτεί τη χρήση βιολογικών υλικών από άλλους οργανισμούς ή κύτταρα για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωσή του.



Εικόνα 1-1. Μολυσματικές μορφές του *T. gondii* (Α) Ενδοκυττάρια ταχυζώδια, (Β) ιστική κύστη από εγκέφαλο, (Γ) ιστική κύστη από καρδιακό μυ, και (Δ) σποροκύστη.

Μολυσματικές Μορφές

Το *T. gondii* περιλαμβάνει τρεις μολυσματικές μορφές, οι οποίες εμπλέκονται σε έναν πολύπλοκο κύκλο ζωής: τα ταχυζώδια, τα βραδυζώδια (σε ιστικές κύστες) και τα σποροζώδια (σε ωοκύστες).

Ταχυζώδιο

Ο όρος ταχυζώδιο περιγράφει τη μορφή του παράσιτου η οποία πολλαπλασιάζεται γρήγορα (τάχυ) μέσα σε σχεδόν οποιοδήποτε κύτταρο του ενδιάμεσου ξενιστή², και σε μη-εντερικά επιθηλιακά κύτταρα του τελικού ξενιστή³ [Frenkel, 1973]. Τα ταχυζώδια έχουν διαστάσεις 3×7 μm , και έχουν σχήμα μισοφέγγαρου με μυτερό πρόσθιο άκρο (κωνοειδές), και στρογγυλεμένο οπίσθιο

² **Ενδιάμεσος ξενιστής:** ο οργανισμός στον οποίο το παράσιτο διέρχεται το προνυμφικό ή αγενές στάδιο της ζωής του.

³ **Τελικός ξενιστής:** ο οργανισμός στον οποίο το παράσιτο διέρχεται το ενήλικο ή εγγενές στάδιο της ζωής του.

άκρο (Εικόνα 1-1A, σελ. 27). Η υπερδομή του *T. gondii* περιλαμβάνει διάφορα οργανίδια και κυτταρικά έγκλειστα σωμάτια. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται το επίπαγο, οι κορυφαίοι δακτύλιοι, οι πολικοί δακτύλιοι, το κωνοειδές, οι rhoptries, τα micronemes, ο μικροπόρος, το μιτοχόνδριο, οι υπό-επίπαγοι μικροσωληνίσκοι, το αδρό και λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, το σύστημα Golgi, τα ριβοσώματα, ο πυρήνας, τα πυκνά κοκκία, τα κοκκία αμυλοπηκτίνης, και ένα οργανίδιο περιβεβλημένο από πολλές μεμβράνες το οποίο μοιάζει με πλαστίδιο, και ονομάζεται Golgi adjunct ή apicoplast. Ο πυρήνας, ο οποίος βρίσκεται συνήθως κεντρικά του κυττάρου, περιέχει μάζες χρωματίνης και ένα κεντρικό πυρηνίδιο [Dubey *et al.*, 1998].

Τα ταχυζώδια του *T. gondii* είναι ικανά να κινούνται με ομαλή κίνηση, κάμψεις, περιστροφή, και κυματοειδή κίνηση. Εντούτοις, δεν υπάρχουν φανερά οργανίδια κίνησης όπως βλέφαρα, μαστίγια, ή ψευδοπόδια [Dubey *et al.*, 1998]. Παρά το γεγονός ότι το *T. gondii* είναι ευκαρυωτικός οργανισμός και διαθέτει περιέχει μιτοχόνδρια, ριβοσώματα και σύστημα Golgi, παραμένει ένα υποχρεωτικό ενδοκυτταρικό παράσιτο, απαιτώντας ενδοκυτταρικό περιβάλλον για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του [Dubey *et al.*, 1998].

Βραδυζώδιο & Ιστική Κύστη

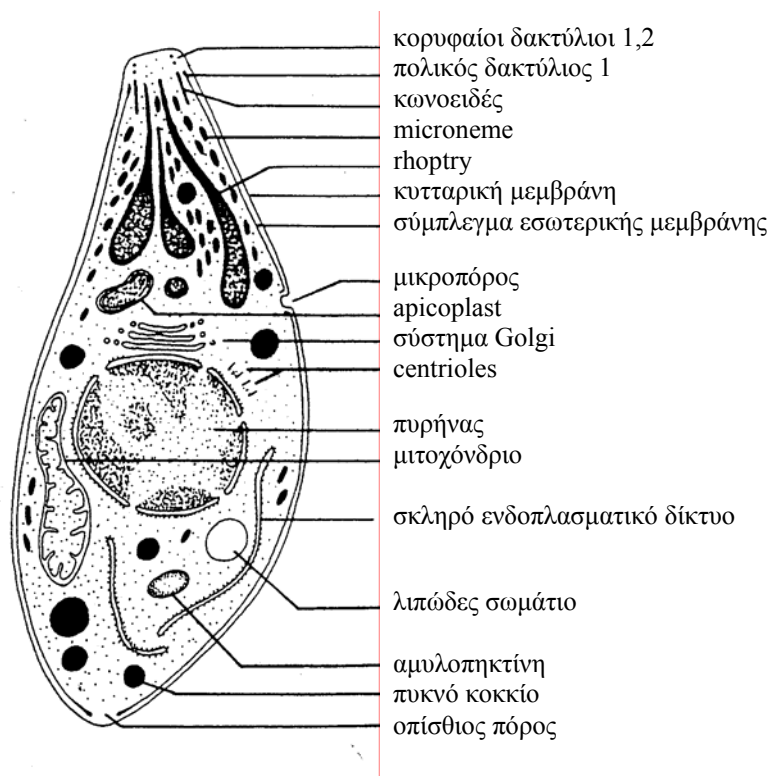
Ο όρος βραδυζώδιο χρησιμοποιείται για να περιγράψει την μορφή του παρασίτου η οποία πολλαπλασιάζεται αργά (βραδύ) μέσα σε ιστικές κύστες [Frenkel, 1973]. Η ιστική κύστη αναπτύσσεται μέσα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή, καθώς τα βραδυζώδια πολλαπλασιάζονται με ενδογένεια⁴. Το μέγεθος των ιστικών κύστεων ποικίλει από διάμετρο 5 μm σε νεαρές κύστες, οι οποίες περιέχουν μόνο δύο βραδυζώδια, μέχρι διάμετρο 70 μm σε ώριμες κύστες οι οποίες περιέχουν εκατοντάδες βραδυζώδια. Το τείχος της ιστικής κύστης είναι ελαστικό και λεπτό, και περικλείει πολυάριθμα βραδυζώδια με μορφή μισοφέγγαρου, διαστάσεων περίπου 1,5 × 7 μm. Αποτελείται από συνδυασμό υλικών του ξενιστή και του παρασίτου, και επικαλύπτεται από κοκκιώδες υλικό το οποίο γεμίζει και το κενό μεταξύ των βραδυζωιδίων [Dubey *et al.*, 1998].

⁴ **Ενδογένεια:** πολλαπλασιασμός κατά τον οποίο παράγονται δύο γόννοι από τον μητρικό οργανισμό.

Οι ιστικές κύστει στον εγκέφαλο είναι συνήθως σφαιρικές και σπάνια φτάνουν τα 70 μm σε διάμετρο (Εικόνα 1-1B, σελ. 27), ενώ οι κύστει στους σκελετικούς μύες και το μυοκάρδιο είναι επιμήκεις, με μήκος μέχρι 100 μm (Εικόνα 1-1Γ, σελ. 27).

Ωοκύστη

Οι μη σπορώδεις ωοκύστες (ζυγώτες⁵) έχουν μάλλον σφαιρικό σχήμα, με διαστάσεις περίπου 10 \times 12 μm . Δεν περιέχουν πολικά κοκκία, και το ζυγωτό σχεδόν γεμίζει την ωοκύστη. Κατά την έκκρισή τους στο περιβάλλον, οι ωοκύστες είναι μη μολυσματικές και απαιτείται σπορογονία ώστε να μετατραπούν σε μολυσματικές ωοκύστες οι οποίες είναι ελλειψοειδείς με διαστάσεις 11 \times 13 μm . Κάθε ωοκύστη περιέχει δύο ελλειψοειδείς σποροκύστες με διαστάσεις 6 \times 8 μm , ενώ κάθε σποροκύστη περιέχει 4 σποροζώδια.



Εικόνα 1-2. Σχηματική αναπαράσταση ταχυζωιδίου του *T. gondii* (αναπαραγωγή από *Dubey et al., 1998*).

⁵ **Ζυγώτης:** μη σπορώδης ωοκύστη που προκύπτει από την γονιμοποίηση των μακρογαμετών από τους μικρογαμέτες.

Η ωοκύστη περικλείεται από μία μεμβράνη. Κατά τη σπορογονία, ο πυρήνας της ωοκύστης διαιρείται δύο φορές, δίνοντας 4 πυρήνες, ενώ δημιουργείται δεύτερη μεμβράνη. Μετά τη διαίρεση του κυτταροπλάσματος, σχηματίζονται δύο σφαιρικοί σποροβλάστες ο καθένας με δύο πυρήνες (Εικόνα 1-1Δ, σελ. 27). Στη συνέχεια της σπορογονίας οι σποροβλάστες επιμηκύνονται σχηματίζοντας τις σποροκύστες με διαστάσεις $6 \times 8 \mu\text{m}$. Οι δύο εξωτερικές μεμβράνες των σποροβλαστών αποτελούν το εξωτερικό στρώμα του σποροκυστετικού τοιχώματος, και η κυτταρική μεμβράνη της κυτταροπλασματικής μάζας αποτελεί το εσωτερικό στρώμα. Τελικά δημιουργούνται 4 σποροζώδια μέσα σε κάθε σποροκύστη [Ferguson *et al.*, 1978; Dubey *et al.*, 1998].

Η σπορογονία ευνοείται από υψηλότερες θερμοκρασίες (2-3 ημέρες στους 24°C , και 14-21 ημέρες στους 11°C), αλλά δεν λαμβάνει χώρα κάτω από τους 4°C , ή πάνω από τους 37°C . Η βιωσιμότητα των ωοκύστεων παρατείνεται με την αυξημένη υγρασία, και σε υγρό χώμα μπορούν να επιβιώσουν μέχρι 18 μήνες, δημιουργώντας μία δεξαμενή για τους ενδιάμεσους ξενιστές. Σε εργαστηριακές συνθήκες, οι σπορώδεις ωοκύστες έχουν επιβιώσει στους 4°C μέχρι 54 μήνες, και στους -10°C για 106 ημέρες. Εντούτοις σκοτώνονται μέσα σε 1-2 λεπτά σε θερμοκρασία $55-60^{\circ}\text{C}$, ενώ λόγω της αδιαπερατότητάς τους είναι ανθεκτικές σε απολυμαντικά [Tenter *et al.*, 2000].

Προσκόλληση, Διείσδυση, & Ανάπτυξη

Το *T. gondii* είναι μοναδικό παράσιτο ανάμεσα στα *Apicomplexa*, για το εξαιρετικά ευρύ φάσμα ειδικότητάς του για κύτταρα και ιστούς. Είναι ικανό να διεισδύσει ενεργά και να πολλαπλασιαστεί μέσα σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα θηλαστικών [Joiner & Dubremetz, 1993], ενώ μπορεί να μολύνει εμπύρνηνα ερυθροκύτταρα πτηνών, ανώριμα ερυθροκύτταρα θηλαστικών, κυτταρικές καλλιέργειες εντόμων και ψαριών, ακόμα και φυτικούς πρωτοπλάστες [Werk, 1985].

Το αρχικό βήμα της ενεργούς διείσδυσης του *T. gondii* είναι η αναγνώριση και η προσκόλληση στο κύτταρο-ξενιστή. Κατά τη συνάντηση των δύο, το παράσιτο ελέγχει την μεμβράνη του ξενιστή για την εξεύρεση κατάλληλου σημείου διείσδυσης με τον κορυφαίο πόλο του [Wong & Remington, 1993]. Λίγα είναι γνωστά για την διαδικασία αναγνώρισης και προσκόλλησης. Εντούτοις, φαίνεται πως τα παρακάτω παίζουν σημαντικό ρόλο: (α) η λαμινίνη του παρασίτου και ο υποδοχέας λαμινίνης

του ξενιστή, (β) επιφανειακά μόρια του παρασίτου που μοιάζουν με τη λεκτίνη και (γ) η επιφανειακή μεμβράνη του παρασίτου, SAG-1 (P30) και ο γλυκοσυλωμένος υποδοχέας του ξενιστή [Kasper & Mineo, 1994].

Η διείσδυση του *T. gondii* στα κύτταρα-ξενιστές, περιλαμβάνει τα εξής μηχανικά βήματα: (α) προσκόλληση στον ξενιστή, (β) προβολή του κωνοειδούς, (γ) δημιουργία κοιλώματος στην πλασματική μεμβράνη του ξενιστή, (δ) δημιουργία κινούμενης ένωσης η οποία κινείται όπισθεν κατά μήκος του παρασίτου καθώς εισβάλλει στον ξενιστή, (ε) μερική εξωκυττάρωση των micronemes και των rhoptries και (στ) ολίσθηση του παρασίτου μέσα στο παρασιτοφόρο κενοτόπιο. Η διαδικασία της ενεργής διείσδυσης διαρκεί 15-40 δευτερόλεπτα, ένα τέταρτο του χρόνου της φαγοκυττάρωσης [Kasper & Mineo, 1994; Werk, 1985].

Το παρασιτοφόρο κενοτόπιο αποτελείται από την πλασματική μεμβράνη του ξενιστή, χωρίς τα ενδο-μεμβρανικά μόρια. Λίγα λεπτά μετά την διείσδυση, τα ταχυζωΐδια μετατρέπουν τη νεοσχηματισθείσα μεμβράνη του παρασιτοφόρου κενοτοπίου με πρωτεΐνες του παρασίτου, και στη συνέχεια σχηματίζονται πόροι οι οποίοι επιτρέπουν τη διάχυση φορτισμένων μορίων και προς τις δύο κατευθύνσεις. Συνολικά, οι μετατροπές αυτές δημιουργούν περιβάλλον φιλικό προς το *T. gondii*, επιτρέποντας τον πολλαπλασιασμό του [Werk, 1985].

Μετά την εισβολή, ακολουθεί μία μεταβλητή περίοδος πριν αρχίσει ο πολλαπλασιασμός του (lag phase). Τα ταχυζωΐδια πολλαπλασιάζονται μονογονικά μέσα στο κύτταρο-ξενιστή με επαναλαμβανόμενη ενδογένεια. Πιο σπάνια, πολλαπλασιάζονται με διχοτόμηση, ενώ το κύτταρο-ξενιστής διαρρηγνύεται όταν δεν μπορεί πλέον να στηρίξει την αύξηση των ταχυζωΐδιων. Ο ρυθμός εισβολής και αύξησης των ταχυζωΐδιων διαφέρει ανάλογα με το στέλεχος του *T. gondii* και το είδος του ξενιστή, ενώ [Dubey *et al.*, 1998].

Κύκλος Ζωής

Ο κύκλος ζωής του *T. gondii* (Εικόνα 1-3, σελ. 33) είναι δυνητικά ετερόξενος, και συμπληρώθηκε 60 χρόνια μετά από την περιγραφή του. Ενδιάμεσοι ξενιστές είναι πιθανόν όλα τα θερμόαιμα ζώα, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, ενώ τελικοί ξενιστές είναι μέλη της οικογένειας Felidae, όπως οι γάτες [Levine, 1961; 1977; Dubey & Beattie, 1988; Jackson & Hutchison, 1989; Dubey *et al.*, 1998; Dubey, 1986; 1993; Tenter, 1977; 2000; Frenkel, 2000].

Ο κύκλος ζωής του *T. gondii* αποτελείται από δύο μέρη: (α) τον αμφιγονικό κύκλο ο οποίος λαμβάνει χώρα στον τελικό ξενιστή, και (β) τον μονογονικό κύκλο ο οποίος λαμβάνει χώρα στους ενδιάμεσους ξενιστές. Πρόσφατα δεδομένα υπαινίσσονται ότι διαφορετικά στελέχη του *T. gondii* βασίζονται στους δύο κύκλους σε διαφορετικό βαθμό, και ότι ίσως τα λοιμογόνα στελέχη χρησιμοποιούν μόνο το μονογονικό κύκλο ζωής [Kasper & Mineo, 1994].

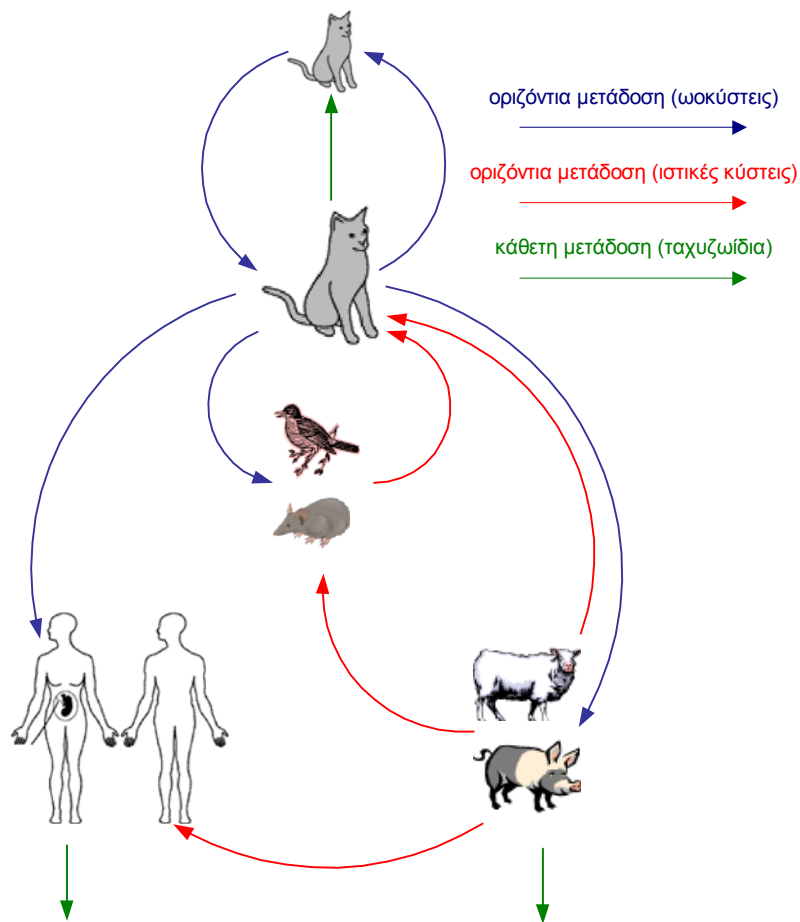
Αμφιγονικός Κύκλος Ζωής

Ο αμφιγονικός κύκλος ζωής του *T. gondii* είναι ο κλασικός κοκκιδιακός κύκλος, ο οποίος περιλαμβάνει τη γαμετογένεση, τη δημιουργία ζυγώτη, και την ανάπτυξη ωοκύστεων οι οποίες αποβάλλονται με τα κόπρανα του τελικού ξενιστή. Ο τελικός ξενιστής μολύνεται και αποβάλλει ωοκύστες μετά από κατάποση οποιασδήποτε από τις τρεις μολυσματικές μορφές του παρασίτου, δηλαδή ταχυζωιδίων, βραδυζωιδίων ή ωοκύστεων.

Μόνο ο κύκλος ο οποίος προκαλείται από την κατάποση ιστικών κύστεων έχει μελετηθεί λεπτομερώς [Dubey & Frenkel, 1972]. Μετά την κατάποση ιστικών κύστεων από τις γάτες, το κυτταρικό τους τοίχωμα διαλύεται με την επίδραση πρωτεολυτικών ενζύμων στο στομάχι και στο λεπτό έντερο. Τα απελευθερωμένα βραδυζωΐδια διαπερνούν τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου, και ξεκινά η ανάπτυξη πολυάριθμων γενεών του *T. gondii*. Ο αμφιγονικός κύκλος ξεκινά μετά την ανάπτυξη των μονογονικών αυτών σταδίων, 2 ημέρες μετά την αρχική μόλυνση, με την δημιουργία μακρογαμετοκυττάρων και μικρογαμετοκυττάρων. Η διαίρεση των μικρογαμετοκυττάρων οδηγεί στη δημιουργία μέχρι 21 μικρογαμετών οι οποίοι θα γονιμοποιήσουν τους μακρογεμέτες και θα οδηγήσουν στη δημιουργία του ζυγώτη. Μετά τη γονιμοποίηση, ένα ωοκυστικό τοίχωμα σχηματίζεται γύρω από το ζυγώτη.

Στη συνέχεια, τα μολυσμένα επιθηλιακά κύτταρα διαρρηγνύονται και οι μη-σπορώδεις ωοκύστεις ελευθερώνονται μέσα στην εντερική κοιλότητα, και τελικά εκκρίνονται στο περιβάλλον μέσω των κοπράνων του τελικού ξενιστή.

Η σπορογονία λαμβάνει χώρα έξω από τον τελικό ξενιστή, και έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη μολυσματικών ωοκύστεων. Ο τελικός ξενιστής αποβάλλει μέχρι και 10 εκατομμύρια ωοκύστεις τη μέρα, για 1–3 εβδομάδες. Τα μέλη της οικογένειας *Felidae*, αποβάλλουν ωοκύστεις στο περιβάλλον 3–10 ημέρες μετά την κατάποση βραδυζωιδίων, >18 ημέρες μετά την κατάποση ωοκύστεων, και >13 ημέρες μετά την κατάποση ταχυζωιδίων [Dubey, 1998]. Από τα παραπάνω, φαίνεται πως η κατάποση βραδυζωιδίων είναι η πιο αποτελεσματική, αφού σχεδόν όλες οι γάτες που τράφηκαν με ιστικές κύστεις απέβαλλαν ωοκύστεις, ενώ λιγότερο από το 30% των γατών που τράφηκαν με ταχυζωίδια ή ωοκύστεις απέβαλλαν ωοκύστεις [Dubey & Frenkel, 1976].



Εικόνα 1-3. Κύκλος ζωής και οδοί μετάδοσης του *T. gondii* (αναπαραγωγή από Tenter et al., 2000).

Από τη στιγμή που μία γάτα μολυνθεί, η επαναμόλυνσή της σπάνια οδηγεί σε παραγωγή ωοκύστεων [Dubey & Beattie, 1988; Jackson & Hutchison, 1989; Dubey, 1993; Evans, 1992; Dubey *et al.*, 1998].

Μονογονικός Κύκλος Ζωής

Η κατάποση ωοκύστεων και ιστικών κύστεων από τον ενδιάμεσο ξενιστή, συνοδεύεται από την απελευθέρωση των μολυσματικών μορφών του παρασίτου (σποροζωιδίων και βραδυζωιδίων, αντίστοιχα) στον εντερικό τους αυλό. Ο ενδιάμεσος ξενιστής μπορεί να μολυνθεί και από ταχυζωΐδια.

Στους ενδιάμεσους ξενιστές, το *T. gondii* ακολουθεί δύο φάσεις μονογονικής ανάπτυξης. Στην πρώτη φάση, οι μολυσματικές μορφές εισβάλλουν σε μεγάλο αριθμό διαφορετικών ειδών κυττάρων όπου πολλαπλασιάζονται με επαναλαμβανόμενη ενδογένεια, σχηματίζοντας ταχυζωΐδια, τη μονογονική μορφή του παρασίτου. Τα ταχυζωΐδια εξαπλώνονται διαρρηγνύοντας τα κύτταρα που έχουν μολύνει και εισβάλλοντας σε γειτονικά κύτταρα. Σε διάστημα 7-10 ημερών μετά τη μόλυνση, με την επίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, τα ταχυζωΐδια της τελευταίας γενιάς εισέρχονται στη δεύτερη φάση ανάπτυξης του παρασίτου, η οποία καταλήγει στην δημιουργία ιστικών κύστεων. Μέσα στις ιστικές κύστες, τα βραδυζωΐδια πολλαπλασιάζονται αργά με ενδογένεια [Dubey & Beattie, 1988; Jackson & Hutchison, 1989; Dubey, 1993; Evans, 1992; Dubey *et al.*, 1998]. Οι ιστικές κύστες σχηματίζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό σε νευρικούς και μυϊκούς ιστούς. Απαντώνται κυρίως στο ΚΝΣ, τα μάτια, τους σκελετικούς μύες και το μυοκάρδιο. Απαντώνται επίσης, σε μικρότερο ποσοστό, στα σπλάγχνα, τους πνεύμονες, το ήπαρ και τους νεφρούς [Dubey, 1993, 1998; Dubey *et al.*, 1998].

Οι ιστικές κύστες είναι το τελικό στάδιο ανάπτυξης του *T. gondii* στον ενδιάμεσο ξενιστή, και είναι άμεσα μολυσματικές μορφές. Σε κάποιους από τους ενδιάμεσους ξενιστές μπορούν να παραμείνουν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους [Warren, 1993], αλλά ο μηχανισμός της επιβίωσής τους δεν είναι γνωστός. Κάποιοι ερευνητές πιστεύουν ότι περιοδικά οι ιστικές κύστες καταρρέουν, τα βραδυζωΐδια μετατρέπονται σε ταχυζωΐδια τα οποία προσβάλλουν νέα κύτταρα και δημιουργούν πάλι βραδυζωΐδια σε καινούριες ιστικές κύστες [Dubey, 1998; Evans, 1992; Frenkel, 2000; Remington & Desmonts, 1990].

Οδοί Μετάδοσης

Τα ταχυζωΐδια, τα βραδυζωΐδια και τα σποροζωΐδια είναι μολυσματικά και για τους ενδιάμεσους και τους τελικούς ξενιστές, οι οποίοι μπορεί να μολυνθούν με μία από τις εξής οδούς (Εικόνα 1-3, σελ. 33): (α) οριζόντια μετάδοση μέσω κατάποσης μολυσματικών ωοκύστεων από το περιβάλλον, όπως από ελλειπώς πλυμένα λαχανικά, (β) οριζόντια μετάδοση μέσω κατάποσης ιστικών κύστεων οι οποίες εμπιέρονται σε ωμό ή όχι καλά μαγειρεμένο κρέας, και (γ) κάθετη μετάδοση ταχυζωΐδιων μέσω του πλακούντα. Σε κάποιους ξενιστές έχει αναφερθεί και η μετάδοση ταχυζωΐδιων μέσω μητρικού γάλακτος [Dubey & Beattie, 1988; Jackson & Hutchison, 1989; Dubey, 1991; 1993; Evans, 1992; Johnson, 1999; Remington & Desmonts, 1990; Dubey *et al.*, 1998].

Επομένως, το *T. gondii* μπορεί να μεταδοθεί από τελικό σε ενδιάμεσο ξενιστή και αντίστροφα, καθώς και μεταξύ ενδιάμεσων ξενιστών, ή μεταξύ τελικών ξενιστών.

Διαφορές Μεταξύ Στελεχών

Παρά το γεγονός ότι το *T. gondii* είναι το μοναδικό γνωστό μέχρι σήμερα είδος του γένους *Toxoplasma* [Tenter & Johnson, 1997; Dubey & Beattie, 1988; Frenkel, 2000], έχει παρατηρηθεί σημαντική διαφορά στη μολυσματικότητα των διάφορων στελεχών του σε ενδιάμεσους ξενιστές και σε ιστοκαλλιέργειες [Howe *et al.*, 1997]. Κάποια στελέχη είναι άκρως λοιμογόνα, ικανά να προκαλέσουν οξεία, και συχνά θανατηφόρο τοξοπλάσμωση, ενώ άλλα προκαλούν χρόνια λοίμωξη με τη δημιουργία ιστικών κύστεων στον εγκέφαλο και στους μυϊκούς ιστούς των μολυσμένων ξενιστών [Guo & Johnson, 1995].

Σε περίπτωση που λιγότερα από 100 ταχυζωΐδια είναι ικανά να προκαλέσουν θάνατο σε ποντίκια μετά από ενδοπεριτοναϊκό ενοφθαλμισμό σε λιγότερο από μία εβδομάδα, το στέλεχος θεωρείται λοιμογόνο. Σε περίπτωση που απαιτούνται περισσότερα από 1.000 ταχυζωΐδια για τον ίδιο σκοπό, το στέλεχος θεωρείται μη-λοιμογόνο [Dardé *et al.*, 1992; Sibley & Boothroyd, 1992].

Πιστεύεται ότι το *T. gondii* περιλαμβάνει τρεις γενεαλογικές γραμμές: Όλα τα λοιμογόνα στελέχη ανήκουν στον τύπο I. Τα στελέχη που φαίνεται να κυριαρχούν σε ασθενείς με HIV ανήκουν στον τύπο II, ενώ στον τύπο III ανήκουν στελέχη τα οποία προέρχονται κυρίως από μολύνσεις ζώων [Howe & Sibley, 1995; Howe *et al.*, 1997].

Παρά το γεγονός ότι τα στελέχη του *T. gondii* διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τη μολυσματικότητά τους, δεν υπάρχουν εμφανείς δομικές διαφορές μεταξύ τους.

Τοξοπλάσμωση

Η τοξοπλάσμωση είναι νόσος η οποία προκαλείται από το παράσιτο *T. gondii*, και επηρεάζει κυρίως δύο ομάδες ατόμων υψηλού κινδύνου: τα έμβρυα και τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα.

Η τοξοπλάσμωση διαχωρίζεται σε δύο φάσεις: την οξεία φάση η οποία αναφέρεται στη διασπορά του παράσιτου στον ξενιστή (παρασιταϊμία), και στη λανθάνουσα φάση, η οποία χαρακτηρίζεται από την διά-βίου παρουσία ιστικών κύστεων στον μολυσμένο ξενιστή. Η τοξοπλάσμωση μπορεί να χωριστεί, για ευκολία, σε τέσσερις κατηγορίες: (α) την οξεία τοξοπλάσμωση σε ανοσοεπαρκή άτομα, (β) τη συγγενή τοξοπλάσμωση (ΣΤ), (γ) την οφθαλμική τοξοπλάσμωση σε ανοσοεπαρκή άτομα, και (δ) την οξεία ή επανενεργοποιημένη τοξοπλάσμωση σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Τα συμπτώματα δεν είναι χαρακτηριστικά της τοξοπλάσμωσης σε καμία από τις παραπάνω περιπτώσεις, και επομένως πρέπει να συμπεριληφθεί εκτεταμένη διαφορική διάγνωση.

Η ΣΤ και η οξεία ή επανενεργοποιημένη τοξοπλάσμωση σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα συζητούνται εκτενέστερα στα επιμέρους κεφάλαια (Κεφάλαιο 3, Κεφάλαιο 4).

Οξεία Τοξοπλάσμωση σε Ανοσοεπαρκή Άτομα

Οι περισσότερες περιπτώσεις λοιμώξεων με *T. gondii* σε ανοσοεπαρκή άτομα είναι ασυμπτωματικές. Σποραδικά, διάφορα ήπια συμπτώματα μπορεί να παρατηρηθούν, από τα οποία η λεμφαδενοπάθεια είναι το πιο κοινό [Dubey & Beatie, 1988; Ho-Yen, 1992]. Σοβαρές εκδηλώσεις της τοξοπλάσμωσης, όπως εγκεφαλίτιδα, σηπτικό σύνδρομο/σοκ, μυοκαρδίτιδα ή ηπατίτιδα μπορούν να απαντηθούν, αλλά είναι πολύ σπάνιες σε ανοσοεπαρκή άτομα [Ho-Yen, 1992].

Η λοίμωξη με *T. gondii* θεωρείται σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας της χοριοαμφιβληστροειδίτιδας (ΧΑ) [Wilder, 1952]. Εντούτοις, η οφθαλμική τοξοπλάσμωση θεωρείται γενικά αποτέλεσμα συγγενούς λοίμωξης με *T. gondii*, η οποία εκδηλώνεται αργότερα στη ζωή [Ho-Yen, 1992; Luft, 1989]. Σήμερα,

υπάρχουν αρκετές καταγεγραμμένες περιπτώσεις στις οποίες η ανάπτυξη οφθαλμικών συμπτωμάτων όπως αμφιβληστροειδίτιδα και ΧΑ έχουν συνδεθεί με επίκτητη τοξοπλάσμωση [Masur *et al.*, 1978; Gump & Holden, 1979; Akstein *et al.*, 1982].

Συγγενής Τοξοπλάσμωση

Σε ανοσοεπαρκή άτομα, η μόλυνση από *T. gondii* συνήθως οδηγεί σε εφ'όρου ζωής ανοσία έναντι της τοξοπλάσμωσης. Επομένως, εάν η μόλυνση από *T. gondii* σε μία έγκυο γυναίκα λάβει χώρα νωρίτερα από 4–6 εβδομάδες πριν τη σύλληψη, η προστατευτική ανοσία θα πρέπει να αποτρέψει την κάθετη μετάδοση στο έμβρυο σε επόμενες εκθέσεις στο παράσιτο. Εντούτοις είναι γνωστό ότι σε ανοσοκατεσταλμένες γυναίκες με συστηματικό ερυθματώδη λύκο ή AIDS, στις οποίες προϋπήρχε λοίμωξη, έχει μεταδοθεί το *T. gondii* στα έμβρυά τους [Tenter *et al.*, 2000; Ladas *et al.*, 1999].

Εάν μία ανοσοεπαρκής γυναίκα εκτεθεί στο παράσιτο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης της, μπορεί να το μεταδώσει στο έμβρυο. Ο μηχανισμός της κάθετης μετάδοσης του *T. gondii* δεν είναι ακόμα κατανοητός. Μία πιθανότητα είναι ότι η παρασιταμία της γυναίκας οδηγεί σε εισβολή ταχυζωιδίων στον πλακούντα, όπου αυτά πολλαπλασιάζονται. Τελικά, κάποια από αυτά είναι δυνατόν να περάσουν από τον πλακούντα στην κυκλοφορία ή τους ιστούς του εμβρύου [Ebbesen, 2000; Remington & Desmonts, 1990].

Η συγγενής λοίμωξη από *T. gondii* μπορεί να προκαλέσει αποβολή, θάνατο του εμβρύου ή εμβρυικές ανωμαλίες [Remington & Desmonts, 1990; Remington *et al.*, 1995], και είναι δυνατόν να μειώσει σημαντικά την ποιότητα ζωής των παιδιών τα οποία επιβιώνουν από ΣΤ [Dubey & Beatie 1988; McLeod & Boyer, 2000].

Τα συμπτώματα της ΣΤ είναι πιο σοβαρά εάν η μόλυνση λάβει χώρα νωρίς κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, με πιο σοβαρή εκδήλωση αυτή της εγκεφαλομυελίτιδας [Remington & Desmonts, 1990; Chatterton, 1992]. Γενικά, περίπου το 10% των συγγενών λοιμώξεων οδηγούν σε αυτόματη αποβολή ή έκτρωση από επιλογή [Remington & Desmonts, 1990; Chatterton, 1992], ενώ ένα επιπλέον 10–23% παρουσιάζουν κλινικά συμπτώματα κατά τη γέννηση [Remington & Desmonts, 1990; Chatterton, 1992]. Η κλασική τριάδα ευρημάτων της ΣΤ (ΧΑ, ενδοεγκεφαλικά ασβεστώματα, υδροκεφαλία) παρουσιάζονται στο 10% των νεογνών, ενώ τα υπόλοιπα παρουσιάζουν ποικιλία συμπτωμάτων τα οποία κυμαίνονται από

συμπτώματα του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) μέχρι μη-ειδικά συμπτώματα οξείας λοίμωξης (ΧΑ, παροξυσμό, σπληνομεγαλία, ηπατομεγαλία, πυρετό, αναιμία, ίκτερο, λεμφαδενοπάθεια). Περίπου το 12–16% των νεογνών αυτών καταλήγουν, ενώ τα νεογνά που επιβιώνουν υποφέρουν από προοδευτική διανοητική καθυστέρηση ή άλλα νευρολογικά συμπτώματα [Remington & Desmonts, 1990; Dubey & Beatie, 1988].

Εάν η μόλυνση λάβει χώρα αργά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, οι επιπτώσεις στο έμβρυο είναι λιγότερο σοβαρές, με τα περισσότερα νεογνά τα οποία μολύνθηκαν στο τρίτο τρίμηνο να είναι ασυμπτωματικά κατά τη γέννηση. Συνολικά, στο 67–80% των νεογνών με ΣΤ, η λοίμωξη είναι υποκλινική. Εντούτοις, είναι δυνατόν να παρουσιάσουν κλινικά συμπτώματα αργότερα, όπως ΧΑ, στραβισμό, τύφλωση, ψυχοκινητικά συμπτώματα ή άλλα νευρολογικά συμπτώματα, παροξυσμούς, διανοητική καθυστέρηση και κώφωση [Remington & Desmonts, 1990; Chatterton, 1992]. Υπολογίζεται ότι ένα στα τρία συγγενώς μολυσμένα έμβρυα θα αναπτύξουν οφθαλμική βλάβη [Dubey & Beatie, 1988].

Τοξοπλάσμωση σε Ανοσοκατεσταλμένα Άτομα

Το *T. gondii* είναι σημαντικό ευκαιριακό παθογόνο στους ασθενείς με HIV. Σε όλο τον κόσμο, το *T. gondii* προκαλεί σοβαρή εγκεφαλίτιδα μέχρι και στο 40% των ασθενών με HIV, ενώ το 10–30% των ασθενών αυτών υποκύπτουν στη νόσο [Luft, 1989; Ho–Yen, 1992]. Σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα, μία λανθάνουσα λοίμωξη με *T. gondii* μπορεί να οδηγήσει σε αναζωπύρωση της τοξοπλάσμωσης με συμπτώματα εγκεφαλίτιδας. Η τοξοπλασμική εγκεφαλίτιδα (TE) και η διάχυτη τοξοπλάσμωση έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή διαφορετικών αιτιολογιών, όπως λέμφωμα του Hodgkin, ή ανοσοκατασταλτική θεραπεία λόγω άλλων κακοηθειών. Η διάχυτη τοξοπλάσμωση μπορεί επίσης να προκαλέσει επιπλοκές μετά από μεταμόσχευση οργάνων ή μυελού των οστών ως αποτέλεσμα είτε μεταμόσχευσης οργάνου από μολυσμένο με *T. gondii* δότη, ή ως αποτέλεσμα αναζωπύρωσης τοξοπλάσμωσης του δέκτη, λόγω χορήγησης ανοσοκατασταλτικής θεραπείας [Luft, 1989; Ho–Yen, 1992]. Παράλληλα με την αναζωπύρωση της τοξοπλάσμωσης, οι ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς διατρέχουν τον κίνδυνο οξείας μόλυνσης από *T. gondii*, η οποία συχνά παρουσιάζεται σαν πνευμονική νόσος ή διάχυτη εγκεφαλίτιδα [Luft, 1989].

Εντούτοις, με την ενεργή αντι-ική θεραπεία, ο αριθμός των περιπτώσεων τοξοπλάσμωσης του ΚΝΣ σε ασθενείς με AIDS μειώνεται σε πολλές χώρες. Επιπλέον, η αναζωπύρωση μίας λανθάνουσας λοίμωξης είναι δυνατόν να αποφευχθεί με προφυλακτική θεραπεία με trimethoprim-sulfamethoxazole [Tenter *et al.*, 2000].

Ανοσολογική Απόκριση Έναντι του T. gondii

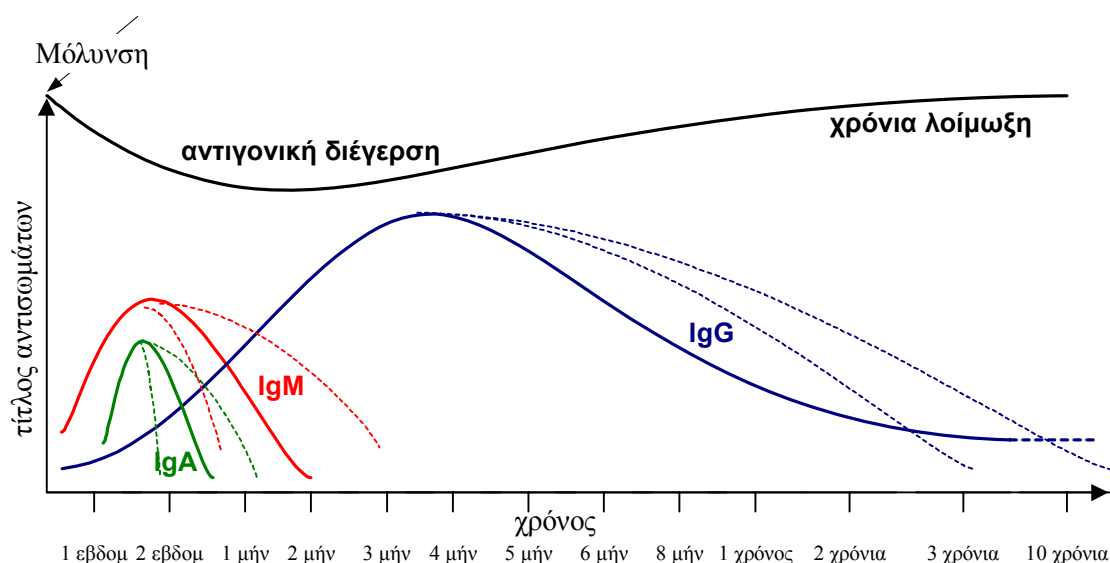
Η μόλυνση με *T. gondii* οδηγεί στη παραγωγή IgG, IgM, IgA, και IgE αντισωμάτων [Wong & Remington, 1993].

Ανοσοεπαρκή Άτομα

Σε ανοσοεπαρκή άτομα η κινητική της παραγωγής των αντισωμάτων είναι γενικά όπως περιγράφεται σχηματικά (Εικόνα 1-4, σελ. 40). Όμως, η υψηλότερη τιμή του τίτλου κάθε αντισώματος, καθώς και ο χρόνος επιμονής του, διαφέρουν από άτομο σε άτομο, και δεν μπορούν να υπολογιστούν (στην Εικόνα 1-4 το φαινόμενο αναπαρίσταται με διακεκομμένες γραμμές) [Joss, 1992]. Πρέπει να σημειωθεί ότι έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις ατόμων τα οποία διατήρησαν τα IgM αντισώματα μέχρι και 3 χρόνια [Wong & Remington, 1994; Francis & Joyson, 1993; Joss, 1992; Bobić B, Šibalić & Djurković-Djaković, 1991].

Ανοσοκατεσταλμένα Άτομα

Σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς η ανοσολογική απόκριση στο *T. gondii*, δεν είναι ακόμα σαφής. Στους ασθενείς αυτούς, η παρασιταίμια είναι συνήθως το αποτέλεσμα επανενεργοποίησης παλαιότερης μόλυνσης με *T. gondii* [Luft & Remington, 1988], η οποία μπορεί να παρουσιαστεί χωρίς αλλαγή στον τίτλο των IgG και IgM αντισωμάτων, ενώ αύξηση στον τίτλο των αντισωμάτων δεν συνδέεται πάντα με κλινική τοξοπλάσμωση [Derouin *et al.*, 1991]. Επιπλέον, ανάλυση των IgG και IgM αντισωμάτων με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης δεν έχει δείξει ειδικά πρότυπα αντιγόνων με διαγνωστική αξία.



Εικόνα 1-4. Κινητική παραγωγής αντισωμάτων μετά από μόλυνση με *T. gondii*.

Επιδημιολογία Τοξοπλάσμωσης

Η τοξοπλάσμωση είναι μία από τις πιο διαδεδομένες ζωνοσόσους⁶ στον κόσμο. Η νόσος στον άνθρωπο παρατηρήθηκε πρώτη φορά το 1939 όταν ο Sabin απέδειξε ότι απομονωμένα στελέχη του *T. gondii* από ανθρώπους και ζώα άνηκαν στο ίδιο είδος [Sabin, 1939]. Το 1948, η εισαγωγή της εξέτασης του μπλε του μεθυλενίου από τους Sabin και Feldman επέτρεψε την πραγματοποίηση οροεπιδημιολογικών μελετών σε ανθρώπους και ζώα, αποδεικνύοντας την ευρεία γεωγραφική διασπορά του *T. gondii* [Sabin & Feldman, 1948]. Έκτοτε, έχει υπολογιστεί ότι μέχρι και το ένα τρίτο του ανθρώπινου πληθυσμού έχει εκτεθεί στο παράσιτο [Tenter *et al.*, 2000]. Εντούτοις, η εκτίμηση του επιπολασμού της νόσου διαφέρει από χώρα σε χώρα, μεταξύ διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών της ίδιας χώρας, και μεταξύ διαφορετικών εθνικών ομάδων οι οποίες ζουν στην ίδια περιοχή. Τα τελευταία 30 χρόνια το *T. gondii* έχει ανιχνευτεί από 0 μέχρι στο 100% ατόμων σε διαφορετικούς πληθυσμούς [Tenter *et al.*, 2000].

Το *T. gondii* μολύνει φυτοφάγα, παμφάγα και σαρκοφάγα ζώα, συμπεριλαμβανομένων και όλων των τάξεων των θηλαστικών, ενώ τα ασπόνδυλα

⁶ **Ζωνοσόσος:** νόσος των ζώων που μπορεί να μεταδοθεί στον άνθρωπο.

κοπροφάγα όπως οι κατσαρίδες, οι μύγες, οι γαιοσκώληκες και τα σαλιγκάρια, μπορούν να λειτουργήσουν σαν παρατενικοί ξενιστές⁷ του παράσιτου [Warren, 1993]. Παρά το γεγονός ότι η διαιώνιση της τοξοπλάσμωσης μπορεί να επιτευχθεί απουσία της γάτας (συγγενής μετάδοση και κρεατοφαγία) φαίνεται ότι η παρουσία των γατών είναι πρωτογενούς σημασίας στα περισσότερα μέρη του κόσμου. Παρά το γεγονός αυτό, υψηλός επιπολασμός⁸ έχει παρατηρηθεί σε μέρη χωρίς γάτες, ενώ χαμηλός επιπολασμός έχει καταγραφεί σε περιοχές με γάτες [Beaman *et al.*, 1995].

Στους ανθρώπους, η συχνότητα οροθετικότητας αντισωμάτων έναντι του *T. gondii* αυξάνεται με την ηλικία, ενώ δεν φαίνεται να διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στα δύο φύλα [Tenter *et al.*, 2000]. Σε χώρες όπως το Ελ-Σαλβαντόρ, την Ταϊτή και τη Γαλλία η οροθετικότητα του πληθυσμού είναι πάνω από 90% κατά την τέταρτη δεκαετία της ζωής, ενώ ο αντίστοιχος αριθμός κυμαίνεται από 3–70% στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής [Tenter *et al.*, 2000]. Γενικά, η συχνότητα μόλυνσης ποικίλει, ανάλογα με την πληθυσμιακή ομάδα, και την γεωγραφική περιοχή. Η συχνότητα φαίνεται να είναι μικρότερη σε περιοχές με είτε ψυχρές ή ζεστές και άνυδρες κλιματικές συνθήκες [Tenter *et al.*, 2000].

Στον άνθρωπο το *T. gondii* μεταδίδεται μέσω της πεπτικής και της συγγενούς οδού. Η παρουσία των ιστικών κύστεων του παρασίτου στο κρέας το οποίο χρησιμοποιείται για ανθρώπινη κατανάλωση, είναι υψηλός. Στην Ευρώπη και την Αμερική το χοιρινό κρέας θεωρείται ως η κύρια πηγή μόλυνσης του ανθρώπου με *T. gondii* [Dubey, 1994]. Πρόσφατες όμως μελέτες, δείχνουν δραματική μείωση της παρουσίας του *T. gondii* σε χοίρους, πιθανώς λόγω αλλαγών στις διαδικασίες παραγωγής (Tenter *et al.*, 2000). Αντίθετα, ζώα τα οποία εκτρέφονται σε βοσκοτόπια, όπως πρόβατα και αίγες, και επομένως είναι εκτεθειμένα σε περιβάλλον πιθανώς μολυσμένο με ωοκύστες, παρουσιάζουν μεγάλα ποσοστά οροθετικότητας, μέχρι 92 και 75%, αντίστοιχα. Το παράσιτο έχει σπάνια απομονωθεί από βοδινό κρέας [Tenter *et al.*, 2000], ενώ έχει επίσης καταγραφεί υποψία μετάδοσης του παρασίτου από μη-παστεριωμένο κατσικίσιο γάλα [Sacks *et al.*, 1982], και αυγά [Jacobs & Melton, 1966]. Φαίνεται ότι η κατάποση ζωικών προϊόντων μολυσμένων με ιστικές κύστες,

⁷ **Παρατενικός ξενιστής:** ένα ζώο το οποίο δρα ως υποκατάστατο του ενδιάμεσου ξενιστή.

⁸ **Επιπολασμός:** ο συνολικός αριθμός περιπτώσεων μίας συγκεκριμένης νόσου σε ένα δεδομένο πληθυσμό σε ένα ορισμένο χρόνο.

και λαχανικών, νερού, και άλλων τροφών μολυσμένων με ωοκύστες, είναι ο κύριος τρόπος μετάδοσης του *T. gondii* στους ανθρώπους [Dubey & Beatie, 1988; Dubey, 1993]. Επιδημίες έχουν καταγραφεί σε οικογένειες και άλλες ομάδες, αλλά δεν υπάρχει απόδειξη μετάδοσης από άνθρωπο σε άνθρωπο μέσω άλλης οδού εκτός από τη συγγενή.

Ο κίνδυνος πρωτογενούς μόλυνσης μίας έγκυου γυναίκας εξαρτάται από το ρυθμό απόκτησης πρωτογενούς μόλυνσης στον συγκεκριμένο γεωγραφικό χώρο, αλλά και από τον αριθμό των ανθρώπων οι οποίοι είναι οροαρνητικοί. Ο επιπολασμός των αντισωμάτων μπορεί να ποικίλει με το χρόνο μέσα στην ίδια ομάδα, και επομένως περιοδικές μελέτες απαιτούνται για να προσδιοριστεί ο κίνδυνος μετάδοσης της ΣΤ. Σήμερα, ορο-επιπολασμός άνω του 50% σε γυναίκες οι οποίες βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία παρατηρείται σε χώρες της Δυτικής Ευρώπης (Γαλλία, Πορτογαλία, Ελβετία, Βέλγιο, Σλοβενία, Ιταλία, Αυστρία, Γερμανία), την Αφρική (Δημοκρατία της Κεντρικής Αφρικής, Νιγηρία, Καμερούν, Τόγκο), και την Κεντρική και Νότια Αμερική (Χιλή, Γουαδελούπη, Ελ-Σαλβαντόρ, Γουατεμάλα, και Παναμάς). Οι υψηλότερες συχνότητες μόλυνσης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης έχουν καταγραφεί στο Βέλγιο, την Ολλανδία, την Αυστρία, τη Γερμανία, την Τσεχοσλοβακία και τον Καναδά [Tenter *et al.*, 2000].

Η συχνότητα της ΤΕ σε ασθενείς με AIDS σχετίζεται ευθέως με τον επιπολασμό των αντισωμάτων του *T. gondii* σε έναν δεδομένο πληθυσμό και με τα στάδια της μόλυνσης με τον ιό του HIV στον πληθυσμό αυτό. Ο ορο-επιπολασμός του *T. gondii* σε ασθενείς με HIV ποικίλει από 15–40% στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, και φτάνει στο 96% σε κάποιες χώρες της Δυτικής Ευρώπης και της Αφρικής. Μέχρι και το 47% των οροθετικών για *T. gondii* ασθενών με HIV θα εκδηλώσουν ΤΕ. Επομένως, σε περιοχές με υψηλή οροθετικότητα για *T. gondii*, 25–50% των ασθενών με HIV θα εκδηλώσουν ΤΕ.

Εργαζόμενοι σε εργαστήρια έχουν μολυνθεί από αθέλητο αυτο-ενοφθαλμισμό με *T. gondii*. Το παράσιτο μπορεί να επιζήσει σε αίμα με αντιπηκτικό στους 4°C για 50 ημέρες, και μετάδοσή του έχει καταγραφεί μέσω μετάγγισης ολικού αίματος ή λευκών αιμοσφαιρίων [Dubey & Beatie, 1988; Evans, 1992; Remington & Desmonts, 1990].

Παράγοντες Κινδύνου & Προφύλαξη

Οι παράγοντες κινδύνου οι οποίοι ενέχονται στην οξεία λοίμωξη με *T. gondii* είναι η κατανάλωση όχι καλά μαγειρεμένου κρέατος (αρνί, μοσχάρι, κυνήγι, ή άλλα) (30–63%), επαφή με χώμα (6–17%), και ταξίδια εκτός Ευρώπης, Η.Π.Α, και Καναδά [Cook *et al.*, 2000]. Κάποιες άλλες έρευνες καταγράφουν ότι το αρνί, η αίγα, ο χοίρος και το κυνήγι, είναι συχνότερα μολυσμένα, από ό, τι το μοσχάρι και τα κοτόπουλα [Dubey, 1996; Dubey, 1988; Desmonts *et al.*, 1965; Smith, 1991]. Ο κίνδυνος μόλυνσης από κατανάλωση κρέατος εξαρτάται κι από άλλους παράγοντες, όπως η ηλικία του ζώου, ο χρόνος παραμονής του ζώου σε εσωτερικούς χώρους, και οι συνθήκες υγιεινής στις φάρμες [Dubey, 1996]. Επιπλέον, οι μη-σκελετικοί ιστοί (καρδιά, διάφραγμα και γλώσσα) περιέχουν μεγαλύτερη πυκνότητα κύστεων από τον σκελετικό ιστό [Dubey & Thulliez, 1993; Dubey, 1988]. Επίσης, η κατανάλωση κρεάτων τα οποία έχουν καταψυχθεί, δεν προβάλλει ιδιαίτερο κίνδυνο, καθώς η κατάψυξη σκοτώνει τις περισσότερες ιστικές κύστες [Dubey, 1988]. Η κατανάλωση επεξεργασμένων κρεάτων (π.χ. σαλάμι) είναι πιθανώς επικίνδυνη, καθώς η επεξεργασία αυτή δεν σκοτώνει τις κύστες [Lunden & Uggla, 1992].

Η έγκυος γυναίκα και ο ανοσοκατεσταλμένος ασθενής θα πρέπει να αποφεύγουν την κατανάλωση όχι καλά μαγειρεμένου κρέατος πάσης φύσης, καθώς και επεξεργασμένου κρέατος όπως λουκάνικα, σαλάμι, και καπνιστά. Τα ωμά κρέατα θα πρέπει να φυλάσσονται χαμηλά στο ψυγείο, έτσι ώστε να αποφεύγεται η πιθανότητα επιμόλυνσης άλλων τροφίμων από σταγόνες αίματος. Τα φρούτα και τα λαχανικά τα οποία καταναλώνονται ωμά, θα πρέπει να πλένονται σχολαστικά. Θα πρέπει να αποφεύγονται οι αγροτικές εργασίες, ή εργασίες που περιλαμβάνουν επαφή με χώμα. Θα πρέπει να τηρούνται πολύ καλές συνθήκες υγιεινής, κυρίως σε ό, τι αφορά στην υγιεινή των χεριών.

Η επαφή με γάτες, περιττώματα γατών, νεογνά γάτας, ή γάτες οι οποίες κυνηγούν την τροφή τους, δεν φαίνεται να είναι σοβαρός παράγοντας επικινδυνότητας, αφού η μολυσμένη γάτα παράγει ωοκύστες για λίγες μόνο εβδομάδες μετά τη μόλυνσή της [Cook *et al.*, 2000]. Παρ'όλα αυτά, εάν υπάρχει γάτα στο σπίτι, θα πρέπει να τρέφεται με καλά μαγειρεμένο φαγητό, και να αλλάζεται το δοχείο άμμου της καθημερινά, κατά προτίμηση, όχι από την εγκυμονούσα ή τον ανοσοκατεσταλμένο ασθενή.

Παρά το γεγονός ότι η ενημέρωση σε θέματα υγιεινής θα έπρεπε να θεωρείται δικαίωμα [Department of Health, 1991], οι περισσότερες μαιευτικές και γυναικολογικές κλινικές δεν έχουν πολιτική ενημέρωσης για την τοξοπλάσμωση [Ho-Yen *et al.*, 1995; Newton & Hall, 1994; Asbury, 1994]. Εκεί όπου προσφέρεται, η πληροφόρηση είναι συχνά ελλιπής [Newton & Hall, 1995; Ho-Yen *et al.*, 1995] και η άγνοια ακόμα και σε γυναίκες οι οποίες δουλεύουν σε κέντρα τα οποία προσφέρουν προγεννητικό έλεγχο είναι μεγάλη [Carme & Tirard-Fleury, 1996]. Σε μία έρευνα στη Γαλλία, μόνο οι μισές γυναίκες γνώριζαν περισσότερο από έναν παράγοντα επικινδυνότητας για μόλυνση από *T. gondii*, ενώ το 11 % δεν γνώριζε κανέναν [Wallon *et al.*, 1994].

Η στρατηγική προώθησης πρακτικών υγιεινής θα πρέπει να βασίζεται και σε παράγοντες οι οποίοι αφορούν στην συμπεριφορά των γυναικών και των ανοσοκατεσταλμένων ασθενών. Η πληροφόρηση από κλινικούς γιατρούς, ομάδες ενημέρωσης, ή από τα μέσα μαζικής ενημέρωσης, μπορεί να είναι πιο αποτελεσματική από το έγγραφο υλικό.

Η Τοξοπλάσμωση στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα, έχουν πραγματοποιηθεί λίγες μελέτες σχετικά με το *T. gondii* και την τοξοπλάσμωση. Αν εξετάσει κανείς τα δεδομένα των ερευνών οι οποίες έχουν ήδη πραγματοποιηθεί και περιγράφονται εδώ, συμπεραίνει πως περισσότερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην Ελλάδα στη συγκεκριμένη ζωνόσο, αφού καθίσταται σαφές ότι επηρρεάζει σε υψηλό βαθμό τον πληθυσμό της χώρας. Ο συσχετισμός των δεδομένων τα οποία παρατίθενται εδώ, με έρευνες οι οποίες έχουν πραγματοποιηθεί στην Ευρώπη και ανά τον κόσμο, αναλύονται στα επιμέρους κεφάλαια τα οποία ακολουθούν.

Το 1990, πραγματοποιήθηκε μελέτη σε 270 εγκύους και 86 γυναίκες με πρόσφατη αποβολή, στην περιοχή της Πάτρας [Decavalas *et al.*, 1990]. Το ποσοστό της οροθετικότητας έναντι του *T. gondii* βρέθηκε παρόμοιο και στις δύο ομάδες (51%). Το ποσοστό της οροθετικότητας ήτανε υψηλότερο ανάμεσα στις γυναίκες που ζούσαν στην ύπαιθρο, και ανάμεσα στις γυναίκες που ανέφεραν ότι είχαν γάτα στο σπίτι τους, ή γύρω από αυτό. Κατά την περίοδο 1991–1995 μελετήθηκε η οροθετικότητα γυναικών σε ηλικία αναπαραγωγής, και βρέθηκε 30% από 1.242

δείγματα τα οποία εξετάστηκαν [Gatoroulou *et al.*, 1997]. Παρόμοια έρευνα έδειξε οροθετικότητα 37% ανάμεσα σε γυναίκες σε ηλικία αναπαραγωγής από 914 δείγματα, ενώ καταγράφηκε ποσοστό 0,6% οξείας τοξοπλάσμωσης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης [Lolis *et al.*, 1996]. Εξέταση 93 γυναικών οι οποίες είχαν ορομετατροπή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης τους, έδειξε απόδειξη κάθετης μετάδοσης του *T. gondii* στο 19,4% των γυναικών [Antsaklis *et al.*, 2003].

Στη βόρεια Ελλάδα εξετάστηκαν παιδιά τα οποία είχαν εισαχθεί στο νοσοκομείο για διάφορους λόγους, και βρέθηκε ότι το 11,1% αυτών ήταν οροθετικά στο *T. gondii* [Frydas *et al.*, 2000]. Σε παλαιότερη μελέτη, βρέθηκε ότι το 42% των παιδιών με λεμφαδενοπάθεια είχαν οξεία λοίμωξη από *T. gondii* [Thomaidis *et al.*, 1977].

Στην Κρήτη, διερευνήθηκε το 1985 και το 1987, η οροθετικότητα στο *T. gondii* 419 κατοίκων δύο χωριών, του Τυμπακίου (αγρότες) και των Ανωγείων (κτηνοτρόφοι). Η οροθετικότητα των κατοίκων βρέθηκε 45% στο Τυμπάκι, και 33% στα Ανώγεια. Το Τυμπάκι είχε σαφώς μεγαλύτερη συχνότητα μόλυνσης από τα Ανώγεια, οι άντρες είχαν μεγαλύτερη συχνότητα μόλυνσης από τις γυναίκες, και οι ενήλικες μεγαλύτερη συχνότητα μόλυνσης από τα παιδιά [Antonίου *et al.*, 1995; 2002]. Σε μελέτη στο γενικό πληθυσμό της Αιτωλοακαρνανίας και της Φωκίδας, βρέθηκε οροθετικότητα 32,2% [Charvalos *et al.*, 1995]. Έχουν επίσης πραγματοποιηθεί τρεις επιπλέον μελέτες για την τοξοπλάσμωση οι οποίες δεν κατέστη δυνατόν να αποκτηθούν ούτε υπήρχε διαθέσιμη περίληψη [Mercier *et al.*, 1961; Mercier & Pangalos, 1956; Fulton *et al.*, 1966].

Λίγες μελέτες έχουν γίνει και για την οροθετικότητα των ζώων στην τοξοπλάσμωση. Η οροθετικότητα των σκυλιών έχει βρεθεί σε διαφορετικές περιοχές από 21,2–30,8% [Chambouris *et al.*, 1989]. Το 40% των βοοειδών βρέθηκε οροθετικό [Kritsepi-Konstantinou, 1992]. Στην Κρήτη, το 14–21,3% των αιγών και το 23–27,6% των προβάτων ήταν οροθετικά [Stefanakis & Bizake, 1993; Stefanakis *et al.*, 1995].

Κεφάλαιο 2

Ανάπτυξη Τεχνικών για Ανίχνευση του *T. gondii* και Διάγνωση Τοξοπλάσμωσης

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται οι τεχνικές οι οποίες αναπτύχθηκαν ή προσαρμόστηκαν για την ανίχνευση του *T. gondii* και τη διάγνωση της τοξοπλάσμωσης. Παρουσιάζεται η μεθοδολογία η οποία ακολουθήθηκε και τα συμπεράσματα τα οποία εξήχθηκαν. Η χρησιμότητά τους στην ανίχνευση του *T. gondii* σε πραγματικά βιολογικά υλικά παρουσιάζεται στα αντίστοιχα κεφάλαια.

PCR

Εισαγωγή

Η PCR είναι μία τεχνική με την οποία επιτυγχάνεται ο πολλαπλασιασμός μίας επιλεγμένης περιοχής του υπό-διερεύνηση DNA με τη χρήση δύο ή περισσότερων ολιγονουκλεοτιδικών⁹ εναρκτών¹⁰ (primers).

Το πρώτο μέρος της ερευνητικής μελέτης επικεντρώθηκε στην ανάπτυξη και προσαρμογή της τεχνικής της PCR για την ανίχνευση του *T. gondii* σε διάφορα βιολογικά υλικά. Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκε η ικανότητα μίας τροποποιημένης αντίδρασης PCR, βασισμένη στην αλληλουχία του γονιδίου B1, της deoxyuridine triphosphate–uracil DNA glycosylase PCR (dUTP–UDG PCR), να ανιχνεύσει το *T. gondii* σε πειραματικά μολυσμένα δείγματα αίματος, αμνιακού υγρού, ούρων, πλακούντα, ιστού, εγκεφάλου ποντικών, και κοπράνων γάτας. Με την τεχνική αυτή, καθίσταται δυνατή η εξάλειψη επιμόλυνσης από μεταφορά από προϋπάρχοντα προϊόντα PCR τα οποία μπορεί να επιμολύνουν υλικά, πάγκους, κλπ. Στα καινούρια προϊόντα PCR εισάγεται U στη θέση της T, και σε περίπτωση που αυτά επιμολύνουν επερχόμενες PCR, καταστρέφονται από το ένζυμο UDG, το οποίο αδρανοποιείται πριν

⁹ **Ολιγονουκλεοτίδιο:** συνθετική αλληλουχία νουκλεοτιδίων.

¹⁰ **Εναρκτήης:** ολιγονουκλεοτίδιο με αλληλουχία συμπληρωματική με συγκεκριμένη περιοχή του υπό ανίχνευση γονιδίου.

αρχίσει και πάλι ο πολλαπλασιασμός του καινούριου μη-επιμολυσμένου DNA με PCR.

Μεθοδολογία

Επιλογή Γονιδίου & Σχεδιασμός Εναρκτών

Η επιλογή του γονιδίου το οποίο θα ήταν κατάλληλο για τη διάγνωση της τοξοπλάσμωσης θα έπρεπε να πληροί ορισμένα κριτήρια: (α) να απαντάται σε αρκετές επαναλήψεις στο γονιδίωμα του *T. gondii* ώστε να αυξάνεται η ευαισθησία της τεχνικής, και (β) το επιλεγμένο γονίδιο να απαντάται σε όλα τα γνωστά στελέχη του *T. gondii*, ώστε να αυξάνεται η ειδικότητα της τεχνικής.

1	GAATTCGTTT	GACAGAAAGG	GAGCAAGAGT	TGGGACTAAA	TCGAAGCTGA	
51	GATGCTCAAA	GTCGACCGCG	AGATGCACCC	GCAGAAGAAG	GGCTGACTCG	
101	AACCAGATGT	GCTAAAGGCG	TCATTGCTGT	TCTGTCTTAT	CGCAACGGAG	
151	TTCTTCCCAG	ACGTGGATT	CCGTTGGTTC	CGCCTCCTTC	GTCCGTCTGA	
201	ATATCAGCGG	TTCTGTTCTG	TTCGCTGTCT	GTCTAGGGCA	CCCTTACTGC	
251	AAGAGAAGTA	TTTGAGGTCA	TATCGTCCCA	TGAAGTCCGAC	CACCTGTTTC	
301	CTCTCTTCAC	TGTCACGTAC	GACATCGCAT	TCAAGGGAAG	AGATCCAGCA	
351	GATCTCGTTC	GTGTATTCGA	GACAAGAGAG	GTCCGCCCCC	ACAAGACGGC	
401	TGAAGAATGC	AACATCTTTG	TGCTGCCTCC	TCTCATGGCA	AATGCCAGAA	
451	GAAGGGTACG	TGTTCATCA	TAACAAGAGC	TGTATTTCCC	GCTGGCAAAAT	
501	ACAGGTGAAA	TGTACCTCCA	GAAAAGCCAC	CTAGTATCGT	GCGCAATGT	
551	GCCACCTCGC	CTCTTGGGAG	AAAAAGAGGA	AGAGACGCTG	CCGCTGTTTT	
601	GCAAATGAAA	AGGATTCATT	TTCGCAGTAC	ACCAGGAGTT	GGATTTTGTA	
651	GAGCCTCTCT	CTTCAAGCAG	CGTATTGTCTG	AGTAGATCAG	AAATGAACTG	B1-1
701	GATCCGTTCA	TGAGTATAAG	AAAAAAATGT	GGGAATGAAA	GAGACGCTAA	
751	TGTGTTTGCA	TAGGTTGCAG	TCACTGACGA	GCTCCCCCTCT	GCTGGCGAAA	
801	AGTGAAATTC	ATGAGTATCT	GTGCAACTTT	GGTGTATTTCG	CAGATTGGTC	
851	GCCTGCAATC	GATAGTTGAC	CACGAACGCT	TTAAGGACA	GGAGAAGAAG	B1-4
901	ATCGTGAAAAG	AATACGAGAA	GAAGTACACA	GAGATAGAAG	TCCGTGCGGA	
951	GACAGCGAAG	ACTGCGGATG	ACTTCACTCC	CGTCCGACCA	GCAGCAGAGG	TGB11
1001	AGTGCCGGGC	AAGAAAATGA	GATGCCTAGA	GGAGACACAG	CGTGTATGA	
1051	ACAAATCTAT	TGAGGTTTCG	CGAAGAGGAG	GGAACATATT	ATATACAGAA	
1101	GAAGAACAAG	AGACGTGCCG	CATGTCGFTA	AGCCATCGGA	AGGGATGCTC	
1151	AGAAAATGCG	ACAGTATCAC	ATTACAGTTC	CGTTGATTTCG	TCTGATGGTG	
1201	ACGAAAGGGG	AAGAATAGTT	GTCGCACCAA	AACTGGCTAG	TGTATTATTT	
1251	GAAGAAGNCG	AGAGATGGAG	TGAACCACCA	AAAATCGGAG	AAAATCGATG	
1301	GTGTACGTTT	TTTTGTGAGA	CTTCACTTTG	TGCAGAAGCA	TTGCCCGTCC	
1351	AAACTGCAAC	AACTGCTCTA	GCGTGTTCGT	CTCCATTCCG	TACAGTCTTC	TGB12
1401	AAAAATACAA	AAGAGAACAT	TCCAGCAACT	TCTGCCTTTG	TTCTTTTAGC	
1451	CTCAATAGCA	GGATGACGCC	NCCCTCCTAT	CTTTGAGCCA	ACCCAGCAAA	
1501	CACCGACGAA	CTCTCTGTAG	AGTAACAAG	AGAAGGCCAA	ACGCGCCATC	
1551	ACGAACACTC	GCAGAGATGA	TACAGAGACG	TGTCATCAGG	ACAAGGTTGG	
1601	TCCGTTAATT	TTCTGTATAT	AGCATTTTTA	GAATGCACCT	TTCGGACCTC	
1651	AACAACCCGTG	CAAAAAGGATC	GCCACCTGGT	GTCTCTTCAA	GCCTCAAAAAC	
1701	GAACATCTCTG	TATATCTCTC	AAGGAGGACT	GGCAACCTGG	TGTCGACAAC	
1751	AGAACAGCTG	CAGTCCGGAA	ATAGAAAGCC	ATGAGGCACT	CCAACGGGCG	
1801	AGTAGCACCT	GAGGAGATAC	AAACTGCTAA	ACGGTCCGGG	TGAAACAATA	
1851	GAGAGTACTG	GAACGTCCGC	GCTACTGCC	AGTTGTCTATG	CCATCGACGT	
1901	AGACCCAGAA	ATGAGGCGAG	AAATTAATAT	TGTTAGTAAA	GCATTCAAAA	
1951	AGTTCCGGTC	GAGAGGCTAA	ACCACAAAAG	TGCAAAACCAT	GCGCAGCCAT	
2001	CACGTTAACA	AAAGCNGTTG	GTGATGGTTG	CCTCGAGTTC	CTTCTGAAAA	
2051	TGGATTACTT	CATCAACGAG	CCCACCACGC	AGAATCATGC	TTTCCCAAGT	
2101	CTAAAGCGTT	TCTAAAGTAG	CCGCACAATG	CGGAATGCTA	AGGGGATCCG	
2151	CTACGTAGCA	CATGTTGTGC	CTCACCCCCC	AGCTCGTGCG	CTCATTTCTC	
2201	TTTCGTGCGC	GGCTGAATTC				

Εικόνα 2-1. Γονίδιο B1 του *T. gondii*. Με διαφορετικά χρώματα σημειώνονται η περιοχή πολλαπλασιασμού και οι εναρκτές που χρησιμοποιήθηκαν.

Το γονίδιο το οποίο επιλέχθηκε ήταν το *B1* γονίδιο του *T. gondii* (Εικόνα 2-1, σελ. 48), το οποίο απαντάται σε 35 επαναλήψεις στο γονιδίωμα του *T. gondii* [Burg *et al* 1989] και απαντάται σε όλα τα γνωστά στελέχη του *T. gondii* [Burg *et al.*, 1989; Grover *et al.*, 1990; Hohlfield *et al.*, 1994].

Μετά την επιλογή του γονιδίου, ο σχεδιασμός των εναρκτών έγινε με βάση συγκεκριμένα κριτήρια: (α) να μην δημιουργούν δευτεροταγείς δομές αναδιπλούμενοι με τον εαυτό τους λόγω συμπληρωματικών βάσεων στο εσωτερικό τους, (β) να μην δημιουργούν διμερή λόγω περιοχών συμπληρωματικότητας μεταξύ τους, και (γ) η αλληλουχία τους να είναι συμπληρωματική μόνο στο γονίδιο *B1*, και στη συγκεκριμένη επιλεγμένη περιοχή, όλων των γνωστών στελεχών του *T. gondii*, και σε καμία άλλη περιοχή DNA άλλου οργανισμού (ειδικότητα).

Το ηλεκτρονικό πρόγραμμα Oligo χρησιμοποιήθηκε για τον σχεδιασμό των εναρκτών, με το οποίο δοκιμάστηκε μεγάλος αριθμός ζευγών εναρκτών για την πιθανότητα να πληρούν τα δύο πρώτα κριτήρια. Τα ζεύγη τα οποία πληρούσαν τα κριτήρια, εισήχθησαν στη βάση δεδομένων BLAST του National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), για να διαπιστωθεί εάν είναι συμπληρωματικά μόνο με το γονίδιο *B1* του *T. gondii*, ή εάν αναγνωρίζουν και γονιδιώματα άλλων οργανισμών. Οι εναρκτές οι οποίοι επιλέχθηκαν τελικά ήταν οι TGB11 (5'-AGC GAA GAC TGC GGA TGA CT-3') και TGB12 (5'-GAA TGG AGA CGA ACA CGC TA-3') (Εικόνα 2-1, σελ. 48, μπλέ χρώμα).

Σαν επιβεβαίωση του έγκυρου αποτελέσματος της προτεινόμενης τεχνικής, χρησιμοποιήθηκε ζεύγος εναρκτών με πολλές βιβλιογραφικές αναφορές [Burg *et al*, 1989]. Συγκεκριμένα, οι εναρκτές *B1-1* (5'-GGA ACT GCA TCC GTT CAT GAG-3') και *B1-4* (5'-TCT TAA AAG CGT TCG TGG TC-3') (Εικόνα 2-1, σελ. 48, πράσινο χρώμα).

Παράγοντες Βελτιστοποίησης

Η τεχνική της PCR, βελτιστοποιήθηκε για βιολογικά δείγματα περιφερικού αίματος, ούρων, αμνιακού υγρού, πλακούντα, υλικού βιοψίας, εγκεφάλου ποντικών, και κοπράνων γάτας. Οι παράγοντες οι οποίοι βελτιστοποιήθηκαν ήταν οι εξής: (α) οι απαιτούμενες συγκεντρώσεις των συστατικών της αντίδρασης, (β) οι συνθήκες κυκλοποίησης, (γ) ο αριθμός των ανιχνεύσιμων παρασίτων (ευαισθησία), και (δ) η ικανότητα ανίχνευσης του γονιδίου *B1* σε στελέχη του *T. gondii*, και όχι DNA άλλων

οργανισμών (ειδικότητα).

Οι δύο πρώτοι παράγοντες βελτιστοποιήθηκαν εμπειρικά με σειρά δοκιμασιών και αλλαγή ενός παράγοντα της αντίδρασης κάθε φορά. Τα δείγματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία αυτή ήτανε πρότυπα βιολογικά δείγματα.

Παρασκευή Πρότυπων Βιολογικών Δειγμάτων

Συλλέχθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος, αμνιακού υγρού, πλακούντα, κοπράνων γάτας και εγκεφάλων ποντικών από άτομα ή ζώα οροαρνητικά για τοξοπλάσμωση. Τα λευκά αιμοσφαίρια διαχωρίστηκαν από ολικό αίμα διατηρημένο σε αντιπηκτικό EDTA, με διαφορεική φυγοκέντρηση (παράρτημα 1.1.1, σελ. 153). Τα δείγματα αμνιακού υγρού φυγοκεντρήθηκαν για συλλογή των κυττάρων (παράρτημα 1.1.2, σελ. 154). Τα δείγματα πλακούντα πολτοποιήθηκαν και υποβλήθηκαν σε θρυψινοποίηση και διηθήσεις (παράρτημα 1.1.3, σελ. 154), τα δείγματα εγκεφάλων ομογενοποιήθηκαν (παράρτημα 1.1.5, σελ. 155), και τα δείγματα κοπράνων γάτας διαχωρίστηκαν με διαφορεική φυγοκέντρηση σε ZnSO₄ (παράρτημα 1.1.4, σελ. 155). Στη συνέχεια τα δείγματα χωρίστηκαν σε ισόποσα μέρη του 1 ml, έτσι ώστε το κάθε ένα να περιέχει υλικό που απομονώθηκε από 2 ml αίματος, 10 ml ούρων, 5 ml αμνιακού υγρού, 3–4 κομματιών (4 × 1 cm³) πλακούντα, ολόκληρου του εγκεφάλου ποντικίου, και 2 κομματιών (4 × 1 cm³) κοπράνων γάτας.

Ζωντανά ταχυζώδια *T. gondii* του στελέχους RH (ευγενική προσφορά του S. L. Croft, London School of Hygiene and Tropical Medicine, M. Βρετανία), και ιστικές κύστες του στελέχους BOU (ευγενική προσφορά της M. L. Dardé, Laboratoire de Parasitologie, Limoges, Γαλλία) χρησιμοποιήθηκαν για τον ενοφθαλμισμό των πρότυπων βιολογικών δειγμάτων. Τα ταχυζώδια RH καλλιεργήθηκαν σε ινοβλάστες MRC-5 (παράρτημα 1.2.3, σελ. 157), διαχωρίστηκαν από τους ξενιστές τους με φιλτράρισμα [Dahl & Johnson, 1983] (παράρτημα 1.2.4, σελ. 157), και μετρήθηκαν με τη χρήση κυτταρομετρικής πλάκας (παράρτημα 1.2.5, σελ. 158). Οι ιστικές κύστες αναπτύχθηκαν σε ποντίκια balb/c, και μετρήθηκαν με τον ίδιο τρόπο (παράρτημα 1.3.1, σελ. 160).

Τα πρότυπα δείγματα αίματος, αμνιακού υγρού, πλακούντα, και κοπράνων γάτας, ενοφθαλμίστηκαν με ταχυζώδια *T. gondii* RH, έτσι ώστε να περιέχουν 0, 1, 2, 5, 10, και 100 παράσιτα ανά 5 μl δείγματος. Τα πρότυπα δείγματα τα οποία περιείχαν

1 παράσιτο αραιώθηκαν 1:1 με H₂O μετά την εκχύλιση του DNA, έτσι ώστε να προκύψει δείγμα το οποίο, θεωρητικά, περιείχε μισό παράσιτο. Τα πρότυπα δείγματα εγκεφάλων ποντικών μολύνθηκαν με ιστικές κύστες *T. gondii* BOU, έτσι ώστε τα τελικά δείγματα να περιέχουν 0, 1, 2, 5, 10, και 100 ιστικές κύστες ανά 5 μl δείγματος.

Προσδιορισμός Ευαισθησίας & Ειδικότητας

Τα πρότυπα βιολογικά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας της προτεινόμενης τεχνικής. Για τον προσδιορισμό της ειδικότητας της PCR στην ανίχνευση του B1 γονιδίου σε περισσότερα από ένα στελέχη του *T. gondii*, χρησιμοποιήθηκαν καλλιεργημένοι ταχυζώιτες του στελέχους RH, και ιστικές κύστες των χρόνιων στελεχών BOU, LGE94–2, PERR, PSP–19, και NED (ευγενική προσφορά της M. L. Dardé, Laboratoire de Parasitologie, Limoges, Γαλλία), οι οποίες περιέχονταν σε εγκεφάλους μολυσμένων balb/c ποντικών. Για να επιβεβαιωθεί η ειδικότητα των επιλεγμένων εναρκτών για το *T. gondii*, χρησιμοποιήθηκαν συνηθισμένοι παθογόνοι για τον άνθρωπο μικροοργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων ειδών των *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Eschericia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Xanthomonas*, καθώς και το πρωτοζωικό παράσιτο *Leishmania*. Τα δείγματα των οργανισμών αυτών ελήφθησαν από ανεπτυγμένες καλλιέργειες, υποβλήθηκαν σε 3 πλύσεις με phosphate buffered saline (PBS). Στη συνέχεια προστέθηκαν 500 μl H₂O στα τελικά ιζήματα, και τα εναιωρήματα υποβλήθηκαν σε βρασμό για 15 λεπτά. Τα τελικά παρασκευάσματα χρησιμοποιήθηκαν για PCR, με την τεχνική η οποία εφαρμόστηκε για τα υπόλοιπα δείγματα.

Εκχύλιση DNA

Εξετάστηκαν τρεις μέθοδοι από τα πρότυπα βιολογικά δείγματα για εκχύλιση του DNA με σκοπό την επιλογή της καταλληλότερης (παράρτημα 1.5.1, σελ. 163–165): (α) υποβολή σε 3 κύκλους βρασμού και ψύξης στους –80°C, (β) εφαρμογή Qiamp blood extraction kit για τα δείγματα αίματος, αμνιακού υγρού και του Qiamp DNA extraction kit για τα δείγματα εγκεφάλων ποντικών, πλακούντα, και κοπράνων γάτας, και (γ) η μέθοδος φαινόλης–χλωροφορμίου.

Θερμικός Πολλαπλασιασμός

Η βέλτιστες συγκεντρώσεις των αντιδράσεων για τον πολλαπλασιασμό του DNA του *T. gondii* στα πρότυπα βιολογικά δείγματα προσδιορίστηκαν σε εκτέλεση των αντιδράσεων σε τελικό όγκο αντίδρασης 50 μ l, ο οποίος περιείχε: 1,5 U ενζύμου Taq DNA πολυμεράσης, 1X διαλύματος PCR, 3 mM MgCl₂, 0,2 mM από το καθένα από τα dA, dC, dG, 0,4 mM dU, 0,4 μ M από κάθε εναρκτή (TGB11, TGB12), και 1 U ενζύμου UDG. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε μηχανή PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, USA) και οι βέλτιστες συνθήκες ήταν: αρχική επώαση των αντιδράσεων στους 37°C για 10 λεπτά, ακολουθούμενη από επώαση στους 95°C για 10 λεπτά, επιτρέποντας για τη δράση και απενεργοποίηση του ενζύμου UDG, αντίστοιχα [Thornton *et al.*, 1992; Longo *et al.*, 1990]. Στη συνέχεια, πραγματοποίηση 40 κύκλων πολλαπλασιασμού, ο καθένας από τους οποίους αποτελείται από θερμική μετουσίωση του DNA για 30 δεύτερα στους 94°C, προσαρμογή των εναρκτών για 30 δεύτερα στους 57°C, και επιμήκυνση των εναρκτών για 1 λεπτό στους 72°C. Η τελική επιμήκυνση των εναρκτών έγινε στους 72°C για 8 λεπτά (παράρτημα 1.5.2, σελ. 165). Το αναμενόμενο προϊόν ήταν 434 bp. Μετά την κυκλοποίηση των αντιδράσεων, 20 μ l από κάθε προϊόν (με προσθήκη 2-3 μ l PCR loading dye, Orange G) αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης πυκνότητας 2%, και τα προϊόντα απεικονίστηκαν με ψηφιακή φωτογραφική κάμερα.

Οι εναρκτές B1-1 και B1-4 χρησιμοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία [Burg *et al.*, 1989] (παράρτημα 1.5.2, σελ. 165). Το αναμενόμενο προϊόν ήταν 202 bp.

Μάρτυρες¹¹

Σε κάθε σειρά αντιδράσεων για την βελτιστοποίηση της PCR, χρησιμοποιήθηκε ένας αρνητικός μάρτυρας ο οποίος αποτελούνταν από μη μολυσμένα πρότυπα δείγματα. Η χρήση του αρνητικού μάρτυρα κρίνεται απαραίτητη για την ανίχνευση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων λόγω επιμόλυνσης από διασταύρωση μεταξύ δειγμάτων, και επιμόλυνσης από μεταφορά προϊόντων προηγούμενων αντιδράσεων.

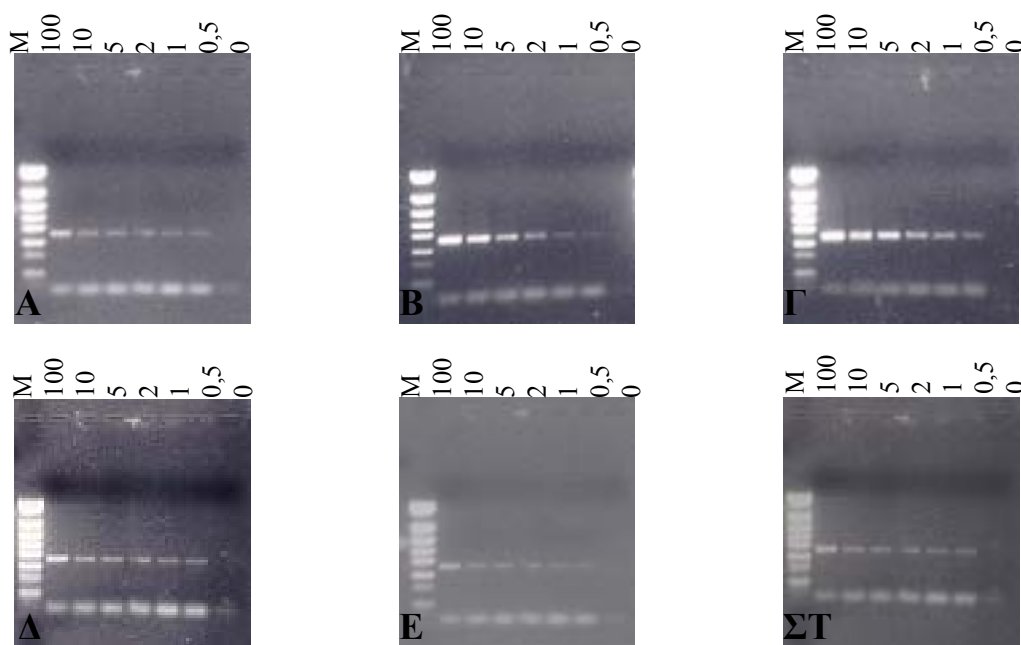
Όλα τα δείγματα και οι μάρτυρες ετοιμάστηκαν παράλληλα, έτσι ώστε να καταγραφεί ο βαθμός επιμόλυνσης από μεταφορά και διασταύρωση. Τέλος, τηρήθηκε

¹¹ **Μάρτυρας PCR:** σημείο ελέγχου της ποιότητας της αντίδρασης.

αυστηρός διαχωρισμός μεταξύ των διαφορετικών τεχνικών σταδίων της PCR, δηλαδή της ετοιμασίας δειγμάτων, ετοιμασίας κυρίων μειγμάτων, φορτώματος δειγμάτων, πολλαπλασιασμού, και ανάλυσης δειγμάτων σε αгарόζη [Kwok & Higuchi, 1989].

Αποτελέσματα & Συζήτηση

Η τροποποιημένη τεχνική της PCR η οποία αναπτύχθηκε ελαχιστοποιεί τους κινδύνους επιμόλυνσης, προσφέροντας υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, είναι απλή στην εφαρμογή της, και μπορεί να παράγει αποτελέσματα σε 12 ώρες από την παραλαβή του δείγματος. Τυποποιήθηκε με πρότυπα βιολογικά δείγματα τα οποία παρασκευάστηκαν με την προσθήκη παρασίτων *T. gondii* σε αρνητικά κλινικά δείγματα λευκών αιμοσφαιρίων, αμνιακού υγρού, πλακούντα, και κοπράνων γάτας, και με την προσθήκη ιστικών κύστεων σε δείγματα εγκεφάλων ποντικών.



Εικόνα 2-2. Ευαισθησία της προτεινόμενης PCR (Α) περιφερικό αίμα, (Β) ούρα, (Γ) αμνιακό υγρό, (Δ) πλακούντας, (Ε) κόπρανα γάτας, (ΣΤ) εγκεφάλοι ποντικών. Μ, μάρτυρας μοριακού βάρους DNA pUC19 *Sau3AI/pUC19 TaqI*, 1444, 955, 736, 585, 476, 341, 258, 105, 100, 100 παράσιτα; 10, 10 παράσιτα; 5, 5 παράσιτα; 2, 2 παράσιτα; 1, 1 παράσιτο; 0,5, 0,5 παράσιτα; 0, 0 παράσιτα.



Εικόνα 2-3. Ειδικότητα της προτεινόμενης PCR. M, μάρτυρας μοριακού βάρους DNA *pUC19* *Sau3AI/pUC19* *TaqI*, 1444, 955, 736, 585, 476, 341, 258, 105; -, αρνητικός μάρτυρας

Το προτεινόμενο dUTP-UDG πρωτόκολλο PCR απαιτεί μόνο δύο τροποποιήσεις στην κλασική PCR: την αντικατάσταση του dTTP από dUTP σε όλες τις αντιδράσεις, και την επώαση όλων των αντιδράσεων με το ένζυμο UDG πριν από τον θερμικό πολλαπλασιασμό. Για την επιπλέον ελαχιστοποίηση της πιθανότητας επιμόλυνσης, εισαχθήκανε αυστηρά μέτρα όπως η φυσική απομόνωση των διαφορετικών βημάτων της PCR. Η επιμόλυνση από διασταύρωση εξαλείφθηκε αποτελεσματικά με την επώαση των αντιδράσεων με UDG. Όλα τα δείγματα και οι μάρτυρες ετοιμάστηκαν παράλληλα έτσι ώστε να μιμηθούν τις πραγματικές συνθήκες σε διαγνωστικά εργαστήρια ρουτίνας, όπου θετικά και αρνητικά δείγματα έχουν κοινή επεξεργασία.

Μετά την εφαρμογή της PCR στα ίδια πρότυπα δείγματα με τις τρεις διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης του DNA, κατέστη φανερό πως η βέλτιστη μέθοδος ήταν εκείνη των διαδοχικών βρασμών-ψύξεων. Η μέθοδος αυτή επιλέχθηκε τελικά για εφαρμογή και σε πραγματικά δείγματα. Η ικανότητα της προτεινόμενης τεχνικής της PCR να ανιχνεύσει επανειλημμένα μισό παράσιτο με την παρουσία ανθρώπινων κυττάρων μετά από υποτονική λύση σε νερό και βρασμό, υπονοεί ότι δεν είναι αναγκαία η εισαγωγή περίπλοκων τεχνικών για την εκχύλιση του DNA. Το μόνο επιπρόσθετο κόστος, είναι η προμήθεια dUTP και του ενζύμου UDG, τα οποία μπορούν να εξισορροπηθούν από το γεγονός ότι το κόστος προετοιμασίας των δειγμάτων για την PCR είναι μηδαμινό. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της PCR μπορούν εύκολα να ανιχνευθούν σε πηκτή αгарόζης, χωρίς την ανάγκη ανίχνευσης

με πιο ακριβές, πολύπλοκες και χρονοβόρες μεθόδους υβριδισμού και αυτοραδιογραφίας. Τέλος, ο κίνδυνος απόκτησης ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων ελαχιστοποιείται.

Το αναμενόμενο προϊόν των 434 bp ανιχνεύθηκε στα πρότυπα βιολογικά δείγματα αίματος, αμνιακού υγρού, πλακούντα, κοπράνων γάτας, και εγκεφάλων ποντικών (Εικόνα 2-2, σελ. 53). Μετά από 40 κύκλους πολλαπλασιασμού η ευαισθησία της αντίδρασης ήτανε αρκετή ώστε να ανιχνεύσει 0,5 παράσιτα ανά αντίδραση, για κάθε είδος δείγματος. Η ανάλυση του προϊόντος των αντιδράσεων έγινε σε όλες τις περιπτώσεις με εφαρμογή σχεδόν του 50% της αντίδρασης σε πηκτή αγαρόζης, και αποτύπωση του αποτελέσματος κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία. Επιτεύχθηκε βελτίωση της έντασης των ζωνών σε όλα τα δείγματα, μετά από αποθήκευσή τους στους -20°C , τουλάχιστον για 5 ημέρες.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι μισό παράσιτο *T. gondii* μπορεί να ανιχνευθεί απ' ευθείας, χρησιμοποιώντας την επαναλαμβανόμενη αλληλουχία του γονιδίου B1 του *T. gondii* σαν στόχο του πολλαπλασιασμού, ακόμα και με την παρουσία υψηλής ποσότητας υπόβαθρου DNA (background DNA). Σύγκριση με την κλασική dNTP PCR δεν έδειξε διαφορές στην ευαισθησία. Όλες οι αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, για κάθε είδος δείγματος. Δεν προέκυψαν αρνητικά αποτελέσματα από δείγματα τα οποία θεωρούνταν ότι περιείχαν μισό παράσιτο, δείχνοντας την υψηλή ευαισθησία της προτεινόμενης τεχνικής.

Προσθήκη 10^3 παρασίτων σε διπλότυπα δείγματα εγκεφάλων ποντικών, οδήγησε σε ελαφρά αναστολή της αντίδρασης της PCR, η οποία όμως δεν εμπόδισε τον πολλαπλασιασμό του DNA-στόχου. Η αναστολή αυτή αποδίδεται στη μεγάλη ποσότητα υπόβαθρου DNA. Δεν παρατηρήθηκε βελτίωση του προϊόντος της PCR με την υιοθέτηση μεγαλύτερων χρόνων φυγοκέντρωσης, ή με την εξέταση διαφορετικών αραιώσεων. Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω επιμόλυνσης από μεταφορά ή διασταύρωση, ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα λόγω αναστολής της αντίδρασης της PCR.

Η παρουσία της αλληλουχίας του γονιδίου B1 έχει επιβεβαιωθεί σε όλα τα γνωστά στελέχη του *T. gondii* [Burg *et al.*, 1989; Grover *et al.*, 1990; Hohlfield *et al.*, 1994]. Το αναμενόμενο προϊόν των 434 bp ανιχνεύθηκε στο λοιμογόνο στέλεχος RH και στα 5 μη-λοιμογόνα στελέχη BOU, LGE94-2, PERR, PSP-19, και NED του *T.*

gondii (Εικόνα 2-3, σελ. 54), υποδηλώνοντας ότι το επιλεγμένο ζεύγος των εναρκτών είναι ειδικό στην ανίχνευση των διαφορετικών στελεχών του *T. gondii*. Επιπλέον, αναζήτηση (BLAST) περιοχών γονιδιώματος άλλων οργανισμών ομόλογων με την αλληλουχία των επιλεγμένων εναρκτών, δεν έδειξε υπολογίσιμη ομολογία.

Για την επιπλέον διερεύνηση της ειδικότητας της PCR χρησιμοποιήθηκαν συνηθισμένοι παθογόνοι οργανισμοί οι οποίοι είναι δυνατόν να επιμολύνουν κλινικά δείγματα. Αυτά συμπεριλάμβαναν τα βακτήρια *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Eschericia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Alcaligenes*, και *Xanthomonas*, και το πρωτόζωο *Leishmania*. Ο πολλαπλασιασμός των παθογόνων αυτών δεν οδήγησε στην απόκτηση προϊόντος ορατού στην πηκτή της αγαρόζης σε καμία από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις οι οποίες δοκιμάστηκαν, ενώ δεν παρατηρήθηκε αναστολή της αντίδρασης. Η απουσία πολλαπλασιασμού σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, συνηγορεί υπέρ της ειδικότητας της ανεπτυγμένης τεχνικής για το *T. gondii*. Τέλος, δεν παρατηρήθηκε ειδικό ή μη-ειδικό προϊόν σε αρνητικά δείγματα, ενώ μόνο το ειδικό προϊόν των 434 bp ανιχνεύθηκε στα θετικά δείγματα.

Καλλιέργειες

Εισαγωγή

Η καλλιέργεια του *T. gondii* μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε ιστοκαλλιέργεια ή σε ποντίκια, με σκοπό την απομόνωση του παρασίτου από βιολογικά υλικά και τον πολλαπλασιασμό των στελεχών του παρασίτου που ευθύνονται για τη μόλυνση.

Οι ιστοκαλλιέργειες συνίστανται στην καλλιέργεια βιολογικού υλικού σε κυτταρικές σειρές μακροφάγων, με σκοπό την απομόνωση του επιθυμητού οργανισμού. Στόχος ήταν η προσαρμογή της μεθόδου των shell-vials για την απομόνωση του *T. gondii* από βιολογικά υλικά. Τα shell-vials είναι φιαλίδια καλλιέργειας, τα οποία περιέχουν κινητή καλυπτρίδα στον πυθμένα τους, πάνω στην οποία γίνεται η ανάπτυξη της κυτταρικής σειράς. Η μέθοδος αυτή είναι ταχεία, και επιτρέπει τον εύκολο χειρισμό της κυτταρικής σειράς και των ενοφθαλμισμένων δειγμάτων.

Η μέθοδος της καλλιέργειας του *T. gondii* σε ποντίκια, συνίσταται στον ενδοπεριτοναϊκό ενοφθαλμισμό του ζώου με βιολογικά δείγματα. Τα ποντίκια τα

οποία χρησιμοποιήθηκαν (balb/c) είναι τροποποιημένα γενετικά ως προς την ανοσοποιητική τους απόκριση σε λοιμώξεις, έτσι ώστε να καθίστανται περισσότερο επιρρεπή σε αυτές. Η καλλιέργεια σε ποντίκια έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση πολλών οργανισμών, όπως και για το *T. gondii*, και θεωρείται μέχρι σήμερα η πιο ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσής του [Derouin *et al.*, 1987; Hitt & Filice, 1992]. Σκοπός της εισαγωγής της καλλιέργειας σε ποντίκια, πλέον των ιστοκαλλιέργειών, στη διάγνωση της τοξοπλάσμωσης, ήταν η αύξηση της ευαισθησίας του εξαγόμενου αποτελέσματος με τη χρήση πολλαπλών τεχνικών (PCR, ιστοκαλλιέργεια, καλλιέργεια σε ποντίκια).

Μεθοδολογία

Ιστοκαλλιέργειες

Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά MRC-5, η οποία αποτελείται από ινοβλάστες προερχόμενους από φυσιολογικό πνευμονικό ιστό εμβρύου 14 εβδομάδων. Τα κύτταρα αυτά προσκολλώνται σε επιφάνειες, στην περίπτωση αυτή στην καλυπτρίδα του shell-vial, σχηματίζοντας ταπήτιο (monolayer¹²). Για να προσομοιωθεί η πειραματική καλλιέργεια με αυτή των πραγματικών δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά THP-1, η οποία είναι μονοκυτταρική κυτταρική σειρά προερχόμενη από άτομο με λευχαιμία, και τα κύτταρα της οποίας δεν προσκολλώνται σε επιφάνειες.

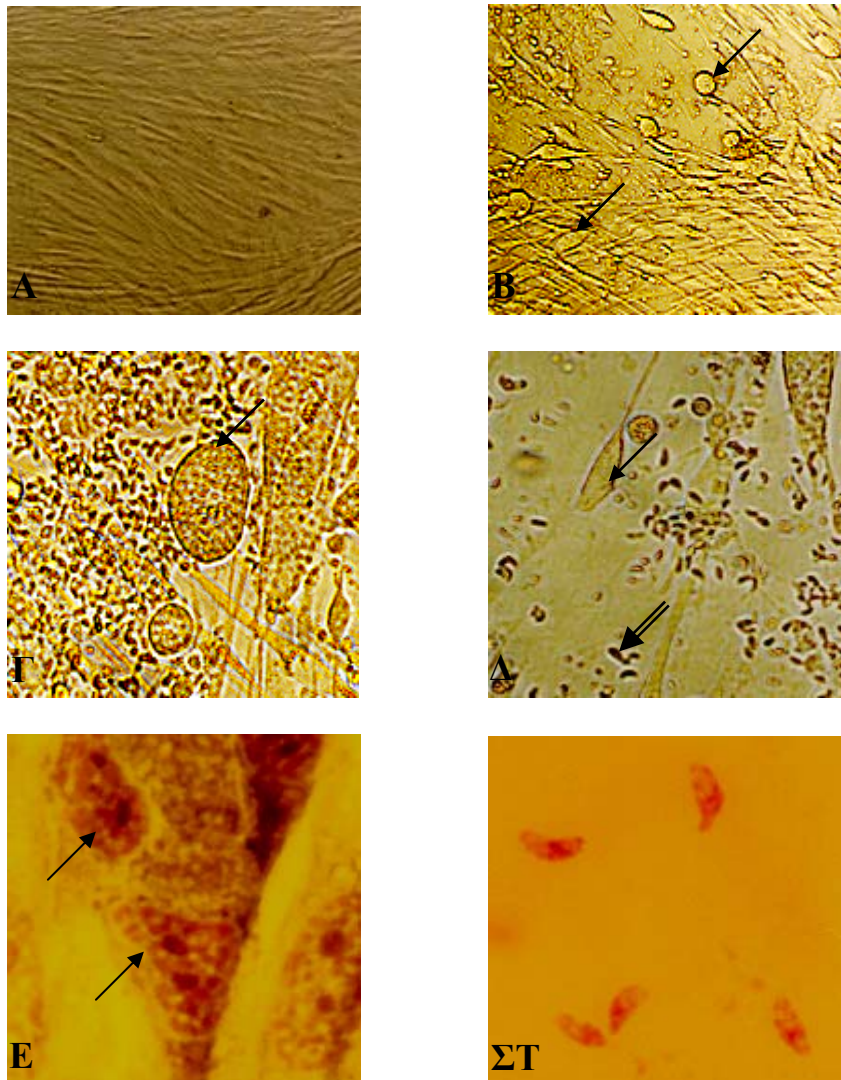
Κύτταρα THP-1 μολύνθηκαν με *T. gondii* RH, σε αναλογία 1:2 (παράρτημα 1.2.8, σελ. 159). Μετά από 12 ώρες τα μολυσμένα κύτταρα διαχωρίστηκαν από τα φυσιολογικά και από τα ελεύθερα *T. gondii* με διαφορεική φυγοκέντρηση (παράρτημα 1.2.9, σελ. 159). Τα μολυσμένα κύτταρα μετρήθηκαν, και χρησιμοποιήθηκαν 5 μολυσμένα κύτταρα για την μόλυνση κάθε shell-vial με πλήρως ανεπτυγμένο ταπήτιο MRC-5 (παράρτημα 1.2.6, σελ. 158). Συνολικά μολύνθηκαν 14 shell-vials, και χρησιμοποιήθηκαν άλλα 7 για αρνητικοί μάρτυρες. Μετά τον ενοφθαλμισμό, τα 7 από τα 14 μολυσμένα shell-vials, φυγοκεντρήθηκαν στις 2.000 r.p.m. για 30 λεπτά, ενώ τα υπόλοιπα δεν υπέστησαν καμία επιπλέον διαδικασία. Όλα τα shell-vials επώαστηκαν στους 37°C, με 5% CO₂.

¹² **ταπήτιο (monolayer):** στρώμα πάχους ενός κυττάρου.

Με σκοπό τον υπολογισμό του αριθμού των μολυσμένων από *T. gondii* MRC–5 κυττάρων, κάθε μέρα για 7 ημέρες, 3 shell–vials (1 μολυσμένο με φυγοκέντρηση, 1 μολυσμένο χωρίς φυγοκέντρηση και ένα μη-μολυσμένο) αφαιρούνταν από τον κλίβανο. Στις καλλιέργειες αυτές, συλλέχθηκε το υπερκείμενο το οποίο φυγοκεντρήθηκε στις 1.800 rpm. για 10 λεπτά. Μετά την απόρριψη του υπερκειμένου, το ίζημα υποβλήθηκε σε κυτταροφυγοκέντρηση (παράρτημα 1.2.6, σελ. 158), και ακολούθησε χρώση Giemsa (παράρτημα 1.4.2, σελ. 162). Οι αντικειμενοφόρες πλάκες εξετάστηκαν στο μικροσκόπιο για τον εντοπισμό εξωκυτταρικών ταχυζωιδίων *T. gondii* στο υπερκείμενο της ιστοκαλλιέργειας, και ενδοκυτταρικών παρασίτων σε επιπλέοντα κύτταρα. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε χρώση Giemsa (παράρτημα 1.4.2, σελ. 162) στις καλυπτρίδες των shell-vials από τα οποία είχε αφαιρεθεί το υπερκείμενο, για τον εντοπισμό μολυσμένων MRC–5 (ενδοκυτταρικών παρασίτων *T. gondii*). Σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα μετρήθηκαν 100 κύτταρα, 3 φορές, για να υπολογιστεί το ποσοστό των μολυσμένων κυττάρων.

Πίνακας 2-1. Αποτελέσματα πειραματικών μολύνσεων MRC–5 σε shell–vials.

Φυγοκέντρηση	Ημέρα Μόλυνσης						
	1	2	3	4	5	6	7
	Παρουσία Ενδοκυττάρων <i>T. gondii</i> (%)						
Ναι	0	0	2,3	7	11,2	25,8	53,1
Όχι	0	0	0	0	0	5,1	12,3
	Παρουσία <i>T. gondii</i> στο Υπερκείμενο						
Ναι	–	–	+	+	+	+	+
Όχι	–	–	–	–	–	+	+



Εικόνα 2-4. MRC-5 και *T. gondii* σε καλλιέργειες shell-vials. (A) ταπήτιο φυσιολογικών MRC-5 κυττάρων, (B) ταπήτιο MRC-5 κυττάρων μολυσμένων με *T. gondii* RH (βέλη) (μεγέθυνση 10), (Γ) & (Δ) ταπήτιο MRC-5 κυττάρων μολυσμένων με *T. gondii* RH (βέλη) και παρουσία ελεύθερων ταχυζωιδίων (διπλό βέλος) (μεγέθυνση 40), (E) ενδοκυττάρια ταχυζωίδια *T. gondii* RH σε κύτταρο MRC-5 μετά από χρώση Giemsa (βέλη) (μεγέθυνση 100), και (ΣΤ) ελεύθερα ταχυζωίδια *T. gondii* RH μετά από χρώση Giemsa.

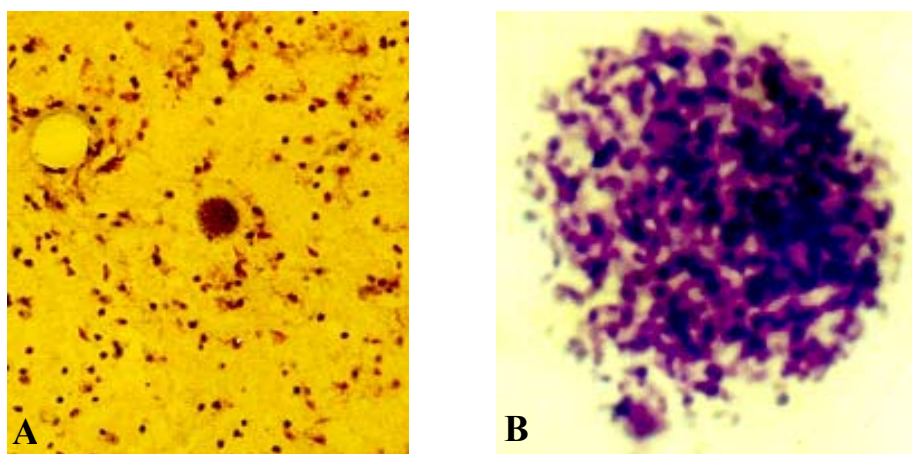
Καλλιέργειες σε Ποντίκια

Για την βελτιστοποίηση των καλλιεργειών σε ποντίκια, χρησιμοποιήθηκαν θηλυκά ποντίκια balb/c (nude, ομόζυγα) βάρους 25–30 gr, για να γίνουν πειραματικές μολύνσεις με ταχυζωΐδια του λοιμογόνου στελέχους RH, και με ιστικές κύστες των μη-λοιμογόνων στελεχών BOU, LGE94–2, PERR, PSP–19, και NED.

Τα ταχυζωΐδια RH καλλιεργήθηκαν σε ινοβλάστες MRC-5 (παράρτημα 1.2.3, σελ. 157), διαχωρίστηκαν από τους ξενιστές τους με φιλτράρισμα (παράρτημα 1.2.4, σελ. 157), και μετρήθηκαν με τη χρήση κυτταρομετρικής πλάκας (παράρτημα 1.2.5, σελ. 158). Οι ιστικές κύστες των στελεχών BOU, LGE94–2, PERR, PSP–19, και NED, αναπτύχθηκαν σε ποντίκια balb/c μετά από ενδοπεριτοναϊκό ενοφθαλμισμό (παράρτημα 1.3.1, σελ. 160). Τα ζώα θυσιάστηκαν 2 μήνες μετά τη μόλυνσή τους για τον εντοπισμό ιστικών κύστεων στον εγκέφαλό τους, οι οποίες μετρήθηκαν όπως και τα ταχυζωΐδια.

Για κάθε στέλεχος μολύνθηκαν 14 ποντίκια. Τα ποντίκια που μολύνθηκαν με ταχυζωΐδια δέχτηκαν ενδοπεριτοναϊκή ένεση με 10^4 ταχυζωΐδια, ενώ τα ποντίκια που μολύνθηκαν με ιστικές κύστες, δέχτηκαν ενδοπεριτοναϊκή ένεση με 10 ιστικές κύστες (παράρτημα 1.3.1, σελ. 160). Πριν από την μόλυνσή τους, όλα τα ποντίκια ελέγχθηκαν ορολογικά με τη δοκιμασία της αιμοσυγκόλλησης σε μία σταγόνα από το αίμα της ουράς τους, για να διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά για αντισώματα έναντι του *T. gondii* (παράρτημα 1.3.3, σελ. 161).

Στη συνέχεια, σε ορισμένα χρονικά διαστήματα (Πίνακας 2-2, σελ. 62), πραγματοποιήθηκε μία σειρά εξετάσεων σε δύο ποντίκια μολυσμένα με το ίδιο στέλεχος: αιμοσυγκόλληση για να διαπιστωθεί εάν υπήρχε ανοσολογική απόκριση στη μόλυνσή τους με *T. gondii*, και παρακολούθηση της φυσικής κατάστασης των ζώων για παρουσία συμπτωμάτων αρρώστιας. Τέλος, τα ποντίκια θυσιάστηκαν, για την αναζήτηση ταχυζωιδίων *T. gondii* στην ενδοπεριτοναϊκή τους κοιλότητα, και ιστικών κύστεων στον εγκέφαλό τους. Η αναζήτηση των παρασίτων έγινε με χρώση του ενδοπεριτοναϊκού υγρού και υλικού από τον εγκέφαλο με Giemsa για παρατήρηση σε μικροσκόπιο και με PCR.



Εικόνα 2-5. Ιστικές κύστες σε εγκέφαλο ποντικιοῦ με χρώση Giemsa. (A) μεγέθυνση $\times 10$, (B) μεγέθυνση $\times 100$.

Αποτελέσματα & Συζήτηση

Ιστοκαλλιέργειες

Η καλλιέργεια του *T. gondii* σε shell-vials επιτρέπει την ταχεία ανίχνευσή του. Για να προσδιοριστεί ο βέλτιστος τρόπος καλλιέργειας του *T. gondii* σε shell-vials, πραγματοποιήθηκαν πειραματικές μολύνσεις ινοβλαστών MRC-5, με μολυσμένα κύτταρα THP-1, με ή χωρίς φυγοκέντρηση, και μετρήθηκε σε κάθε περίπτωση το ποσοστό των μολυσμένων MRC-5.

Η φυσιολογική μορφή των ινοβλαστών MRC-5 είναι νηματοειδής (Εικόνα 2-4A, σελ. 59), με τα κύτταρα να καλύπτουν ολόκληρη την επιφάνεια της καλυπτρίδας. Όταν τα MRC-5 μολυνθούν με *T. gondii*, τα παράσιτα αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται μέσα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή, με αποτέλεσμα τα τελευταία, να αρχίσουν να διογκώνονται και να χάνουν τη νηματοειδή τους μορφή, αποκτώντας μία ωοειδή ή στρογγυλή μορφή (Εικόνα 2-4B, Γ, Δ, σελ. 59). Η κυτταροπαθογόνος αυτή δράση είναι ορατή χωρίς χρώση, και σε μεγέθυνση $\times 40$. Τα εξοκυττάρια ταχυζώδια είναι επίσης αναγνωρίσιμα στην ίδια μεγέθυνση. Καθώς η μόλυνση των MRC-5 προχωρά, και καθώς διαρρηγνύονται τα μολυσμένα κύτταρα, δημιουργούνται περιοχές με πλήρως κατεστραμμένο ταπήτιο.

Πίνακας 2-2. Πειραματικές μολύνσεις ποντικών *balb/c* με διαφορετικά στελέχη του *T. gondii*.

Ημέρα	Εξέταση	Στέλεχος <i>T. gondii</i>					
		RH	BOU	LGE94-2	PERR	PSP-19	NED
1	Συμπτώματα	-	-	-	-	-	-
	Αιμοσυγκόλληση	-	-	-	-	-	-
	περιτόναιο	+	-	-	-	-	-
	εγκέφαλος	-	-	-	-	-	-
3	Συμπτώματα	++	-	-	-	-	-
	Αιμοσυγκόλληση	+	-	-	-	-	-
	περιτόναιο	++	-	-	-	-	-
	εγκέφαλος	-	-	-	-	-	-
5	Συμπτώματα	+++	-	-	-	-	-
	Αιμοσυγκόλληση	+	-	-	+	-	+
	περιτόναιο	+++	-	-	+	+	-
	εγκέφαλος	-	-	-	-	-	-
7	Συμπτώματα	Θάνατος	-	-	-	-	-
	Αιμοσυγκόλληση		-	+	+	+	+
	περιτόναιο		-	-	+	-	+
	εγκέφαλος		-	-	-	+	+
14	Συμπτώματα		-	-	-	-	-
	Αιμοσυγκόλληση		+	+	+	+	+
	περιτόναιο		-	+	-	-	+
	εγκέφαλος		+	+	+	+	+
17	Συμπτώματα		-	-	-	-	-
	Αιμοσυγκόλληση		+	+	+	+	+
	περιτόναιο		-	-	-	-	-
	εγκέφαλος		++	++	++	++	++
21	Συμπτώματα		-	-	-	-	-
	Αιμοσυγκόλληση		+	+	+	+	+
	περιτόναιο		-	-	-	-	-
	εγκέφαλος		+++	+++	+++	+++	+++

+, θετική αντίδραση ή παρουσία του *T. gondii*. Πολλαπλοί σταυροί υπονοούν την έντονη παρουσία του παρασίτου

Η χρώση των καλυπτρίδων με Giemsa βοηθά στον εντοπισμό MRC-5 με ενδοκυττάρια ταχυζώδια *T. gondii* σε αρχικά στάδια της μόλυνσης, πριν ακόμα γίνει ορατή η κυτταροπαθογόνος δράση (Εικόνα 2-4E σελ. 59). Τα ενδοκυττάρια ταχυζώδια ήταν ορατά μόνο με μεγέθυνση $\times 100$.

Η φυγοκέντρωση ευνόησε την εισχώρηση των *T. gondii* στα MRC-5. Αναλυτικότερα, οι καλλιέργειες οι οποίες φυγοκεντρήθηκαν παρουσίασαν ποσοστό μολυσμένων κυττάρων 2,3% την τρίτη μέρα από τον ενοφθαλμισμό τους, ενώ μέχρι την έβδομη ημέρα της καλλιέργειας, περισσότερα από τα μισά MRC-5 (53,1%) ήταν μολυσμένα. Αντίστοιχα, οι καλλιέργειες που δεν φυγοκεντρήθηκαν παρουσίασαν ποσοστό μολυσμένων κυττάρων 5,1% μόλις την έκτη ημέρα από την μόλυνσή τους, ενώ την έβδομη ημέρα το ποσοστό των μολυσμένων κυττάρων ήταν μόνο 12,3%. Η καλλιέργεια των MRC-5 στα shell-vials δεν συνεχίστηκε πέρα των 7 ημερών, λόγω του ότι η υπέρ-ανάπτυξη των MRC-5 κυττάρων στα shell-vials που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες, δεν επέτρεπε την ακριβή παρατήρηση. Εξωκυττάρια ταχυζώδια εμφανίστηκαν στα υπερκείμενα των καλλιεργειών που φυγοκεντρήθηκαν την τρίτη ημέρα. Αντίστοιχα, οι καλλιέργειες που δεν φυγοκεντρήθηκαν παρουσίασαν εξωκυττάρια ταχυζώδια την έκτη ημέρα από την μόλυνσή τους.

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η φυγοκέντρωση των καλλιεργειών αμέσως μετά την μόλυνσή τους υποβοηθάει σημαντικά στην επίσπευση της ανίχνευσης του *T. gondii* είτε στο ταπήτιο σαν ενδοκυττάρια παράσιτα, είτε στο υπερκείμενο των καλλιεργειών σαν εξωκυττάρια ταχυζώδια. Επομένως, η εισαγωγή της καλλιέργειας βιολογικών υλικών σε shell-vials με φυγοκέντρωση μετά τον ενοφθαλμισμό του δείγματος αυξάνει τις πιθανότητες απομόνωσης του *T. gondii* και επομένως υποβοηθά στην ταχεία διάγνωση της τοξοπλάσμωσης.

Καλλιέργειες σε Ποντίκια

Ποντίκια balb/c μολύνθηκαν με ζωντανά ταχυζωΐδια *T. gondii* RH, και με ζωντανές ιστικές κύστες των χρόνιων στελεχών BOU, LGE94–2, PERR, PSP–19, και NED με σκοπό τον προσδιορισμό του βέλτιστου τρόπου καλλιέργειας, και της ειδικής απόκρισης των ποντικιών στη μόλυνση με διαφορετικά στελέχη του *T. gondii*.

Φαίνεται (Πίνακας 2-2, σελ. 62), πως με τα στελέχη του *T. gondii* που χρησιμοποιήθηκαν, ο συντομότερος χρόνος κατά τον οποίο είναι δυνατόν να ανιχνευτεί μόλυνση του ζώου είναι οι τρεις ημέρες για το λοιμογόνο στέλεχος, ενώ για τα μη–λοιμογόνα στελέχη ο χρόνος ποικίλει από 5 μέχρι 14 ημέρες, ανάλογα με το στέλεχος. Η αιμοσυγκόλληση ήταν θετική στα ζώα που μολύνθηκαν με το τοξικό στέλεχος RH, από την 3^η ημέρα, ενώ ο χρόνος θετικοποίησης της αιμοσυγκόλλησης διέφερε ανάλογα με το χρόνιο στέλεχος, και κυμαίνονταν από την 5^η μέχρι την 14^η ημέρα. Αντίθετα με την ανίχνευση των αντισωμάτων, ο χρόνος ανίχνευσης του παρασίτου είναι από την πρώτη ημέρα για το τοξικό στέλεχος RH. Όσον αφορά στην μόλυνση των ποντικιών με τα χρόνια στελέχη ο χρόνος ανίχνευσης ενδοκυττάρων ταχυζωΐδιων στο περιτόναιο κυμαινόταν από την 5^η μέχρι την 14^η ημέρα, ενώ ο χρόνος ανίχνευσης ιστικών κύστεων στους εγκεφάλους των ποντικιών κυμαινόταν από την 7^η μέχρι την 14^η ημέρα. Επομένως, η ανίχνευση της μόλυνσης στο ποντίκι πραγματοποιείται πιο γρήγορα με την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του *T. gondii*, και όχι με την απευθείας ανίχνευση του παρασίτου.

Ακόμα και μετά το πέρας των 21 ημερών, τα ποντίκια που είχαν μολυνθεί με τα χρόνια στελέχη BOU, LGE94–2, PERR, PSP–19, και NED, δεν έδειξαν κανένα σύμπτωμα αρρώστιας. Αντιθέτως τα ποντίκια που μολύνθηκαν με το τοξικό στέλεχος RH, παρουσίασαν έντονα συμπτώματα ασθένειας από την 3^η ημέρα, και δεν επέζησαν πέρα από την 6^η ημέρα από την μόλυνσή τους.

Στα ποντίκια που είχαν μολυνθεί με τα χρόνια στελέχη BOU, LGE94–2, PERR, PSP–19, και NED εμφανίστηκαν σε διαφορετικό χρόνο στο ενδοπεριτοναϊκό τους υγρό ενδοκυττάρια ταχυζωΐδια σε κύτταρα που είχαν την μορφολογία μακροφάγων. Αντίθετα τα ποντίκια που είχαν μολυνθεί με το χρόνιο στέλεχος RH, παρουσίασαν στο ενδοπεριτοναϊκό τους υγρό ελεύθερα ταχυζωΐδια. Τα ποντίκια που μολύνθηκαν με το τοξικό στέλεχος RH δεν εμφάνισαν ιστικές κύστες, ενώ τα

ποντίκια που μολύνθηκαν με τα χρόνια στελέχη, άρχισαν να εμφανίζουν ιστικές κύστες μετά την 7^η και 14^η ημέρα ανάλογα με το στέλεχος.

Επομένως, παρά το γεγονός ότι η καλλιέργεια σε ποντίκια θεωρείται χρονοβόρα, με την εισαγωγή της αιμοσυγγόλησης και της παρακολούθησης των ποντικών για συμπτώματα ασθένειας, καθίσταται δυνατή η ανίχνευση είτε αντισωμάτων ή του ίδιου του παρασίτου. Η χρήση της τεχνικής αυτής κρίνεται απαραίτητη σε συνδυασμό με την PCR και τις ιστοκαλλιέργειες λόγω της υψηλής της ευαισθησίας η οποία υπερκαλύπτει το μειονέκτημα του μεγάλου χρόνου που απαιτείται για την ανίχνευση.

Western Blotting

Εισαγωγή

Το Western Blotting (WB) είναι τεχνική με την οποία καθίσταται δυνατή η ποιοτική αξιολόγηση των αντισωμάτων ενός ατόμου. Το σύνολο των πρωτεϊνών του υπό διερεύνηση οργανισμού αποτυπώνεται σε λωρίδες νιτροκυτταρίνης, οι οποίες στη συνέχεια επωάζονται με τον υπό εξέταση ορό. Εφ' όσον υπάρχουν στον ορό αντισώματα έναντι κάποιων από τις αποτυπωμένες πρωτεΐνες, δεσμεύονται, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ειδικών ζωνών. Σε αρκετές περιπτώσεις μικροβίων, έχει βρεθεί πως κάποιες από τις ειδικές αυτές ζώνες έχουν διαγνωστική αξία.

Μεθοδολογία

Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών

Το αντιγόνο¹³ τοξοπλάσματος παρασκευάστηκε από καλλιέργεια του *T. gondii* σε MRC-5 ινοβλάστες (παράρτημα 1.2.3, σελ. 157). Οι ταχυζωίτες συλλέχθηκαν, διαχωρίστηκαν από τους ινοβλάστες με φιλτράρισμα (παράρτημα 1.2.4, σελ. 157), διασπάστηκαν με υπέρηχους, και φυγοκεντρήθηκαν (παράρτημα 1.7.1, σελ. 167). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός της ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford (παράρτημα 1.7.1.a, σελ. 167).

¹³ **Αντιγόνο:** οποιοδήποτε ξένο προς τον οργανισμό υλικό που μπορεί να δεσμευτεί από ειδικά αντισώματα ή ειδικά λεμφοκύτταρα. Στην περίπτωση αυτή ο όρος χρησιμοποιείται για να περιγράψει το σύνολο των εκχυλισμένων πρωτεϊνών του *T. gondii*.

Παρασκευάστηκε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με πυκνότητα 12% (παράρτημα 1.7.2, σελ. 167), και καθορίστηκε η κατάλληλη ποσότητα αντιγόνου με εφαρμογή διαφορετικών ποσοτήτων αντιγόνου στα πηγάδια (5, 10, και 20 μg).

Ανοσοαποτύπωση

Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα αποτυπώθηκε σε νιτροκυτταρίνη με διάμετρο πόρων 0,45 μm (Hoefel Scientific instruments, USA), με τη χρήση συσκευής μεταφοράς πρωτεϊνών (semi-dry transfer apparatus, Hoefel Scientific instruments, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (παράρτημα 1.7.3, σελ. 168).

Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ορών ατόμων με αντισώματα έναντι του *T. gondii*. Στόχος ήταν να βελτιστοποιηθούν τα διάφορα στάδια του WB έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση αντισωμάτων, ακόμα και στην περίπτωση δειγμάτων με πολύ χαμηλό τίτλο αντισωμάτων, περιπτώσεις που είναι συχνές σε δείγματα νεογνών και ασθενών με AIDS.

Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα με διάφορους γνωστούς τίτλους IgG και IgM μετά από τη δοκιμασία του ανοσοφθορισμού (IFA). Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν οροί με τίτλους 1:450, 1:4050, και 1:109.350 για τα IgG, ενώ για τα IgM χρησιμοποιήθηκαν οροί με τίτλους 1:50, 1:450, και 1:1350. Τα δείγματα για IgA, επιλέχθηκαν από τα αποτελέσματα της ELISA. Τα δείγματα, ανεξάρτητα με τον τίτλο τους στον ανοσοφθορισμό, αραιώθηκαν 1:80, 1:100, και 1:250 για τα IgG αντισώματα, και 1:10, 1:20, και 1:40 για τα IgM αντισώματα. Οι βέλτιστοι χρόνοι επώασεων για την ανοσοαποτύπωση καθορίστηκαν πειραματικά. Η δεύτερη επώαση έγινε με αντί-ανθρώπινα αντισώματα IgG, IgM, και IgA σημασμένα με αλκαλική φωσφατάση, σε αραιώση 1:1000, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (παράρτημα 1.7.3, σελ. 168).

Αποτελέσματα & Συζήτηση

Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης με διαφορετικές αραιώσεις ορών, και διαφορετικές ποσότητες αντιγόνου, φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 2-3, σελ. 68). Αναλυτικότερα, η ποσότητες των 5 και 20 μg αντιγόνου δεν παρουσίασαν καλή εικόνα στις περισσότερες από τις περιπτώσεις ανοσοαποτύπωσης, ενώ η καλύτερη εικόνα παρουσιάστηκε με την ποσότητα των 10 μg ανά πηγάδι.

Όσον αφορά στις αραιώσεις των ορών, φάνηκε ότι για τα IgG αντισώματα οι αραιώσεις των 1:100, είχαν συνολικά την καλύτερη εικόνα ενώ για τα IgM καλύτερη ήταν η εικόνα με την αραιώση των 1:40. Τέλος, για τα IgA, η καλύτερη εικόνα παρουσιάστηκε με την αραιώση των 1:20. Οι χρόνοι της πρώτης επώασης με τους ορούς καθορίστηκαν σε 1 ώρα για τα IgG, 1,5 ώρες για τα IgM, και σε 12 ώρες για τα IgA.

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε ολικό αντιγόνο του στελέχους RH του *T. gondii*. Μετά την αποτύπωση των πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση με ορούς που είχαν τιτλοποιηθεί με τις μεθόδους της IFA, και της ELISA.

Επιλέχθηκαν δείγματα ασθενών με χαμηλούς και υψηλούς τίτλους αντισωμάτων, έτσι ώστε η τεχνική να βελτιστοποιηθεί για πραγματικές συνθήκες. Η εξέταση των επιλεγμένων ορών σε διαφορετικές αραιώσεις, σε συνδυασμό με την εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων πρωτεϊνών, οδήγησε στην επιλογή της βέλτιστης συγκέντρωσης πρωτεΐνης και της βέλτιστης αραιώσης του ορού για την απόκτηση όσο το δυνατόν καλύτερης εικόνας σε πραγματικά δείγματα.

Πίνακας 2-3. Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης με πειραματικά δείγματα ασθενών με τοξοπλάσμωση.

Κλάση Ig	Τίτλος IFA	Αραίωση	Ποσότητα αντιγόνου		
			5	10	20
IgG	1:450	1:80	-	+	-
		1:100	+	++	+
		1:250	-	+	+
	1:4.050	1:80	+	++	-
		1:100	+	++	-
		1:250	-	+	+
	1:109.350	1:80	+	+	-
		1:100	+	++	-
		1:250	+	++	-
IgM	1:50	1:10	-	+	-
		1:20	-	++	+
		1:40	+	++	+
	1:450	1:10	+	+	-
		1:20	-	++	+
		1:40	+	++	+
	1:1.350	1:10	+	+	-
		1:20	+	+	-
		1:40	+	++	+
IgA	ορός 1	1:10	+	+	-
		1:20	+	++	+
		1:40	-	+	-
	ορός 2	1:10	+	+	-
		1:20	+	++	-
		1:40	-	+	+
	ορός 3	1:10	+	+	-
		1:20	+	++	-
		1:40	-	+	+

+, παρουσία καθαρών ζωνών

Κεφάλαιο 3

Διάγνωση Συγγενούς Τοξοπλάσμωσης

Εισαγωγή

Όταν μία έγκυος γυναίκα αναπτύξει οξεία λοίμωξη από *T. gondii*, το παράσιτο μπορεί να μεταδοθεί στο έμβρυο και να προκαλέσει σοβαρή βλάβη [Remington *et al.*, 1995]. Ο αριθμός των περιστατικών πρωτογενούς μόλυνσης από *T. gondii* κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης διαφέρουν πολύ από χώρα σε χώρα, και κυμαίνονται από 1 μέχρι 15 ανά 1.000 εγκυμοσύνες [Remington *et al.*, 1995]. Οι περισσότερες από αυτές τις μολύνσεις πιθανόν να μην αναγνωρίζονται για διάφορους λόγους: (α) η μόλυνση της μητέρας μπορεί να είναι υποκλινική [Ho-Yen, 1992], (β) η μόλυνση του βρέφους είναι συνήθως ασυμπτωματική [Alford *et al.*, 1974], (γ) τα συμπτώματα του βρέφους μπορεί να αναπτυχθούν ύπουλα, και να είναι μη-ειδικά [Alford *et al.*, 1974; Remington *et al.*, 1995], και (δ) όταν τα συμπτώματα παρουσιάζονται είναι δύσκολο να αποδειχτεί ότι πρόκειται για μόλυνση από *T. gondii* [Brade *et al.*, 1987; Daffos *et al.*, 1988].

Εάν γίνει έγκαιρα η διάγνωση τοξοπλάσμωσης, χορηγείται θεραπεία στην έγκυο γυναίκα, και έτσι, οι πιθανότητες να γεννηθεί απολύτως υγιές παιδί, είναι υψηλές [Remington & Desmonts, 1976, Wilson *et al.*, 1980, Desmonts & Couvreur, 1986]. Η συχνότητα εμφάνισης και η σοβαρότητα εκδήλωσης συγγενούς τοξοπλάσμωσης (ΣΤ) εξαρτώνται από τον χρόνο της κύησης κατά τον οποίο μολύνθηκε η έγκυος. Η πιθανότητα διαπλακουντικής μετάδοσης του *T. gondii* από την έγκυο στο έμβρυο είναι χαμηλή για γυναίκες που μολύνθηκαν νωρίς κατά την κύηση, ενώ είναι αυξημένη για εκείνες που μολύνθηκαν αργότερα κατά τη διάρκεια της κύησης (Εικόνα 3-1, σελ. 73), και κυμαίνεται από 6–72% [McCabe & Remington 1988; Dunn *et al.* 1999]. Η πιθανότητα εκδήλωσης σοβαρών κλινικών συμπτωμάτων στο νεογνό επίσης εξαρτάται από το στάδιο της κύησης κατά το οποίο μολύνθηκε το έμβρυο, και

είναι αντιστρόφως ανάλογη με την πιθανότητα διαπλακουντικής μετάδοσης (9–61%) [McCabe & Remington 1988; Dunn *et al.*, 1999]. Συνεπώς, είναι ζωτικής σημασίας ο ακριβής προσδιορισμός του χρόνου έναρξης της λοίμωξης της εγκύου, ώστε να είναι δυνατός ο ακριβής υπολογισμός της πιθανότητας συγγενούς μόλυνσης και σοβαρής νεογνικής νόσου. Ο υπολογισμός γίνεται με τον πολλαπλασιασμό της πιθανότητας διαπλακουντικής μετάδοσης του *T. gondii*, επί την πιθανότητα εκδήλωσης σοβαρών συμπτωμάτων [Dunn *et al* 1999] (Εικόνα 3-1, σελ. 73).

Μετά την ανίχνευση μητρικής μόλυνσης, οι έγκυες πρέπει να λάβουν αποφάσεις σχετικά με επιθετική διερεύνηση για ανίχνευση νόσου στο έμβρυο, την πιθανότητα χορήγησης θεραπευτικής αγωγής με πιθανές παρενέργειες, ή την πιθανότητα τερματισμού της εγκυμοσύνης. Σε αυτές, πρέπει να ληφθούν υπόψη το ρίσκο μετάδοσης του παρασίτου από τη μητέρα στο έμβρυο, και τις κλινικές επιπτώσεις της ΣΤ. Η ακριβής και γρήγορη διάγνωση ΣΤ επιτρέπει τη λήψη ενημερωμένης και υπεύθυνης απόφασης σχετικά με την χορήγηση θεραπείας ή τον τερματισμό της εγκυμοσύνης. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται μεγάλος αριθμός μη απαραίτητων εκτρώσεων, που οφείλονται στην δικαιολογημένη, μέχρι σήμερα, άγνοια και αβεβαιότητα για την κατάσταση του παιδιού που θα γεννηθεί.

Σκοπός της μελέτης ήταν να γίνει αποτίμηση του προβλήματος της τοξοπλάσμωσης σε έγκυες γυναίκες στον νομό Ηρακλείου της Κρήτης, να υπολογιστεί ο ρυθμός μετάδοσης του *T. gondii* από τη μητέρα στο έμβρυο και να διερευνηθεί το αποτέλεσμα των κήσεων εγκύων οι οποίες υπήρχε πιθανότητα να έχουν μολυνθεί κατά τη διάρκεια της κύησης. Για το σκοπό αυτό, σχεδιάστηκε ένα πρωτόκολλο για την παρακολούθηση των εγκύων για μόλυνση με *T. gondii*, και για τον χειρισμό εκείνων σε κίνδυνο να γεννήσουν παιδιά με ΣΤ. Το πρωτόκολλο αυτό εφαρμόστηκε για 5 χρόνια.

Ορολογική Διάγνωση: Ερμηνεία & Περιορισμοί

Ο πρώτος έλεγχος για τον προσδιορισμό της κατάστασης της εγκύου σχετικά με μόλυνση από το *T. gondii*, είναι οι ορολογικές δοκιμασίες. Ιδανικά, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δύο ή περισσότερες τεχνικές [Roberts *et al.*, 2001]. Στο ορολογικό τμήμα του Μικροβιολογικού εργαστηρίου του Πα.Γ.Ν.Η, χρησιμοποιούνται η ELISA, ο ανοσοφθορισμός (IFA) και η ISAgA (Πίνακας 3-1, σελ. 73). Η ISAgA IgM θεωρείται υψηλά ειδική και ευαίσθητη τεχνική για την ανίχνευση IgM αντισωμάτων, με ικανότητα ανίχνευσής τους για πολλούς μήνες μετά τη μόλυνση [Desmonts *et al.*, 1981; Desmonts, 1982; Holliman & Johnson, 1989; Šibalić *et al.*, 1993].

Εάν μία έγκυος δεν έχει ανιχνεύσιμα αντισώματα έναντι του *T. gondii* κατά την πρώτη της εξέταση, τότε δεν έχει μολυνθεί από το παράσιτο, και η επανάληψη της εξέτασης κάθε μήνα, εξασφαλίζει ανίχνευση ορομετατροπής, αφού παραμένει ο κίνδυνος να μολυνθεί. Εάν μία έγκυος παρουσιάσει IgG αντισώματα στην πρώτη της εξέταση, απαιτείται επανάληψη της εξέτασης, ώστε να διαχωριστεί η λανθάνουσα από την οξεία λοίμωξη [Lebech *et al.*, 1996]. Στην περίπτωση αυτή, παραμένει να διερευνηθεί η χρονική στιγμή έναρξης της μόλυνσης, αφού η φάση της ανόδου των IgG αντισωμάτων μπορεί να συνεχιστεί για πολλούς μήνες [Roberts *et al.*, 2001]. Η ανίχνευση ειδικών IgM αντισωμάτων υποδηλώνει πρόσφατη μόλυνση, αλλά ο τίτλος και ο χρόνος εμφάνισης και παραμονής τους εξαρτάται από την ευαισθησία της εξέτασης [Roberts *et al.*, 2001] και την ανοσολογική αντίδραση του κάθε ατόμου, η οποία δεν μπορεί να υπολογιστεί αφού διαφέρει από άνθρωπο σε άνθρωπο [Wong & Remington, 1994; Francis & Joyson, 1993; Joss, 1992; Bobić B, Šibalić & Djurković–Djaković, 1991]. Η εισαγωγή της ISAgA IgM μπορεί να διαλευκάνει κάποιες από τις περιπτώσεις εγκύων με παρουσία IgG χωρίς την παρουσία IgM αφού έχει ικανότητα ανίχνευσής τους για πολλούς μήνες μετά τη μόλυνση. Η ανίχνευση IgA μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σαν επιβεβαιωτικός δείκτης για την IgM [Roberts *et al.*, 2001]. Ακόμη και στις περιπτώσεις που ο χρόνος μόλυνσης της εγκύου είναι δυνατόν να καθοριστεί, παραμένει να διερευνηθεί η παρουσία συγγενούς μόλυνσης στο έμβρυο [Holliman 1994].

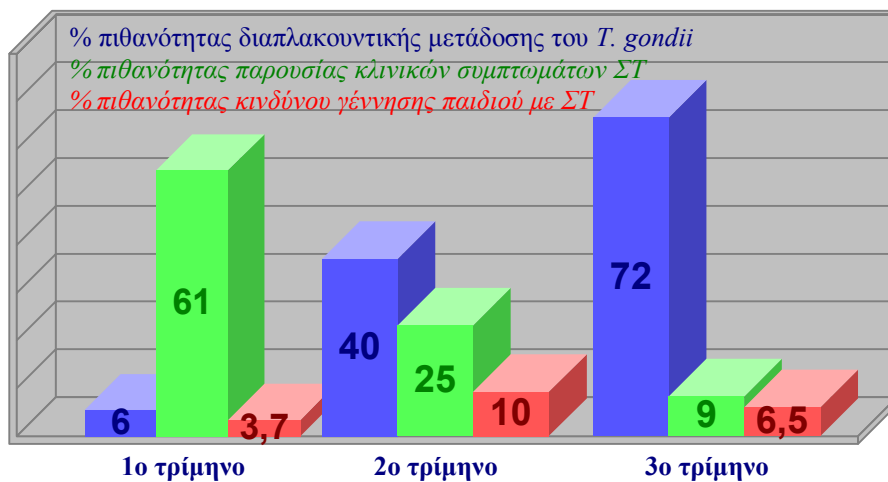
Φαίνεται λοιπόν, ότι ο ορολογικός έλεγχος αφήνει ερωτήματα τα οποία δεν μπορούν να απαντηθούν: (1) ο ακριβής προσδιορισμός της έναρξης της μόλυνσης

στην έγκυο γυναίκα, (2) η ανίχνευση συγγενούς μόλυνσης *in utero*, και (3) η ανίχνευση συγγενούς μόλυνσης κατά τη νεογνική περίοδο.

Πίνακας 3-1. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων των ορολογικών δοκιμασιών σε εγκύους.

IgG	IgM	IgA	ISAgA IgM	Ερμηνεία & Συμβουλή	
-	-	-	-	Δεν υπάρχει μόλυνση	Επανελέγχος κάθε μήνα
+	-	-	+	Πιθανή οξεία τοξοπλάσμωση το τελευταίο 6μηνο	Έχει μολυνθεί το έμβρυο;
+	+	+ ή -	+	Οξεία τοξοπλάσμωση	
-	+	+ ή -	+	Οξεία τοξοπλάσμωση	

-, αρνητικό; +, θετικό



Εικόνα 3-1. Πιθανότητα συγγενούς μόλυνσης και πιθανότητα ανάπτυξης σοβαρών συγγενών ανωμαλιών στο έμβρυο, ανάλογα με το στάδιο της κύησης κατά το οποίο συντελέστηκε η μόλυνση της εγκύου.

Μεθοδολογία

Ανάπτυξη Πρωτοκόλλου

Αναπτύχθηκε πρωτόκολλο για την παρακολούθηση εγκύων γυναικών, και για τον χειρισμό εκείνων με κίνδυνο να γεννήσουν παιδιά με ΣΤ (Εικόνα 3-2, σελ. 76). Η ορολογική απόδειξη πρωτογενούς μόλυνσης με *T. gondii* στην έγκυο, ορίστηκε ως (α) ορομετατροπή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, (β) σημαντική αύξηση (>3 φορές) του τίτλου των IgG αντισωμάτων σε διάρκεια 15 ημερών, (γ) την παρουσία ειδικών IgM ή IgA [Lebech *et al.*, 1996].

Από τις εγκύους οι οποίες πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια, ζητήθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος για PCR και καλλιέργεια έτσι ώστε να ανιχνευθεί παρασιταίμια, και επομένως να υπολογιστεί με ακρίβεια ο χρόνος της έναρξης της λοίμωξης της εγκύου. Στις γυναίκες με πιθανότητα να γεννήσουν παιδιά με ΣΤ χορηγήθηκε θεραπεία με spiramycin μέχρι το τέλος της κύησης, ενώ τα έμβρυα παρακολουθήθηκαν μηνιαία με υπερηχογράφημα. Η ΣΤ προσδιορίστηκε με PCR και καλλιέργεια στο αμνιακό υγρό, και ο προσδιορισμός της οδήγησε σε αλλαγή θεραπείας σε pyrimethamin, sulphadoxine, και folinic acid μέχρι το τέλος της κύησης. Η αλλαγή της θεραπείας πραγματοποιήθηκε μετά το πρώτο τρίμηνο λόγω της υψηλής της τοξικότητας [Bessières *et al.*, 2001].

Μετά τον τοκετό εξετάστηκε ο πλακούντας με PCR και καλλιέργεια, για την ανίχνευση ταχυζωιδίων του *T. gondii*. Στα νεογνά που γεννήθηκαν από μητέρες με υποψία οξείας τοξοπλάσμωσης κατά τη διάρκεια της κύησης, πραγματοποιήθηκε εκτενής κλινική εξέταση ενώ παρέμειναν στο νοσοκομείο για παρακολούθηση για μικρό χρονικό διάστημα. Παραγματοποιήθηκαν αιματολογικές και βιοχημικές εξετάσεις, οσφυϊκή διάτρηση, υπερηχογράφημα και βυθοσκόπηση. Πραγματοποιήθηκε ακτινογραφία εγκεφάλου, και σε περίπτωση ενδοκρανιακών ασβεστωμάτων ακολούθησε αξονική τομογραφία. Σε αναμονή των κλινικών και ορολογικών αποτελεσμάτων, χορηγήθηκε στα νεογνά θεραπεία αποτελούμενη από pyrimethamin, sulphadiazine και calcium folinate. Εάν τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά η θεραπεία διακόπτονταν, ενώ σε περίπτωση θετικών αποτελεσμάτων συνεχίστηκε για έναν χρόνο. Οι οροί από τις μητέρες και τα νεογνά τους συγκρίθηκαν με την τεχνική του Western blotting (WB) μετά τον τοκετό και τρεις μήνες αργότερα,

για τη διάγνωση ΣΤ. Τέλος, μετά τον τοκετό προσδιορίστηκε ο τίτλος των αντισωμάτων των νεογνών. Σε όλες τις ύποπτες περιπτώσεις τα νεογνά παρακολουθήθηκαν ορολογικά και κλινικά για έναν χρόνο.

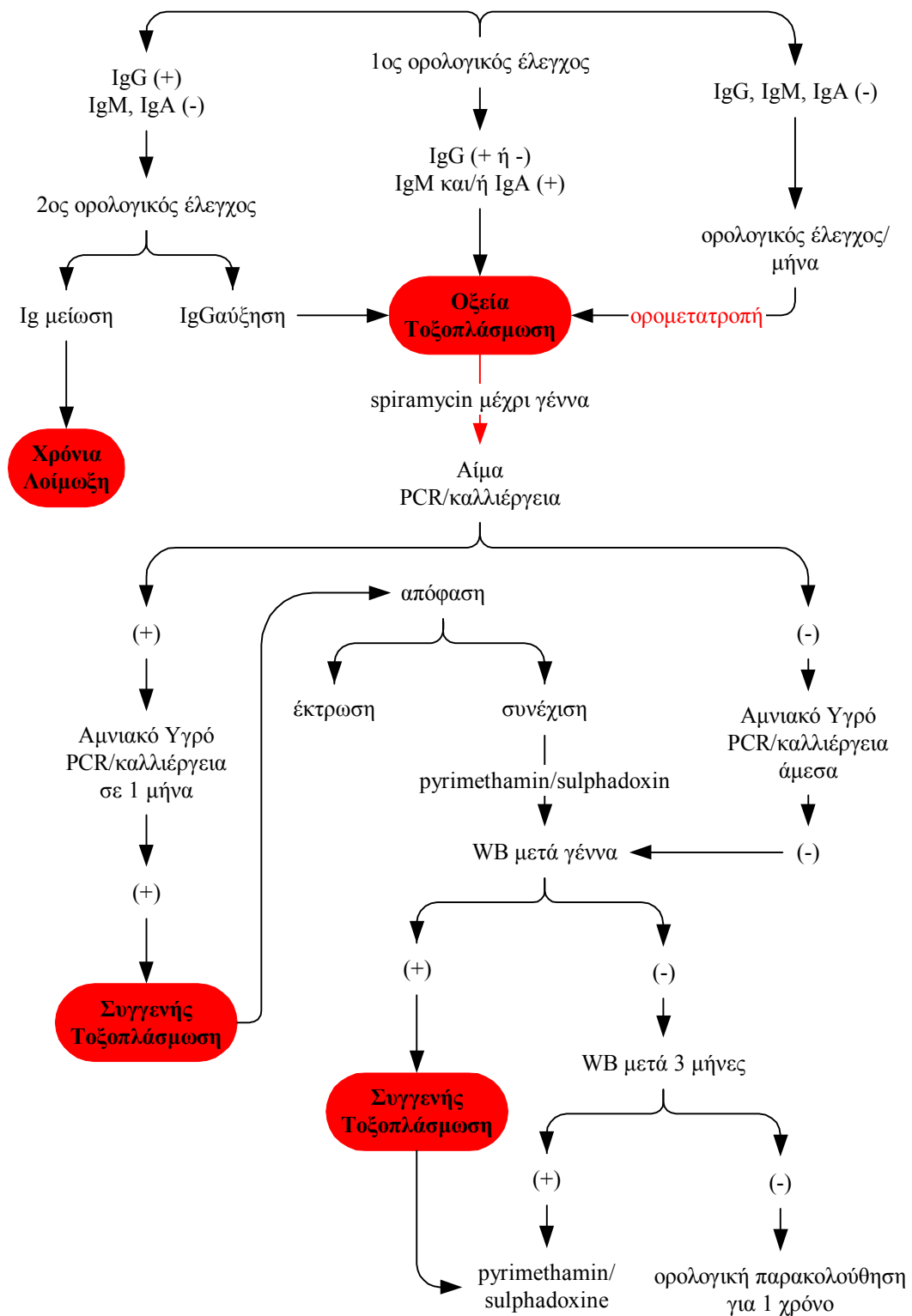
Δείγματα

Κατά το χρονικό διάστημα Αύγουστος 1998–Αύγουστος 2003, παρελήφθησαν στο Ορολογικό Τμήμα του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του ΠΑΓΝΗ, δείγματα από 5.532 γυναίκες σε διαφορετικά στάδια κύησης, για ορολογικό έλεγχο τοξοπλάσμωσης.

Από τις γυναίκες αυτές, 185 πληρούσαν τα κριτήρια για υποψία οξείας τοξοπλάσμωσης, και ελέγχθηκαν περαιτέρω (Πίνακας 3-2, σελ. 75). Η διαθεσιμότητα δειγμάτων αμνιακού υγρού εξαρτώνταν από τον χρόνο της κύησης. Συνολικά, εξετάστηκαν 185 δείγματα περιφερικού αίματος, 39 δείγματα αμνιακού υγρού, 19 πλακούντες, και οροί από 142 ζεύγη μητέρων–νεογνών με WB. Τα δείγματα προήλθαν κυρίως από την Γυναικολογική/Μαιευτική κλινική του ΠΑ.Γ.Ν.Η, και από το Βενιζέλειο Νοσοκομείο Ηρακλείου, από ιδιωτικές κλινικές του Ηρακλείου και την Μαιευτική κλινική Ιασώ της Αθήνας.

Πίνακας 3-2. Διαγνωστικές τεχνικές που εφαρμόστηκαν σε κάθε είδος δείγματος.

Δείγμα	PCR	Μικροσκοπικές		Καλλιέργειες		Western Blot
		Τεχνικές		MRC-5	Ποντίκια	
		IF	Giemsa			
Αίμα	✓	✓	✓	✓	✓	
Αμνιακό Υγρό	✓	✓	✓	✓	✓	
Πλακούντας	✓	✓	✓		✓	
Ορός						✓



Εικόνα 3-2. Πρωτόκολλο παρακολούθησης εγκύων γυναικών για τοξοπλάσμωση.

Ορολογικές Δοκιμασίες

Τα δείγματα εξετάστηκαν με την ορολογική δοκιμασία ήταν αυτή της enzyme-linked immunosorbent agglutination assay (ELISA) immunoglobulin G (IgG) (cut-off¹⁴: 9 IU), IgM, IgA (Alphadia, Belgium). Τα θετικά δείγματα εξετάστηκαν περαιτέρω με έμμεσο ανοσοφθορισμό (indirect immunofluorescence, IFA) IgM (cut-off: 1/50), IgG (cut-off: 1/1350) (Bios, Germany) και με την immunosorbent agglutination assay (ISAgA) IgM (cut-off: 7) (Biomerieux, France). Οι δοκιμασίες για την ανίχνευση αντισωμάτων IgM, έγιναν μετά από προσρόφιση των IgG και του ρευματοειδούς παράγοντα με GullSorb (Meridian, France). Οι δοκιμασίες της ELISA πραγματοποιήθηκαν στον αυτόματο αναλυτή ELISA, Triturus (Grifols, Spain), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

PCR

Από τα δείγματα περιφερικού αίματος συλλέχθηκαν τα λευκά αιμοσφαίρια με διαφορεική φυγοκέντρωση (παράρτημα 1.1.1, σελ. 153), τα δείγματα αμνιακού υγρού φυγοκεντρήθηκαν (παράρτημα 1.1.2, σελ. 154), και τα δείγματα πλακούντα τεμαχίστηκαν, επώαστηκαν με θρυψίνη και διηθήθηκαν (παράρτημα 1.1.3, σελ. 154). Στη συνέχεια, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε υποτονική λύση, και τα τελικά διαλύματα υποβλήθηκαν σε τρεις γύρους βρασμού-ψύξης (παράρτημα 1.5.1.a, σελ. 163).

Οι πολλαπλασιασμοί με τους εναρκτές TGB11, TGB12, και B1-1, B1-4 πραγματοποιήθηκαν σε μηχανή PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, USA). Είκοσι μl από κάθε προϊόν αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, και τα προϊόντα απεικονίστηκαν με φωτογραφική κάμερα (παράρτημα 1.5, σελ. 163).

Κάθε φορά, χρησιμοποιήθηκε αρνητικός μάρτυρας με στόχο την ανίχνευση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων ο οποίος αποτελούνταν από 30 μl κυρίου μείγματος PCR και 20 μl H₂O. Ο πρώτος θετικός μάρτυρας αποτελούνταν από 10³ παράσιτα *T. gondii* RH ενοφθαλμισμένα σε αντίστοιχο με το υπό εξέταση δείγμα, και αποσκοπούσε στην ανίχνευση αναστολής της PCR από εσφαλμένους χειρισμούς. Ο δεύτερος θετικός μάρτυρας (εσωτερικός μάρτυρας, ΕΣ) στόχευε στην ανίχνευση αναστολής της αντίδρασης από παράγοντες του δείγματος (όπως παρουσία ερυθρών),

¹⁴ **cut-off**: η ελάχιστη τιμή, πάνω από την οποία το αποτέλεσμα θεωρείται θετικό.

και αποτελούνταν από διπλότυπα των υπό εξέταση δειγμάτων, ενοφθαλμισμένων με 50 παράσιτα *T. gondii* RH. Στην επεξεργασία των κλινικών δειγμάτων, τηρήθηκε αυστηρός διαχωρισμός χώρων, μεταξύ των διαφορετικών τεχνικών σταδίων της PCR (εκχύλιση DNA, προετοιμασία αντιδράσεων, ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR), για την αποφυγή επιμόλυνσης [Kwok & Higuchi, 1989].

Καλλιέργεια σε Ινοβλάστες

Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά MRC-5 σε shell-vials για ενοφθαλμισμό των δειγμάτων. Μετά από επεξεργασία των δειγμάτων αίματος (παράρτημα 1.1.1, σελ. 153) και αμνιακού υγρού (παράρτημα 1.1.2, σελ. 154) κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε 2 shell-vials με συμπληρωμένη μονοστιβάδα MRC-5 (παράρτημα 1.2.6, σελ. 158). Μετά από 5 ημέρες, πραγματοποιήθηκαν ανοσοφθορισμός ή Giemsa στην καλυπτρίδα και το υπερκείμενο του ενός shell-vial (παράρτημα 1.4.2, 1.4.3, σελ. 163). Στην περίπτωση που ανιχνεύονταν παράσιτα *T. gondii*, πραγματοποιούνταν θρυψινοποίηση του δεύτερου φιαλιδίου, και ενοφθαλμισμός σε ποντίκια και νέα καλλιέργεια.

Καλλιέργεια σε Ποντίκια

Κάθε επεξεργασμένο δείγμα (όπως και για τις καλλιέργειες σε ινοβλάστες) ενοφθαλμίστηκε ενδοπεριτοναϊκά σε 2 θηλυκά ποντίκια balb/c (παράρτημα 1.3.2, σελ. 160). Πριν τον ενοφθαλμισμό πραγματοποιήθηκε αιμοσυγκόλληση σε αίμα από την ουρά τους [Desmonts & Remington, 1980], για να επιβεβαιωθεί η απουσία αντισωμάτων έναντι του *T. gondii* (παράρτημα 1.3.3, σελ. 161). Τα ποντίκια παρακολούθηθηκαν για εμφάνιση συμπτωμάτων νόσου (φωτοφοβία, κοκκίνισμα των ματιών, αδυναμία, αστάθεια κατά τη βάδιση). Εφόσον παρουσιάστηκαν συμπτώματα, πραγματοποιήθηκε άμεσα ενδοπεριτοναϊκή πλύση, και ενοφθαλμισμός του ενδοπεριτοναϊκού υλικού σε νέα ποντίκια. Πραγματοποιήθηκε επίσης χρώση Giemsa στο υλικό, για τον εντοπισμό παρασίτων *T. gondii* (παράρτημα 1.4.2, σελ. 162). Απουσία συμπτωμάτων αρρώστιας μετά από 5 ημέρες, πραγματοποιήθηκε εκ νέου αιμοσυγκόλληση για να διαπιστωθεί ανάπτυξη τοξοπλάσμωσης. Εάν όλα ήταν αρνητικά, μετά το πέρας 2 μηνών τα ζώα θυσιάστηκαν και εξετάστηκε ο εγκέφαλός τους για την παρουσία κύστεων *T. gondii*.

Άμεση Παρατήρηση

1–2 σταγόνες από τα δείγματα, τα οποία ενοφθαλμίστηκαν σε καλλιέργειες και ποντίκια, μονιμοποιήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες, και πραγματοποιήθηκε άμεσος ανοσοφθορισμός και χρώση Giemsa (παράρτημα 1.4, σελ. 162).

Western Blotting

Το WB είναι μία τεχνική με την οποία καθίσταται δυνατή η ποιοτική σύγκριση των αντισωμάτων της μητέρας και του νεογνού, και επομένως η ανίχνευση ΣΤ. Το αντιγόνο τοξοπλάσματος παρασκευάστηκε από καλλιέργεια του *T. gondii* RH σε MRC–5 ινοβλάστες (παράρτημα 1.2.3, σελ. 157), διαχωρισμό των ταχυζωιδίων από τους ινοβλάστες (παράρτημα 1.2.4, σελ. 157) και διάσπασή τους με υπέρηχους (παράρτημα 1.7.1, σελ. 167). Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ολικής πρωτεΐνης έγινε με τη μέθοδο Bradford (παράρτημα 1.7.1.a, σελ. 167).

Παρασκευάστηκε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με πυκνότητα 12% στο οποίο ηλεκτροφορήθηκε το αντιγόνο του *T. gondii* [Sharma *et al.*, 1983] (παράρτημα 1.7.2, σελ. 167). Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα αποτυπώθηκε σε νιτροκυτταρίνη με συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών (semi-dry transfer apparatus, Hoefer Scientific instruments, USA). Τα δείγματα επώαστηκαν με την νιτροκυτταρίνη και στη συνέχεια με αντί-ανθρώπινα αντισώματα IgG, IgM, και IgA σημασμένα με αλκαλική φωσφατάση. Η εμφάνιση πραγματοποιήθηκε με διάλυμα NBT/BCIP (παράρτημα 1.7.3, σελ. 168), και η ερμηνεία έγινε όπως έχει περιγραφεί [Chumpitazi *et al.*, 1995; Franck *et al.*, 1992].

Αποτελέσματα

Κατά τη διάρκεια των 5 χρόνων της εφαρμογής του πρωτοκόλλου, εξετάστηκαν και παρακολουθήθηκαν 5.532 έγκυες γυναίκες, σε διαφορετικά στάδια κύησης κατά τον πρώτο τους ορολογικό έλεγχο. Από τις γυναίκες αυτές, 3.904 (70,57%) ήταν οροαρνητικές για μόλυνση από *T. gondii*, και παρακολουθήθηκαν μηνιαία για ανίχνευση πιθανής ορομετατροπής, η οποία αποδείχθηκε μόνο σε μία περίπτωση (0,03%), κατά τον 8^ο μήνα της κύησης.

Συνολικά, 1.628 (29,45%) έγκυες γυναίκες βρέθηκαν οροθετικές κατά τον πρώτο τους ορολογικό έλεγχο με ELISA IgG, και πραγματοποιήθηκαν επιπλέον

εξετάσεις (Πίνακας 3-3, σελ. 80). Η ανάλυση των ορολογικών αποτελεσμάτων έγινε λαμβάνοντας υπ' όψη την ηλικία κύησης και την παρουσία πρόσφατων κλινικών συμπτωμάτων, σχετιζομένων με τοξοπλάσμωση, στην έγκυο. Από την ανάλυση αυτή, προέκυψαν 185 έγκυες γυναίκες (Πίνακας 3-4, σελ. 82) οι οποίες πληρούσαν τα κριτήρια που τέθηκαν για την παρουσία οξείας λοίμωξης με *T. gondii* κατά τη διάρκεια της κύησης, και επομένως θεωρήθηκε ότι διατρέχουν κίνδυνο να γεννήσουν παιδιά με ΣΤ. Η οξεία λοίμωξη επιβεβαιώθηκε συνολικά σε 6 (3,24%) από τις 185 γυναίκες (Πίνακας 3-5, σελ. 81): με την ανίχνευση παρασιταϊμίας με PCR σε 5 δείγματα περιφερικού αίματος, την ανίχνευση διαπλακουντικής μετάδοσης σε 1 δείγμα αμνιακού υγρού το οποίο προήλθε από γυναίκα με αρνητική PCR στο περιφερικό αίμα (Εικόνα 3-3, σελ. 82). Δεν απομονώθηκε *T. gondii* σε καλλιέργειες. Τα ορολογικά αποτελέσματα των 6 γυναικών με αποδεδειγμένη ορομετατροπή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης παρατίθενται σε πίνακα (Πίνακας 3-6, σελ. 81).

Μετά τον τοκετό, εξετάστηκαν 19 πλακούντες με PCR και καλλιέργεια για τον εντοπισμό παρασίτων του *T. gondii*, και όλοι αποδείχθηκαν αρνητικοί. 142 νεογνά εξετάστηκαν με WB κατά τη γέννησή τους, και τρεις μήνες αργότερα, και με μηνιαίες ορολογικές εξετάσεις για έναν χρόνο. Κανένα νεογνό δεν αποδείχτηκε ορολογικά θετικό για ΣΤ (Εικόνα 3-4, σελ. 82) ούτε υπήρξαν κλινικά συμπτώματα που να υπονοούν ΣΤ.

Πίνακας 3-3. Αποτελέσματα ορολογικών εξετάσεων σε 1.628 οροθετικές εγκύους.

IgG	ELISA		IFA		ISAgA
	IgM	IgA	IgM	IgG	IgM
100%	8,17%	3,50%	2,46%	44,04%	9,71%

Πίνακας 3-4. Συνολική ανάλυση ορολογικής εικόνας των 185 εγκύων γυναικών με υποψία οξείας τοξοπλάσμωσης.

Θετικές Ορολογικές Δοκιμασίες	Ποσοστό %
IgG, ISAgA IgM	44,32%
IgM, IgG, ISAgA IgM	32,97%
IgM, IgG, IgA, ISAgA IgM	10,81%
IgA, IgG, ISAgA IgM	9,19%
IgA	2,7%

Πίνακας 3-5. Ανάλυση ποσοστών οξείας και υποψίας οξείας τοξοπλάσμωσης σε σχέση με το συνολικό εξεταζόμενο πληθυσμό και τον αριθμό των οροθετικών εγκύων.

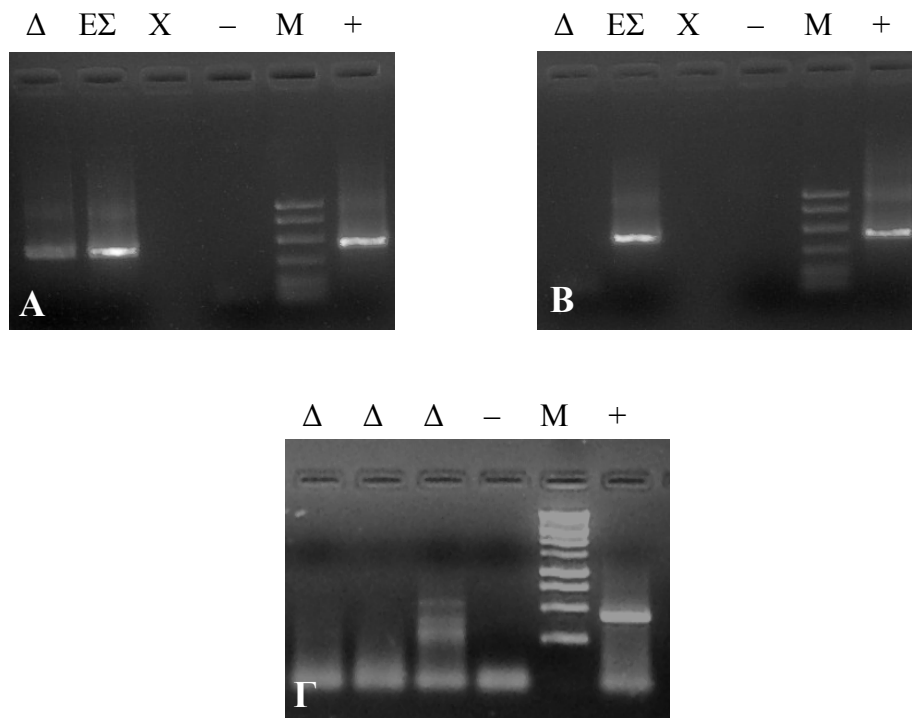
	Σύνολο (5.532)	Οροθετικές (1.628)	YOT (185)
Υποψία Οξείας Τοξοπλάσμωσης (YOT)	3,34%	11,36%	ΔΕ
Αποδεδειγμένη ΟΤ	0,09%	0,31%	2,7%
Διαπλακουντική Μετάδοση	0,02%	0,06%	0,54%

YOT, υποψία οξείας τοξοπλάσμωσης; ΔΕ, δεν εφαρμόζεται

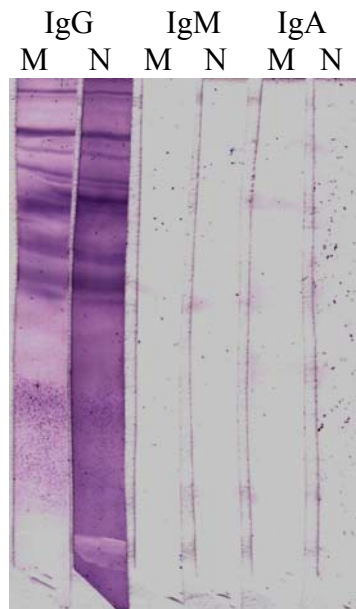
Πίνακας 3-6. Ανάλυση ορολογικών εξετάσεων των εγκύων με θετική PCR.

Δείγμα	Εξέταση				Εβδομάδα κύησης
	ELISA		ISAgA		
	IgG	IgM	IgA	IgM	
AM	+	-	-	+	16
A	+	-	-	+	11
A	+	-	-	+	8
A	+	+	-	+	32
A	+	+	-	+	19
A	+	+	+	+	12

A, αίμα; AM, αμνιακό υγρό; +, θετικό; -, αρνητικό



Εικόνα 3-3. Αποτελέσματα PCR. (Α) θετικό δείγμα, (Β) αρνητικό δείγμα, (Γ) αμφίβολο αποτέλεσμα (δείγμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις). Δ, δείγμα; ΕΣ, εσωτερικός μάρτυρας; X, κενό πηγάδι; -, αρνητικός μάρτυρας; +, θετικός μάρτυρας; M, μάρτυρας μοριακού βάρους DNA (Promega PCR marker, 1.000, 750, 500, 300, 150, 50).



Εικόνα 3-4. Αρνητικό Western Blotting σε ορό μητέρας και του νεογνού της. M, μητέρα; N, νεογνό.

Συζήτηση

Ο επιπολασμός της τοξοπλάσμωσης στην Ελλάδα κυμαίνεται από 37–51% σε γυναίκες σε ηλικία αναπαραγωγής [Decavalas *et al.*, 1990; Gatoroulou *et al.*, 1997; Lolis *et al.*, 1996], ενώ στον γενικό πληθυσμό από 33–45% [Antonίου *et al.*, 1997; 2002; Charvalos *et al.*, 1995]. Στην παρούσα μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε στο νομό Ηρακλείου της Κρήτης, ο επιπολασμός της τοξοπλάσμωσης μεταξύ εγκύων γυναικών καταγράφεται στο 29,4%.

Η μεγάλη διάδοση του *T. gondii* στην Ελλάδα, θα μπορούσε να θέσει σε κίνδυνο πολλές εγκυμοσύνες λόγω οξείας τοξοπλάσμωσης κατά τη διάρκεια της κύησης. Εντούτοις, στην Ελλάδα, δεν υφίσταται υποχρεωτικό πρόγραμμα ελέγχου εγκύων γυναικών για τοξοπλάσμωση, όπως υπάρχει στην Αυστρία και τη Γαλλία από το 1975 και το 1978, αντίστοιχα [Aspöck & Pollak, 1992; Thulliez, 1992]. Σε πολλές περιπτώσεις, οι γυναίκες δεν επισκέπτονται τον γυναικολόγο τους πριν ή αμέσως αφού διαπιστώσουν την εγκυμοσύνη τους, με συνέπεια να πραγματοποιούν την πρώτη τους ορολογική εξέταση για *T. gondii* σε προχωρημένο στάδιο κύησης. Το αποτέλεσμα αυτής της πρακτικής είναι ότι ένας υψηλός τίτλος αντισωμάτων IgG και/ή η παρουσία αντισωμάτων IgM, να ερμηνεύονται σαν οξεία τοξοπλάσμωση και κατ'επέκταση υποψία συγγενούς τοξοπλάσμωσης (ΣΤ). Έτσι, πολλές εγκυμοσύνες οδηγούνται σε τερματισμό, ή γίνεται περιττή χορήγηση τοξικών θεραπειών. Με τα δεδομένα αυτά, κρίνεται αναγκαία η χάραξη στρατηγικής για τον χειρισμό κύσεων με πιθανότητα γέννησης παιδιών με ΣΤ. Ένα τέτοιο πρωτόκολλο αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε για περίοδο 5 χρόνων, και αποδείχτηκε εξαιρετικά χρήσιμο.

Το πρωτόκολλο σχεδιάστηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να διευκολύνει τη μετάβαση μεταξύ των απαραίτητων διαγνωστικών βημάτων για τον διαχωρισμό οξείας από λανθάνουσα λοίμωξη. Βοήθησε τους κλινικούς γιατρούς να προσφέρουν συμβουλή βασισμένη σε ολοκληρωμένα εργαστηριακά δεδομένα, γεγονός που οδήγησε σε μείωση της ανησυχίας των κλινικών και του ζευγαριού για την έκβαση της κύησης. Το πρωτόκολλο επεξεργάζεται σε συνδυασμό τα αποτελέσματα των ορολογικών εξετάσεων, της PCR και των καλλιιεργειών, την ηλικία της κύησης και την παρουσία κλινικών συμπτωμάτων στην έγκυο, το έμβρυο και το νεογνό.

Στο διάστημα των 5 χρόνων παρακολουθήθηκαν 5.532 έγκυες γυναίκες. Ορομετατροπή διαγνώστηκε σε μία μόνο περίπτωση η οποία προέκυψε από την μηνιαία ορολογική παρακολούθηση των 3.904 οροαρνητικών εγκύων. Εντούτοις, διαγνώστηκαν επιπλέον 4 περιπτώσεις με παρασιταϊμία και μία περίπτωση διαπλακουντικής μετάδοσης του *T. gondii*, οδηγώντας σε σύνολο 6 γυναικών με αποδεδειγμένη ορομετατροπή κατά τη διάρκεια της κύησης (0,11%). Το ποσοστό αυτό όμως είναι πιθανόν υποτιμημένο. Εάν θεωρηθεί ότι 185 γυναίκες πληρούσαν τα ορολογικά κριτήρια υποψίας οξείας τοξοπλάσμωσης, προκύπτει ρυθμός ορομετατροπής 3,34% κατά τη διάρκεια της κύησης. Το ποσοστό αυτό πλησιάζει αυτό της Γαλλίας (4–5%), μία χώρα με υψηλή οροθετικότητα [Bessières et al., 2001].

Το πρωτόκολλο που παρουσιάζεται, συνετέλεσε στη μείωση των εκτρώσεων λόγω υποψίας οξείας τοξοπλάσμωσης. Όλες οι κύσεις εξελίχτηκαν κανονικά μέχρι το τέλος, εκτός από μία. Η κύηση η οποία διακόπηκε αφορούσε σε έγκυο γυναίκα με τρίδυμο κύηση η οποία προέκυψε από τεχνητή γονιμοποίηση. Στο τέλος του πρώτου τριμήνου της κύησης παρουσίασε αυτόματη αποβολή του ενός εμβρύου με βαριά αιμορραγία. Η έγκυος είχε εκτεταμένη λεμφαδενοπάθεια, και δεν είχε εξεταστεί στο παρελθόν για *T. gondii*. Οι ορολογικές εξετάσεις έδειξαν αυξανόμενο τίτλο IgG και παρουσία IgM αντισωμάτων, ενώ η PCR στο περιφερικό αίμα ήταν θετική. Το ζευγάρι αποφάσισε να τερματίσει την εγκυμοσύνη, αλλά το υλικό της απόξεσης δεν ήταν διαθέσιμο για περαιτέρω διερεύνηση. Σε σπάνιες περιπτώσεις πολύδυμων κύσεων, είναι δυνατόν μόνο το ένα έμβρυο να αναπτύξει τη μόλυνση [Tjalma et al., 1998].

Η εμφάνιση σοβαρών κλινικών συμπτωμάτων στα έμβρυα παρακολουθήθηκε με υπερηχογράφημα σε μηνιαία βάση, σε όλες τις περιπτώσεις εγκύων με υποψία οξείας τοξοπλάσμωσης, ακόμα και στις περιπτώσεις που η PCR στο αμνιακό υγρό ήταν αρνητική [Gay-Andrieu et al., 2003]. Επιπλέον, μετά τον τοκετό όλα τα νεογνά υποβλήθηκαν σε λεπτομερή κλινική εξέταση, και παρακολουθήθηκαν ορολογικά για έναν χρόνο για τον έλεγχο του τίτλου των αντισωμάτων τους, αφού η ΣΤ ορίζεται από την επιμονή των IgG αντισωμάτων στο νεογνό για περισσότερο από ένα χρόνο από τη γέννηση [Dunn et al., 1999; Lebech et al., 1999]. Σε 142 περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε WB αμέσως μετά τον τοκετό και 3 μήνες αργότερα, με σκοπό τη σύγκριση των αντισωμάτων της μητέρας και του νεογνού, αφού τα νεογνικά

αντισώματα αναγνωρίζουν διαφορετικό εύρος αντιγόνων του *T. gondii* από αυτά της μητέρας [Chumpitazi *et al.*, 1995; Tissot *et al.*, 2003; Pinon *et al.*, 1996]. Όλα τα 179 νεογνά που γεννήθηκαν από μητέρες με υποψία οξείας τοξοπλάσμωσης, και τα 5 νεογνά που γεννήθηκαν από μητέρες με αποδεδειγμένη οξεία τοξοπλάσμωση κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, βρέθηκαν αρνητικά για ΣΤ. Η έγκαιρη και συνεχής, μέχρι το τέλος της εγκυμοσύνης, χορήγηση spiramycin μπορεί να εμπόδισε την διαπλακουντική μετάδοση στις 4 περιπτώσεις παρασιταϊμίας, αλλά και στις υπόλοιπες 179 περιπτώσεις γυναικών με ορολογική εικόνα οξείας τοξοπλάσμωσης [Wallon *et al.*, 1999]. Σε μία έγκυο γυναίκα, με θετική PCR στο αμνιακό υγρό η οποία διένυε το τρίτο τρίμηνο κύησης, χορηγήθηκε pyrimethamine-sulphadoxine [Remington & Klein, 1995; Wallon *et al.*, 1999; Couvreur *et al.*, 1991; Bessières *et al.*, 1996].

Η ορολογική εξέταση πρώτης γραμμής ήταν αυτή της ELISA (IgG, IgM, IgA) μια και θεωρείται πολύ ευαίσθητη [Chumpitazi *et al.*, 1995], ενώ όλα τα θετικά δείγματα επιβεβαιώθηκαν με IF (IgG, IgM) και ISAgA (IgM). Η ISAgA θεωρείται υψηλά ειδική και ευαίσθητη τεχνική για την ανίχνευση IgM αντισωμάτων, με ικανότητα ανίχνευσής τους για πολλούς μήνες μετά τη μόλυνση [Desmonts *et al.*, 1981; Desmonts, 1982; Holliman & Johnson, 1989; Šibalić *et al.*, 1993]. Ακόμα και με την παρουσία υψηλού τίτλου αντισωμάτων IgG, η αρνητική ISAgA IgM μπορεί να αποκλείσει την πιθανότητα ΣΤ σε γυναίκες που βρίσκονται σε πρώιμα στάδια της κύησής τους.

Το γονίδιο B1 του *T. gondii* απαντάται σε 35 συνεχείς επαναλήψεις στο γονιδίωμά του, και έχει χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση του *T. gondii* σε διάφορα βιολογικά υλικά [Burg *et al.*, 1989; Grover *et al.*, 1990]. Στη μελέτη αυτή, σχεδιάστηκε ένα νέο ζεύγος εναρκτών και βελτιστοποιήθηκε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο το οποίο κάνει χρήση της απάλλειψης επιμόλυνσης με dUTP/UDG [Antoniou *et al.*, 2003]. Το πρωτόκολλο βελτιστοποιήθηκε για την ανίχνευση του *T. gondii* σε δείγματα περιφερικού αίματος, αμνιακού υγρού και πλακούντα. Οι ιατρικές συνέπειες των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων είναι ιδιαίτερα σημαντικές. Έτσι, ο βαθμός εμπιστοσύνης στα θετικά και αρνητικά αποτελέσματα πρέπει να καταγράφεται. Στην μελέτη αυτή, τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα ελέγχθηκαν από θετικούς μάρτυρες που αποτελούνταν από διπλότυπα των υπό εξέταση δειγμάτων μολυσμένα με παράσιτα *T. gondii*. Τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα ελέγχονταν με τη

χρήση αρνητικών μαρτύρων που αποτελούνταν από νερό, και με τη χρήση του πρωτοκόλλου dUTP/UDG [Thornton *et al.*, 1992; Longo *et al.*, 1990].

Τα αρνητικά αποτελέσματα της PCR και των καλλιιεργειών των υπόλοιπων 179 εγκύων γυναικών για τις οποίες υπήρχε υποψία οξείας τοξοπλάσμωσης, μπορούν να αποδοθούν στο γεγονός ότι η μόλυνση μπορεί να έλαβε χώρα πριν ή νωρίς κατά την κύηση, ή στο ότι η παρασιταϊμία δεν είχε αρκετή διάρκεια. Επιπλέον, η μικρή ποσότητα του αμνιακού υγρού διαθέσιμη σε κάθε περίπτωση, και η πιθανή τοξικότητα των λευκών αιμοσφαιρίων στους ινοβλάστες είναι δυνατόν να επιτρέψουν την απομόνωση μόνο του 40% των στελεχών του *T. gondii* [Hitt & Filice, 1992]. Παρά την μειωμένη ευαισθησία της καλλιέργειας σε ινοβλάστες, συνιστάται να χρησιμοποιούνται και οι δύο τεχνικές σε συνδυασμό [Hohlfeld *et al.*, 1994; Romand *et al.*, 2001].

Ο υψηλός επιπολασμός του *T. gondii* στην Ελλάδα μπορεί να εξηγηθεί από την παρουσία μεγάλου αριθμού αδέσποτων γατών στις αστικές αλλά και στις αγροτικές περιοχές της χώρας. Τα ζώα αυτά τρέφονται με τρωκτικά και πουλιά, με αποτέλεσμα να μολύνονται, και κατά συνέπεια να αποβάλλουν εκατομμύρια ωοκύστεων στο περιβάλλον [Dubey & Beatie, 1988]. Η Ελληνική διαίτα, η οποία αποτελείται από μεγάλες ποσότητες ομών, άγριων λαχανικών και χόρτων τα οποία θα μπορούσαν εύκολα να είναι μολυσμένα με ωοκύστες του παρασίτου παίζει επίσης σημαντικό ρόλο. Επιπλέον, υπάρχει μεγάλη κατανάλωση αρνίσιου, χοιρινού, κατσικίσιου, πρόβιου κρέατος, και λουκάνικων ή καπνιστού κρέατος, όλα καταγεγραμμένες πηγές μόλυνσης από *T. gondii* [Edelhofer, 1994; Warnekulasuriva *et al.*, 1998]. Έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί στον Ελλαδικό χώρο σε ζώα, έχουν δείξει επιπολασμό 40% σε βοοειδή [Kritsepi-Konstantinou, 1992], 14–21,3% σε αίγες και 23–27,6% σε πρόβατα [Stefanakis & Bizake, 1993; Stefanakis *et al.*, 1995].

Πιστεύεται ότι ο συνδυασμός προγεννητικού και νεογνικού ελέγχου οδηγεί στην αναγνώριση της πλειοψηφίας των μολυσμένων νεογνών [Bessières *et al.*, 2001, Roberts *et al.*, 2001], και ότι η έγκαιρη χορήγηση θεραπείας μπορεί να αποτρέψει ή να μειώσει τη διαπλακουντική μετάδοση και τα κλινικά συμπτώματα [Wallon *et al.*, 1999, Bessières *et al.*, 2001]. Η κατάσταση της ορομετατροπής σπάνια βεβαιώνεται εκτός ενός προγράμματος προγεννητικού ελέγχου, πρόγραμμα το οποίο δεν υφίσταται στην Ελλάδα, παρά το γεγονός ότι ο επιπολασμός της νόσου είναι υψηλός. Στην

Ελλάδα, με πιθανό ρυθμό ορομετατροπής 0,11–3,34% και με το 70% των γυναικών σε κίνδυνο να αναπτύξουν οξεία τοξοπλάσμωση κατά τη διάρκεια της κύησης, η εισαγωγή ενός περιγεννητικού προγράμματος για την διαφοροδιάγνωση οξείας από λανθάνουσα μητρική τοξοπλάσμωση και χειρισμού των γυναικών οι οποίες διατρέχουν κίνδυνο να γεννήσουν παιδιά με ΣΤ, είναι δικαιολογημένη.

Κεφάλαιο 4

Διάγνωση Τοξοπλάσμωσης σε Ασθενείς με HIV

Εισαγωγή

Το *T. gondii* είναι ένα ευρέως διαδεδομένο ενδοκυττάριο παράσιτο. Μέχρι πρόσφατα, η εγκεφαλική τοξοπλάσμωση ήταν μία σχετικά σπάνια διαταραχή. Με την εμφάνιση του ιού της επίκτητης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (HIV) και την επακόλουθη έλευση του AIDS, η διάδοση της εγκεφαλικής τοξοπλάσμωσης έχει αυξηθεί, καθιστώντας την ως την κύρια αιτία εγκεφαλίτιδας. Σε όλο τον κόσμο, το *T. gondii* προκαλεί σοβαρή εγκεφαλίτιδα στο 40% των ασθενών με HIV, ενώ το 10–30% των ασθενών αυτών υποκύπτουν στη νόσο [Luft, 1989; Ho–Yen, 1992]. Παράλληλα με την αναζωπύρωση της λανθάνουσας τοξοπλάσμωσης, οι ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς διατρέχουν κίνδυνο οξείας μόλυνσης από *T. gondii*, η οποία συχνά παρουσιάζεται σαν πνευμονική νόσος ή διάχυτη εγκεφαλίτιδα [Luft, 1989].

Παρά την ευρεία διάδοση της νόσου, η οριστική διάγνωση της τοξοπλασμικής εγκεφαλίτιδας (TE) σε ασθενείς με HIV παραμένει προβληματική. Οριστική διάγνωση μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο με βιοψία εγκεφάλου και μικροσκοπική αναγνώριση ταχυζωιδίων του *T. gondii*. Συχνά όμως, η διάγνωση βασίζεται σε ευρήματα αξονικής τομογραφίας και στην ανταπόκριση σε ειδική θεραπεία, η οποία αποτελεί ακόμα τον «χρυσό κανόνα», παρά το γεγονός ότι έχει αποδειχθεί άσκοπη στο 40% των περιπτώσεων [Raffi *et al.*, 1997]. Επιπλέον, τα αποτελέσματα ανταπόκρισης στην ειδική αντι-τοξοπλασμική θεραπεία εμφανίζονται, στην καλύτερη περίπτωση, μετά από μερικές ημέρες ή εβδομάδες [Lerport *et al.*, 1988; Porter & Sande, 1992]. Λόγω του ότι οι ασθενείς με HIV παρουσιάζουν συχνά σοβαρές παρενέργειες στην αντι-τοξοπλασμική θεραπεία, υπάρχει ανάγκη διαφοροδιάγνωσης της TE από άλλες επιπλοκές του ΚΝΣ. Έτσι, είναι σημαντικό να

υπάρχουν αποτελεσματικοί δείκτες πρόβλεψης ανάπτυξης TE διαθέσιμοι στον κλινικό γιατρό, ο οποίος πρόκειται να ξεκινήσει εμπειρική θεραπεία σε έναν ασθενή με HIV στη βάση μόνο κλινικών και / ή ακτινολογικών ευρημάτων. Έχει βρεθεί ότι τα παρακάτω κριτήρια συμβάλλουν ανεξάρτητα στη διάγνωση της TE: απουσία χημειο-προφύλαξης για TE, κεφαλαλγία, επιληπτικές κρίσεις, και αξονική ή μαγνητική τομογραφία [Raffi *et al.*, 1997]. Η αρνητική ορολογική εικόνα έναντι του *T. gondii* αποκλείει την TE [Raffi *et al.*, 1997].

Ο επιπολασμός της τοξοπλάσμωσης στην Ελλάδα είναι υψηλός (Κεφάλαιο 1, σελ. 44), και επομένως η πιθανότητα ανάπτυξης οξείας τοξοπλάσμωσης σε ασθενείς με HIV, λόγω αναζωπύρωσης λανθάνουσας τοξοπλάσμωσης, είναι αυξημένη.

Η σημασία της παρουσίας υψηλών τίτλων IgG αντισωμάτων σε ασθενείς μολυσμένους με HIV δεν έχει αποσαφηνιστεί, ενώ η παρουσία αντισωμάτων IgM, IgA και IgE δεν είναι διαγνωστική [Raffi *et al.*, 1999; Sulahian *et al.*, 1993; Luft *et al.*, 1984]. Η τυποποίηση μίας εργαστηριακής διαγνωστικής μεθόδου η οποία θα καθιστά δυνατή την αναγνώριση επανενεργοποιημένης μόλυνσης και τον διαχωρισμό της από την οξεία νόσο σε ασθενείς με HIV, θα επιτρέψει την ορθή και έγκαιρη χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής με την οποία η έκταση των εγκεφαλικών ζημιών μπορεί να περιοριστεί σε μεγάλο βαθμό [Luft *et al.* 1993].

Η τεχνική του Western Blotting (WB) έχει διευκολύνει σημαντικά τη μελέτη της αντιγονικής σύνθεσης νοσογόνων οργανισμών, καθώς και την ποιότητα και ποσότητα της ανοσολογικής απάντησης σε αυτά τα αντιγόνα [Gershoni & Palade, 1983]. Σε μελέτες σε ασθενείς με τοξοπλάσμωση η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στον χαρακτηρισμό των αντιγόνων έναντι των οποίων παράγονται αντισώματα σε ενήλικες με οξεία τοξοπλάσμωση [Potasman *et al.*, 1986], σε ενήλικες με λανθάνουσα τοξοπλάσμωση [Sharma *et al.*, 1983; Partanen *et al.*, 1984], και σε συγγενώς μολυσμένα νεογνά [Remington *et al.*, 1985]. Στην παρούσα μελέτη, το WB χρησιμοποιήθηκε για να διαπιστωθεί εάν ασθενείς με HIV μπορούν να αναγνωρίσουν, ποιοτικά, ειδικά αντιγόνα τα οποία θα διαχώριζαν την TE (αντιγόνα ταχυζωιδίων) από τη λανθάνουσα λοίμωξη (αντιγόνα βραδυζωιδίων), και επομένως θα διευκόλυναν την μη-επιθετική διάγνωση της TE σε αυτή την κατηγορία ασθενών. Παράλληλα, εφαρμόστηκε η τεχνική της PCR που αναπτύχθηκε, και η μέθοδος των

ιστοκαλλιεργείων σε βιολογικά υλικά ασθενών με θετική ορολογική εικόνα τοξοπλάσμωσης.

Μεθοδολογία

Δείγματα

Κατά το χρονικό διάστημα Αύγουστος 2001–Αύγουστος 2003, εξετάστηκαν 476 δείγματα από 238 ασθενείς με AIDS. Αναλυτικότερα, 238 δείγματα ορών, 214 δείγματα buffy coat, και 24 δείγματα περιφερικού αίματος. Τα δείγματα προήλθαν από το Α' Ιατρείο του ΙΚΑ Αθήνας, και από από την Α' Παθολογική Κλινική του ΠΑΓΝΗ. Πραγματοποιήθηκε PCR σε όλα τα δείγματα buffy coat και περιφερικού αίματος. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν ιστοκαλλιέργειες σε 54 δείγματα buffy coat (τα υπόλοιπα ήταν ακατάλληλα για καλλιέργεια καθώς είχαν διατηρηθεί στους -20°C μέχρι την αποστολή τους) και στα 24 δείγματα περιφερικού αίματος. Δεν πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε ποντίκια, λόγω της απουσίας ασφαλούς χώρου για τη φύλαξή τους.

Ορολογικές Δοκιμασίες

Η πρώτη ορολογική δοκιμασία ήταν αυτή της enzyme-linked immunosorbent agglutination assay (ELISA) immunoglobulin G (IgG) (cut-off: 9 IU), IgM, IgA (Alphadia, Belgium). Οι δοκιμασίες για την ανίχνευση αντισωμάτων IgM, έγιναν μετά από προσρόφηση των IgG και του ρευματοειδούς παράγοντα με GullSorb (Meridian, France). Οι δοκιμασίες της ELISA πραγματοποιήθηκαν στον αυτόματο αναλυτή ELISA, Triturus (Grifols, Spain), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

PCR

Από τα δείγματα περιφερικού αίματος συλλέχθηκαν τα λευκά αιμοσφαίρια με διαφορική φυγοκέντρηση (παράρτημα 1.1.1, σελ. 153) τα δείγματα buffy coat φυγοκεντρήθηκαν. Στη συνέχεια, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε υποτονική λύση, και τα τελικά διαλύματα υποβλήθηκαν σε τρεις γύρους βρασμού-ψύξης (παράρτημα 1.5.1.a, σελ. 163).

Οι πολλαπλασιασμοί με τους εναρκτές TGB11, TGB12, και B1-1, B1-4 πραγματοποιήθηκαν σε μηχανή PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, USA). Είκοσι μl από κάθε προϊόν αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, και τα προϊόντα απεικονίστηκαν με φωτογραφική κάμερα (παράρτημα 1.5, σελ. 163).

Κάθε φορά, χρησιμοποιήθηκε αρνητικός μάρτυρας με στόχο την ανίχνευση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων ο οποίος αποτελούνταν από 30 μl κυρίου μείγματος PCR και 20 μl H₂O. Ο πρώτος θετικός μάρτυρας αποτελούνταν από 10³ παράσιτα *T. gondii* RH ενοφθαλμισμένα σε αντίστοιχο με το υπό εξέταση δείγμα, και αποσκοπούσε στην ανίχνευση αναστολής της PCR από εσφαλμένους χειρισμούς. Ο δεύτερος θετικός μάρτυρας (εσωτερικός μάρτυρας, ΕΣ) στόχευε στην ανίχνευση αναστολής της αντίδρασης από παράγοντες του δείγματος (όπως παρουσία ερυθρών), και αποτελούνταν από διπλότυπα των υπό εξέταση δειγμάτων, ενοφθαλμισμένα με 50 παράσιτα *T. gondii* RH. Στην επεξεργασία των κλινικών δειγμάτων, τηρήθηκε αυστηρός διαχωρισμός χώρων, μεταξύ των διαφορετικών τεχνικών σταδίων της PCR (εκχύλιση DNA, προετοιμασία αντιδράσεων, ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR), για την αποφυγή επιμόλυνσης [Kwok & Higuchi, 1989].

Καλλιέργεια σε Ινοβλάστες

Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά MRC-5 σε shell-vials για ενοφθαλμισμό των δειγμάτων. Μετά από επεξεργασία των δειγμάτων αίματος (παράρτημα 1.1.1, σελ. 153) και buffy coat (παράρτημα 1.1.2, σελ. 154) κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε 2 shell-vials με συμπληρωμένη μονοστιβάδα MRC-5 (παράρτημα 1.2.6, σελ. 158). Μετά από 5 ημέρες, πραγματοποιήθηκαν ανοσοφθορισμός ή Giemsa στην καλυπτρίδα και το υπερκείμενο του ενός shell-vial (παράρτημα 1.4.2, 1.4.3, σελ. 163). Στην περίπτωση που ανιχνεύονταν παράσιτα *T. gondii*, πραγματοποιούνταν θρυψινοποίηση του δεύτερου φιαλιδίου, και ενοφθαλμισμός σε νέα καλλιέργεια.

Άμεση Παρατήρηση

1-2 σταγόνες από τα δείγματα τα οποία ενοφθαλμίστηκαν σε καλλιέργειες μονιμοποιήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες, και πραγματοποιήθηκε άμεσος ανοσοφθορισμός και χρώση Giemsa (παράρτημα 1.4, σελ. 162).

Western Blotting

Το WB είναι μία τεχνική με την οποία καθίσταται δυνατή η ποιοτική σύγκριση των αντισωμάτων μεταξύ ατόμων. Το αντιγόνο τοξοπλάσματος παρασκευάστηκε από καλλιέργεια του *T. gondii* σε MRC-5 ινοβλάστες (παράρτημα 1.2.3, σελ. 157), διαχωρισμό των ταχυζωιδίων από τους ινοβλάστες (παράρτημα 1.2.4, σελ. 157) και διάσπασή τους με υπέρηχους (παράρτημα 1.7.1, σελ. 167). Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ολικής πρωτεΐνης έγινε με τη μέθοδο Bradford (παράρτημα 1.7.1.a, σελ. 167).

Παρασκευάστηκε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με πυκνότητα 12% στο οποίο ηλεκτροφορήθηκε το αντιγόνο του *T. gondii* [Sharma *et al.*, 1983] (παράρτημα 1.7.2, σελ. 167). Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα αποτυπώθηκε σε νιτροκυτταρίνη με συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών (semi-dry transfer apparatus, Hoefer Scientific instruments, USA). Τα δείγματα επώαστηκαν με την νιτροκυτταρίνη και στη συνέχεια με αντί-ανθρώπινα αντισώματα IgG, IgM, και IgA σημασμένα με αλκαλική φωσφατάση. Η εμφάνιση πραγματοποιήθηκε με διάλυμα NBT/BCIP (παράρτημα 1.7.3, σελ. 168).

Πίνακας 4-1. Αποτελέσματα ELISA IgG σε 238 ασθενείς με HIV, και κατηγοριοποίησή τους για WB.

Αποτελέσματα ELISA IgG (IU/ml)	Αριθμός Δειγμάτων	Ποσοστό %
<9	170	71,43
9-11	10	4,20
11-30	26	10,92
30-70	15	6,30
>70	17	7,14

Αποτελέσματα

Συνολικά, εξετάστηκαν 238 δείγματα ορών από ασθενείς με HIV με ELISA για την ανίχνευση IgG, IgM και IgA αντισωμάτων. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι το 28,57% είχε αντισώματα IgG με τίτλους κυμαινόμενους από 9–810 IU/ml. Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με τους τίτλους αυτούς (Πίνακας 4-1, σελ. 93). Κανένας ασθενής δεν είχε IgM ή IgA αντισώματα.

Σε 68 δείγματα ορών τα οποία αποδείχτηκαν θετικά για παρουσία IgG αντισωμάτων, πραγματοποιήθηκε WB για να διαπιστωθεί εάν τα αντιγόνα τα οποία αναγνωρίζουν τα αντισώματα, διαφέρουν ή είναι κοινά μεταξύ των διάφορων ομάδων ασθενών. Πραγματοποιήθηκε WB και σε ορούς από 15 επιπλέον ασθενείς οι οποίοι είχαν κάτω από 9 IU/ml IgG ανιχνεύσιμα αντισώματα, το οποίο είναι το cut-off της ELISA IgG.

Πολλά αντιγόνα αναγνωρίστηκαν με το WB, με εύρος 50–260 kD (Εικόνα 4-1, σελ. 96). Ανιχνεύτηκαν περισσότερα αντιγόνα από ορούς ασθενών με υψηλούς τίτλους αντισωμάτων. Δεν παρατηρήθηκε παρουσία κοινού αντιγόνου για όλα τα δείγματα, ενώ τα αντιγόνα 260, 158, 116, 110, 90, 78 και 64 kD δεν έχουν σημασία για τους θετικούς ασθενείς, αφού ανιχνεύτηκαν και σε κάποιους από τους 15 ασθενείς με αρνητική ELISA IgG (Πίνακας 4-2, σελ. 97, σκιασμένα). Μετά την αφαίρεση αυτών των αντιγόνων προέκυψαν 13 διαφορετικά αντιγονικά προφίλ για τους 68 ασθενείς (Πίνακας 4-3, σελ. 98).

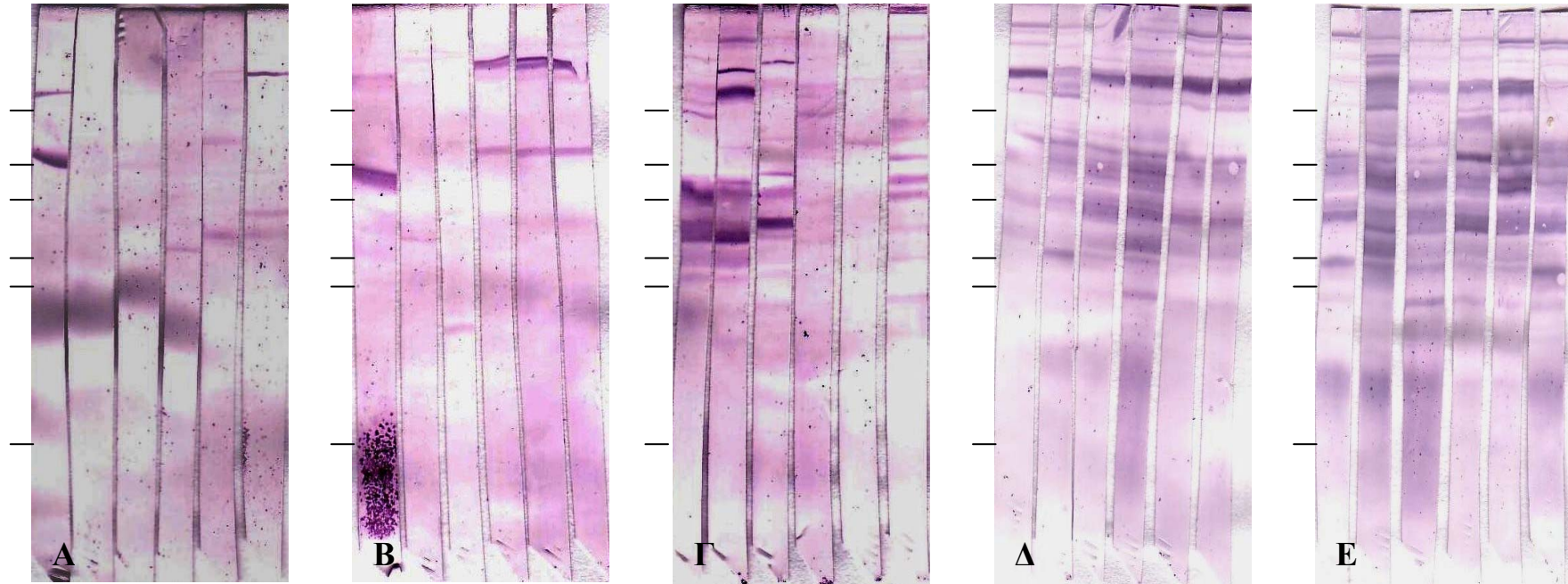
Τα περισσότερα κοινά αντιγόνα παρατηρήθηκαν σε μεγέθη 132, 92, 66, 56 και μεγαλύτερα από 260 kD. Η μεγαλύτερη ομοιότητα στα αντιγονικά προφίλ, παρατηρήθηκε μεταξύ των ασθενών με τίτλους 30 IU/ml ή περισσότερο, σε όλους από τους οποίους ανιχνεύτηκαν τα αντιγόνα 132 και 92 kD, ενώ είχαν και αρκετά κοινά αντιγόνα άνω των 260 kD. Οι ασθενείς με τίτλο μεγαλύτερο από 70 IU/ml είχαν όλα τα αντιγόνα κοινά εκτός από ένα των 56 kDa. Όπως φαίνεται, (Πίνακας 4-3, σελ. 98, σκιασμένα) τα δύο από τα τρία αντιγονικά προφίλ των ασθενών με τίτλο 30–70 IU/ml είναι πανομοιότυπα με εκείνα των ασθενών με τίτλους 70 IU/ml ή ανώτερους.

Ένας ασθενής με HIV εισήχθη στο νοσοκομείο με συμπτώματα ΤΕ, του χορηγήθηκε άμεσα αντι-τοξοπλάσμική θεραπεία, και αντέδρασε θετικά σε αυτή. Είχε αυξημένο τίτλο IgG αντισωμάτων (154 IU/ml), ενώ δεν εμφάνισε IgM ή IgA αντισώματα. Το αντιγονικό του προφίλ καταγράφηκε (Πίνακας 4-3, σελ. 98, στήλη 13).

Σε όλους τους ασθενείς πραγματοποιήθηκε PCR σε περιφερικό αίμα για την ανίχνευση του *BI* γονιδίου του *T. gondii*. Η PCR ήταν αρνητική σε όλα τα δείγματα τα οποία εξετάστηκαν (Εικόνα 4-2, σελ. 98). Σε 75 δείγματα πραγματοποιήθηκε ανοφθαλμισμός σε shell-vials για την ανίχνευση του *T. gondii* σε ιστοκαλλιέργεια. Σε καμία περίπτωση δεν απομονώθηκε το παράσιτο από την καλλιέργεια.

Συζήτηση

Ο επιπολασμός της τοξοπλάσμωσης στην Ελλάδα κυμαίνεται από 37–51% σε γυναίκες σε ηλικία αναπαραγωγής [Decavalas *et al.*, 1990; Gatoroulou *et al.*, 1997; Lolis *et al.*, 1996; Antoniou *et al.*, 2003], ενώ στον γενικό πληθυσμό από 33–45% [Antoniou *et al.*, 1997; 2002; Charvalos *et al.*, 1995]. Ο υψηλός επιπολασμός της τοξοπλάσμωσης στην Ελλάδα θέτει σε κίνδυνο ανάπτυξης οξείας τοξοπλάσμωσης, αλλά και αναζωπύρωσης λανθάνουσας λοίμωξης, τη δεύτερη μεγάλη κατηγορία ατόμων τις οποίες το *T. gondii* επηρεάζει, εκείνους με μόλυνση με HIV. Σε ασθενείς με HIV, η ΤΕ παραμένει ένα σοβαρό πρόβλημα. Το 30% των ατόμων αυτών, έχουν θετικά αντισώματα έναντι του *T. gondii* και μπορεί να αναπτύξουν ΤΕ, ενώ μεταθανάτιος έλεγχος έχει δείξει ΤΕ σε 13% των ασθενών με HIV [Navia *et al.*, 1986]. Παρά την ευρεία διάδοση της νόσου, η οριστική της διάγνωση σε ασθενείς με HIV παραμένει προβληματική, με αποτέλεσμα στις περισσότερες περιπτώσεις να βασίζεται σε ακτινολογικά ευρήματα και στην ανταπόκριση σε ειδική θεραπεία, παρά το γεγονός ότι η τελευταία, έχει αποδειχθεί άσκοπη στο 40% των περιπτώσεων [Raffi *et al.*, 1997]. Η διαθεσιμότητα αποτελεσματικών δεικτών πρόβλεψης ανάπτυξης ΤΕ θα ήταν σημαντική βοήθεια στον κλινικό.



Εικόνα 4-1. *Western Blotting σε ορούς ασθενών με HIV, ανάλογα με τον τίτλο αντισωμάτων τους. (A) αρνητικά, (B) 9–11 IU/ml, (Γ) 11–30 IU/ml, (Δ) 30–70 IU/ml, (E) >70 IU/ml. Promega high range protein molecular weight marker (212; 116; 97,4; 66,2; 57,5; 40).*

Πίνακας 4-2. Γραφική αναπαράσταση των 22 διαφορετικών αντιγονικών προφίλ που προέκυψαν από ορούς ασθενών με HIV με την εξέτασή τους με WB.

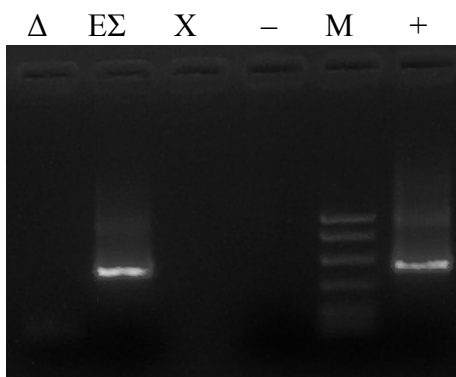
kD	Διαφορετικά αντιγονικά προφίλ ασθενών σε ασθενείς με διαφορετική συγκέντρωση (IU/ml) IgG αντισωμάτων με ELISA																					
	<9 (αρνητικοί)				9–11				11–30						30–70					>70		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
>260										–				–	–	–	–	–	–	–	–	
>260										–					–	–	–	–	–	–	–	
>260			–	–		–	–	–		–					–	–	–	–	–	–	–	
>260			–				–													–	–	
>260										–					–	–	–	–	–	–	–	
260	–									–	–				–	–	–	–	–		–	
158			–																			
148													–									
132								–	–		–		–	–	–	–	–	–	–	–	–	
122																						
116	–				–										–	–	–		–	–	–	
110	–				–					–				–	–	–	–		–	–	–	
92										–	–			–	–	–	–	–	–	–	–	
90				–																–	–	
80										–				–								
78			–	–		–		–	–	–												
66										–	–			–		–	–	–	–	–	–	
64		–								–	–	–										
56														–			–	–		–	–	
50							–													–	–	

σκιασμένα φαίνονται τα αντιγόνα τα οποία είναι κοινά σε οροαρνητικούς και οροθετικούς ασθενείς

Πίνακας 4-3. Γραφική αναπαράσταση των 13 αντιγονικών προφίλ που προέκυψαν μετά από WB σε ορούς ασθενών με HIV.

kD	Διαφορετικά αντιγονικά προφίλ ασθενών												
	9-11		11-30						30-70			>70	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
>260				-				-	-	-	-	-	-
>260				-					-	-	-	-	-
>260				-					-	-	-	-	-
148							-						
132		-	-			-		-	-	-	-	-	-
122													
92				-	-			-	-	-	-	-	-
80					-			-					
66			-	-				-	-	-	-	-	-
56								-		-			-
50	-												

σκιασμένα με την ίδια απόχρωση φαίνονται τα κοινά αντιγονικά προφίλ



Εικόνα 4-2. Αρνητικό αποτέλεσμα PCR. Δ, δείγμα; ΕΣ, εσωτερικός μάρτυρας; X, κενό; -, αρνητικός μάρτυρας; +, θετικός μάρτυρας; M, μάρτυρας μοριακού βάρους DNA (Promega PCR marker, 1.000, 750, 500, 300, 150, 50).

Οι οροί των ασθενών με HIV εξετάστηκαν αρχικά με ELISA IgG, IgM και IgA για να προσδιοριστεί η παρουσία ή όχι αντισωμάτων έναντι του *T. gondii*. Από τον έλεγχο προέκυψε ότι το 28,57% είχε IgG αντισώματα, ενώ δεν ανιχνεύτηκαν IgM ή IgA αντισώματα σε κανέναν ασθενή. Περίπου το 30% των ασθενών με HIV στην Ελλάδα, διατρέχουν τον κίνδυνο να αναπτύξουν επανενεργοποιημένη τοξοπλάσμωση, ενώ ένα επιπλέον 70% διατρέχει τον κίνδυνο ανάπτυξης οξείας τοξοπλάσμωσης από πρωτογενή λοίμωξη. Το ποσοστό οροθετικότητας στο *T. gondii* σε ασθενείς με HIV (η πλειονότητα των οποίων είναι κάτοικοι Αττικής) είναι σε συμφωνία με το ποσοστό το οποίο ανιχνεύτηκε σε έγκυες γυναίκες στο νομό Ηρακλείου της Κρήτης (Κεφάλαιο 3) και το οποίο προσδιορίστηκε στο 29,4%.

Η σημασία παρουσίας υψηλών τίτλων IgG αντισωμάτων σε ασθενείς μολυσμένους με HIV δεν έχει αποσαφηνιστεί. Κάποιοι ερευνητές αναφέρουν άμεση σχέση τους με την ανάπτυξη TE [Derouin *et al.*, 1996; Hellerbrand *et al.*, 1996], ενώ άλλοι δεν καταγράφουν άμεση συσχέτιση των δύο [Raffi *et al.*, 1999]. Έχει αποδειχθεί στο παρελθόν, ότι η παρουσία αντισωμάτων IgM και IgA δεν διαφέρει ανάμεσα σε ασθενείς με TE και σε αυτούς χωρίς TE [Derouin *et al.*, 1991; Raffi *et al.*, 1999]. Το γεγονός παραμένει, ότι ακόμα και στην περίπτωση που η παρουσία αντισωμάτων IgG έχει περιορισμένη διαγνωστική αξία για την παρουσία TE, η προγνωστική τους αξία για την εμφάνιση TE παραμένει υψηλή. Η παρουσία IgA αντισωμάτων δεν έχει αποδειχθεί ωφέλιμη αφού η παρουσία τους σε ασθενείς με AIDS υποδηλώνει λανθάνουσα λοίμωξη με *T. gondii* [Raffi *et al.*, 1999; Sulahian *et al.*, 1993]. Επιπλέον, η παρουσία IgM αντισωμάτων σε ασθενείς με TE ή οξεία τοξοπλάσμωση είναι μόλις 5% [Luft *et al.*, 1984], ενώ δεν εμφανίζονται IgE αντισώματα με αποτέλεσμα να μην είναι ωφέλιμοι διαγνωστικοί δείκτες [Raffi *et al.*, 1999]. Στην παρούσα μελέτη, ένας ασθενής ανέπτυξε TE με παρουσία IgG, αλλά χωρίς την εμφάνιση IgM ή IgA αντισωμάτων.

Οροί από 83 ασθενείς με HIV ένας από τους οποίους είχε κλινική TE, ελέγχθηκαν με WB για να προσδιοριστεί ποιοτικά εάν ένα αντιγόνο ή ένα αντιγονικό προφίλ ήταν ενδεικτικό ενεργούς εγκεφαλίτιδας. Παρατηρήθηκε αντιστοιχία του τίτλου αντισωμάτων με τον αριθμό των αναγνωριζόμενων αντιγόνων. Κανένα αντιγόνο δεν αναγνωρίστηκε από όλους τους ασθενείς ενώ υπήρχαν αντιγόνα παρόντα σε αρκετούς ασθενείς (132, 92, 80, 66, 56 kDa). Η αντιγονική απόκλιση που

παρατηρήθηκε μεταξύ των ορών ασθενών είναι πιθανόν να απεικονίζουν τα διαφορετικά στελέχη του *T. gondii*, παρά την ικανότητα ορών διαφορετικών ανθρώπων να αναγνωρίζουν διαφορετικά αντιγόνα [Weiss *et al.*, 1988].

Ο ασθενής με το αντιγονικό προφίλ 13 ανέπτυξε TE. Το αντιγόνο των 56 kD, το οποίο τον διαφοροποίησε από ασθενείς με αντίστοιχο τίτλο αντισωμάτων, παρουσιάστηκε και σε επιπλέον ασθενείς οι οποίοι όμως δεν ανέπτυξαν TE. Το γεγονός ότι δεν υπήρξαν πλέον του ενός ασθενείς με διαγνωσμένη κλινική TE ή με υποψία κλινικής TE καθιστά δύσκολη την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το ποια ή αντιγόνα ή αντιγονικά προφίλ μπορεί να έχουν διαγνωστική αξία.

Έχει περιγραφεί στο παρελθόν ότι αντίδραση στα αντιγόνα 116 και 105 προηγείται της εμφάνισης οξείας τοξοπλάσμωσης σε ασθενείς με AIDS [Potasman *et al.*, 1986], και ότι σε περιπτώσεις οξείας τοξοπλάσμωσης επικρατούν αντιγόνα χαμηλού μοριακού βάρους (6, 20, 22, 23, 25, 28, 29, 36 kD) [Weiss *et al.*, 1988; Raffi *et al.*, 1999], ενώ η παρουσία τεσσάρων ή περισσότερων εξ αυτών υποδηλώνει οξεία τοξοπλάσμωση [Ashburn *et al.*, 1998]. Στην παρούσα μελέτη κανένας ορός δεν αναγνώρισε αντιγόνο μικρότερο από 50 kD. Αναφέρεται επιπλέον η σημασία της εμφάνισης του αντιγόνου των 75 kD σε ασθενείς με κλινική τοξοπλάσμωση [Pelloux *et al.*, 1992].

Μόνο ένας από τους 238 ασθενείς είχε κλινικά διαγνωσμένη TE. Πραγματοποιήθηκε PCR και ιστοκαλλιέργεια σε δείγμα περιφερικού αίματος, 5 ημέρες αφού είχε ξεκινήσει θεραπεία, και το αποτέλεσμα ήταν αρνητικό. Κανένας άλλος από τους 238 ασθενείς που εξετάστηκαν δεν εκδήλωσε συμπτώματα TE, και δεν προέκυψε θετικό αποτέλεσμα με PCR ή ιστοκαλλιέργεια.

Η αξία της ιστοκαλλιέργειας δειγμάτων από ασθενείς με οξεία τοξοπλάσμωση ή TE δεν έχει αποδειχτεί. Κάποιοι αναφέρουν ότι η καλλιέργεια ή η PCR αίματος δεν είναι ωφέλιμη στον κλινικό για να αποφασίσει εάν ένας ασθενής με υποψία TE έχει τη νόσο ή όχι [Pelloux *et al.*, 1997]. Άλλοι αναφέρουν υψηλά ποσοστά επιτυχίας στην απομόνωση και ανίχνευση του *T. gondii* σε καλλιέργεια [Contini *et al.*, 1995], ή το γεγονός ότι η διάγνωση της TE με PCR είναι τουλάχιστον εφάμιλλη σε ευαισθησία με άλλες μεθόδους [Parmley *et al.*, 1992; Filice *et al.*, 1993; Bretagne *et al.*, 1995]. Η χαμηλή ειδικότητα και ευαισθησία των τεχνικών αυτών μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι είναι δυνατόν να μην υπάρχει παρασιταιμία κατά τη διάρκεια εκδήλωσης

της ΤΕ, ή η παρασιταϊμία και η εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων να διαφέρουν χρονικά [Raffi *et al.*, 1999; Pelloux *et al.*, 1997].

Με την ενεργή αντι-ική θεραπεία, ο αριθμός των περιπτώσεων τοξοπλάσμωσης του ΚΝΣ σε ασθενείς με HIV μειώνεται σε πολλές χώρες. Επιπλέον, η αναζωπύρωση μίας λανθάνουσας λοίμωξης είναι δυνατόν να αποφευχθεί με προφυλακτική θεραπεία [Tenter *et al.*, 2000]. Ο συνδυασμός των διαγνωστικών εργαλείων (ορολογικός έλεγχος, WB, PCR, ιστοκαλλιέργεια) και η διάθεσή τους στον κλινικό θα επιτρέψουν, πιθανώς, μία πιο εμπεριστατωμένη διάγνωση σε συνδυασμό με την κλινική εκτίμηση.

Κεφάλαιο 5

Ανίχνευση του *Toxoplasma gondii* σε Ζώα

Εισαγωγή

Το *Toxoplasma gondii* είναι ένα από τα περισσότερο πολυξενικά παράσιτα τα οποία είναι γνωστά μέχρι σήμερα. Έχει έναν υποχρεωτικά ετερόξενο κύκλο ζωής [Hutchison, 1965] και είναι πιθανόν ότι είναι ικανό να μολύνει όλα τα θερμόαιμα ζώα (θηλαστικά και πουλιά) και τον άνθρωπο [Levine, 1961; 1977; Dubey & Beattie, 1988; Jackson & Hutchison, 1989; Dubey *et al.*, 1998; Dubey, 1986; 1993; Tenter, 1977; 2000; Frenkel, 2000]. Το *T. gondii* είναι διαδεδομένο στις περισσότερες περιοχές του κόσμου και έχει ιατρικό και κτηνιατρικό ενδιαφέρον, καθώς δύναται να προκαλέσει αποβολή και συγγενή νόσο στους ενδιάμεσους ξενιστές του. Λόγω της σπουδαιότητάς του ως αιτιολογικός παράγοντας ζωνόσου, το *T. gondii* έχει μελετηθεί περισσότερο μεταξύ των *coccidia*.

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξής του, το *T. gondii* έχει αναπτύξει μεγάλο εύρος πιθανών οδών μετάδοσής του. Εντούτοις, η διαλεύκανση των οδών αυτών κατά τη διάρκεια των τελευταίων τριών δεκατιών δεν έχει υποδείξει ποια από αυτές είναι σημαντικότερη επιδημιολογικά. Σε ανθρώπους, πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με την συγγενή τοξοπλάσμωση, η οποία είναι το αποτέλεσμα κάθετης μετάδοσης του *T. gondii* κατά τη διάρκεια της κύησης. Αντίθετα, λίγα είναι γνωστά για τη σχετική σπουδαιότητα της οριζόντιας μετάδοσης του *T. gondii* μεταξύ των διαφορετικών ξενιστών, για τις κύριες δεξαμενές του παρασίτου στη φύση, ή για την επιδημιολογική σημασία των διαφορετικών πηγών πρόκλησης μόλυνσης στους ανθρώπους.

Υπάρχουν τρεις μολυσματικές μορφές στον κύκλο ζωής του *T. gondii*: ταζυζωΐδια, βραδυζωΐδια (μέσα σε ιστικές κύστες) και σποροζωΐδια (μέσα σε σπορώδεις ωκύστες). Όλες αυτές, είναι άμεσα μολυσματικές στους ενδιάμεσους και

τους τελικούς ξενιστές, οι οποίοι είναι δυνατόν να μολυνθούν με μία από τρεις οδούς (Εικόνα 1-3, σελ. 33): (α) οριζόντια μετάδοση μέσω κατάποσης σπορώδων ωοκύστεων από το περιβάλλον, (β) οριζόντια μετάδοση μέσω κατάποσης ιστικών κύστεων οι οποίες εμπεριέχονται σε ωμό ή όχι καλά μαγειρεμένο κρέας ενδιάμεσων ξενιστών, ή (γ) κάθετη μετάδοση μέσω διαπλακουντικής μετάδοσης ταχυζωιδίων [Dubey & Beatie, 1988; Jackson & Hutchison, 1989; Dubey, 1993; Evans, 1992; Remington & Desmonts, 1990; Dubey *et al.*, 1998; Dubey, 1991]. Επομένως, το *T. gondii* μπορεί να μεταδοθεί από τελικό σε ενδιάμεσο ξενιστή, από ενδιάμεσο σε τελικό ξενιστή, και μεταξύ ενδιάμεσων και τελικών ξενιστών. Γενικά, πιστεύεται ότι η πλειοψηφία των οριζόντιων μεταδόσεων του *T. gondii* προκαλούνται από κατάποση είτε ιστικών κύστεων οι οποίες εμπεριέχονται στο κρέας, ή από ωοκύστες οι οποίες μολύνουν το νερό και το φαγητό [Dubey & Beatie, 1988; Dubey, 1993].

Στην Ευρώπη και την Αμερική, το χοιρινό κρέας θεωρείται ως η κύρια οδός μετάδοσης του *T. gondii* στον άνθρωπο, γεγονός που προκύπτει από το ότι ιστικές κύστες του παρασίτου έχουν βρεθεί στα περισσότερα δείγματα χοιρινού κρέατος τα οποία διατίθενται στο εμπόριο. Ο επιπολασμός της νόσου στους χοίρους παραγωγής στην Ευρώπη έχει καταγραφεί μέχρι 86% [Tenter *et al.*, 2000]. Ζώα παραγωγής τα οποία μεγαλώνουν σε εξωτερικούς χώρους, όπως τα πρόβατα και οι αίγες αντιμετωπίζουν μεγάλη πιθανότητα μόλυνσης, λόγω της μόλυνσης του περιβάλλοντος με ωοκύστες. Στα ζώα αυτά παρατηρούνται υψηλοί επιπολασμοί, μέχρι 92% στα πρόβατα, και μέχρι 75% στις αίγες [Tenter *et al.*, 2000]. Ο επιπολασμός στον τελικό ξενιστή, τη γάτα έχει μελετηθεί σε διάφορες χώρες. Σε κατοικίδιες γάτες, ο επιπολασμός αντισωμάτων έχει καταγραφεί μέχρι 71%, ενώ σε αδέσποτες γάτες μέχρι 73% [Tenter *et al.*, 2000]. Αρουραίοι μολυσμένοι με *T. gondii* θεωρούνται σημαντικοί στην επιδημιολογία της τοξοπλάσμωσης, γιατί μπορούν να λειτουργήσουν σαν δεξαμενές μόλυνσης για χοίρους, σκυλιά, και πιθανόν για γάτες. Παράσιτα *T. gondii* βρέθηκαν για πρώτη φορά στους πνεύμονες ενός αλβίνου εργαστηριακού αρουραίου στην Ιταλία [Sangiori, 1915], ενώ το 1943 αναφέρθηκε η παρουσία *T. gondii* στο 8,8% των παγιδευμένων άγριων αρουραίων στην Γεωργία των ΗΠΑ [Perrin *et al.*, 1943]. Παράσιτα *T. gondii* έχουν απομονωθεί από 0–68 % των παγιδευμένων αρουραίων παγκόσμια, ενώ αντισώματα έχουν βρεθεί σε 0–100% των αρουραίων που μελετήθηκαν σε διαφορετικές χώρες του κόσμου [Dubey & Frenkel, 1998].

Σκοπός της μελέτης ήταν να εντοπιστούν οι κύριες δεξαμενές του *T. gondii*, και κατά συνέπεια να αναγνωριστεί η κύρια πηγή μόλυνσης σε ανθρώπους στην Κρήτη. Για τον σκοπό αυτό, εξετάστηκαν δείγματα καρδιών χοίρων και αιγών και εγκεφάλοι άγριων αρουραίων για την παρουσία ιστικών κύστεων του *T. gondii*, καθώς και κόπρανα αδέσποτων γατών, για την παρουσία ωοκύστεων.

Μεθοδολογία

Δείγματα

Κατά το χρονικό διάστημα Νοέμβριος 1999–Αύγουστος 2002 έγιναν συλλογές άγριων αρουραίων και αδέσποτων γατών και εξετάστηκαν δείγματα ιστών από ζώα παραγωγής από την ευρύτερη περιοχή Ηρακλείου. Επιπλέον, εξετάστηκαν δείγματα εγκεφάλων αρουραίων από την Κύπρο (Πίνακας 5-1, σελ. 106).

Για τις συλλογές, επιλέχθηκαν περιοχές οι οποίες λόγω της μετακίνησης εμπορευμάτων, και της παρουσίας μεγάλου αριθμού αρουραίων, ποντικών, και γατών, θεωρήθηκαν περιοχές υψηλής πιθανότητας παρουσίας του παρασίτου. Χρησιμοποιήθηκαν οι κλασικές παγίδες για ποντίκια και αρουραίους (φάκες) στις οποίες τοποθετήθηκαν τυριά, αλλαντικά ή φυστικοβούτυρο σαν δόλωμα (σελ. 166). Για την παγίδευση των γατών, χρησιμοποιήθηκαν ειδικές παγίδες για γάτες (ευχαριστώ τον κτηνίατρο κ. Παρασύρη για την παραχώρησή τους), στις οποίες τοποθετήθηκαν ψάρια ή αλλαντικά για δόλωμα. Οι γάτες είτε κρατήθηκαν στην παγίδα έως ότου αποδεύσουν, ή τους χορηγήθηκε υπνωτική ένεση και τα κόπρανα συλλέχθηκαν με λαβίδα από τον πρωκτό. Όλες οι γάτες αφέθηκαν στη συνέχεια ελεύθερες. Συνολικά εξετάστηκαν δείγματα από 346 αρουραίους, και 73 γάτες. Κατά το ίδιο χρονικό διάστημα πραγματοποιήθηκαν συλλογές καρδιών χοίρων και αιγών από σφαγεία και κρεοπωλεία των νομών Ηρακλείου και Ρεθύμνης. Συνολικά, εξετάστηκαν 244 δείγματα καρδιών χοίρων, και 99 δείγματα καρδιών αιγών (Πίνακας 5-1, σελ. 106).

Εφαρμόστηκαν διάφορες τεχνικές στα δείγματα ζώων με σκοπό την ανίχνευση και απομόνωση του *T. gondii* (Πίνακας 5-2, σελ. 106). Η επεξεργασία των δειγμάτων έγινε σε ομάδες (pools) των 5 για τα δείγματα εγκεφάλων και καρδιών, και ξεχωριστά για το κάθε δείγμα στα κόπρανα γατών.

Πίνακας 5-1. Δείγματα ζώων που εξετάστηκαν για την παρουσία *T. gondii*.

Δείγμα	Συνολικός Αρ. Δειγμάτων	Περιοχή	Αρ. Δειγμάτων
Εγκέφαλοι αρουραίων	346	Φόδελε	9
		Μάραθος	5
		Βούτες	23
		Αγία Ειρήνη	4
		Φοινικιά	53
		Αλικαρνασσός (σφαγεία)	2
Κόπρانا γατών	73	Κύπρος	250
		Ηράκλειο	57
Καρδιές χοίρων	244	Φοινικιά	16
		Ηράκλειο	86
		Ρέθυμνο (Creta Farm) ^a	14
		Αγία Βαρβάρα (σφαγεία)	35
		Νάξος	97
Καρδιές αιγών	99	Ανώγεια	12
		Ηράκλειο	68
		Ανώγεια	31

^a ζώα μεγάλης ηλικίας τα οποία χρησιμοποιούνται για αναπαραγωγή

Πίνακας 5-2. Τεχνικές που εφαρμόστηκαν για την ανίχνευση και απομόνωση του *T. gondii*.

Δείγμα	PCR	Μικροσκοπικές Τεχνικές			Καλλιέργεια σε ποντίκια
		IFA	Giemsa	Άμεση	
Εγκέφαλοι	✓	✓	✓	✓	✓
Καρδιές	✓		✓	✓	✓
Κόπρانا	✓			✓	

PCR

Τα δείγματα εγκεφάλων ομογενοποιήθηκαν σε PBS (παράρτημα 1.1.5, σελ. 155), τα δείγματα καρδιών τεμαχίστηκαν, επωάστηκαν με θρυψίνη και διηθήθηκαν σε γάζα (παράρτημα 1.1.3, σελ. 154), ενώ τα δείγματα κοπράνων υποβλήθηκαν σε διαφορετική φυγοκέντρηση με ZnSO₄ (παράρτημα 1.1.4, σελ. 155). Στη συνέχεια, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε υποτονική λύση, και τα τελικά διαλύματα υποβλήθηκαν σε τρεις γύρους βρασμού–ψύξης (παράρτημα 1.5.1.a, σελ. 163).

Οι πολλαπλασιασμοί με τους εναρκτές TGB11, TGB12, και B1–1, B1–4 πραγματοποιήθηκαν σε μηχανή PTC–200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, USA). Είκοσι μl από κάθε προϊόν αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, και τα προϊόντα απεικονίστηκαν με φωτογραφική κάμερα (παράρτημα 1.5, σελ. 163).

Κάθε φορά, χρησιμοποιήθηκε αρνητικός μάρτυρας με στόχο την ανίχνευση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων ο οποίος αποτελούνταν από 30 μl κυρίου μείγματος PCR και 20 μl H₂O. Ο πρώτος θετικός μάρτυρας αποτελούνταν από 10³ παράσιτα *T. gondii* RH ενοφθαλμισμένα σε αντίστοιχο με το υπό εξέταση δείγμα, και αποσκοπούσε στην ανίχνευση αναστολής της PCR από εσφαλμένους χειρισμούς. Ο δεύτερος θετικός μάρτυρας (εσωτερικός μάρτυρας, ΕΣ) στόχευε στην ανίχνευση αναστολής της αντίδρασης από παράγοντες του δείγματος, και αποτελούνταν από διπλότυπα των υπό εξέταση δειγμάτων, ενοφθαλμισμένα με 50 παράσιτα *T. gondii* RH. Στην επεξεργασία των δειγμάτων, τηρήθηκε αυστηρός διαχωρισμός χώρων, μεταξύ των διαφορετικών τεχνικών σταδίων της PCR για την αποφυγή επιμόλυνσης [Kwok & Higuchi, 1989].

Καλλιέργεια σε Ποντίκια

Τα επεξεργασμένα δείγματα εγκεφάλων και ιστών ενοφθαλμίστηκαν ενδοπεριτοναϊκά σε 2 θηλυκά ποντίκια balb/c (παράρτημα 1.3.2, σελ. 160). Πριν τον ενοφθαλμισμό πραγματοποιήθηκε αιμοσυγκόλληση σε αίμα από την ουρά των ζώων [Desmonts & Remington, 1980], για να επιβεβαιωθεί η απουσία αντισωμάτων έναντι του *T. gondii* (παράρτημα 1.3.3, σελ. 161). Τα ποντίκια παρακολούθηθηκαν για εμφάνιση συμπτωμάτων νόσου (φωτοφοβία, κοκκίνισμα των ματιών, αδυναμία, αστάθεια κατά τη βόδιση). Εφόσον παρουσιάστηκαν συμπτώματα, πραγματοποιήθηκε άμεσα ενδοπεριτοναϊκή πλύση, και ενοφθαλμισμός του αποκτούμενου υλικού σε νέα ποντίκια. Πραγματοποιήθηκε επίσης χρώση Giemsa στο υλικό, για τον εντοπισμό

παρασίτων *T. gondii* (παράρτημα 1.4.2, σελ. 162). Απουσία συμπτωμάτων αρρώστιας μετά από 5 ημέρες, πραγματοποιήθηκε εκ νέου αιμοσυγκόλληση για να διαπιστωθεί ανάπτυξη τοξοπλάσμωσης. Εάν όλα ήταν αρνητικά, μετά το πέρας 2 μηνών τα ζώα θυσιάστηκαν και εξετάστηκε ο εγκέφαλός τους για την παρουσία κύστεων *T. gondii*.

Άμεση Παρατήρηση

1–2 σταγόνες από τα δείγματα τα οποία ενοφθαλμίστηκαν σε καλλιέργειες και ποντίκια μονιμοποιήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες, και πραγματοποιήθηκε άμεσος ανοσοφθορισμός και χρώση Giemsa (παράρτημα 1.4, σελ. 162).

Αποτελέσματα

Κατά τη διάρκεια τριών χρόνων έγιναν συλλογές άγριων αρουραίων, αδέσποτων γατών και δειγμάτων ιστών από ζώα παραγωγής από την ευρύτερη περιοχή Ηρακλείου. Επιπλέον, εξετάστηκαν δείγματα εγκεφάλων αρουραίων από την Κύπρο.

Συνολικά, εξετάστηκαν δείγματα εγκεφάλων από 346 άγριους αρουραίους. Όλα τα δείγματα αποδείχτηκαν αρνητικά με PCR, καλλιέργεια σε ποντίκια, άμεση παρατήρηση νωπού υλικού και χρώσεις των επεξεργασμένων υλικών. Εξετάστηκαν επίσης δείγματα κοπράνων από 73 αδέσποτες γάτες, όλα από τα οποία αποδείχτηκαν αρνητικά με PCR, άμεση παρατήρηση νωπού υλικού και χρώσεις των επεξεργασμένων υλικών. Τέλος, εξετάστηκαν δείγματα καρδιακών ιστών ζώων παραγωγής. Συνολικά, εξετάστηκαν 244 δείγματα καρδιών χοίρων, και 99 δείγματα καρδιών αιγών, όλα από τα οποία αποδείχτηκαν αρνητικά με PCR, καλλιέργεια σε ποντίκια, άμεση παρατήρηση νωπού υλικού και χρώσεις των επεξεργασμένων υλικών.

Σε κανένα από τα δείγματα ή τις ομάδες δειγμάτων τα οποία εξετάστηκαν με PCR δεν παρατηρήθηκε σημαντική αναστολή στην PCR η οποία να δικαιολογεί τα αρνητικά αποτελέσματα. Επιπλέον, η αιμοσυγκόλληση σε δείγματα αίματος ενοφθαλμισμένων ποντικών παρέμεινε αρνητική σε όλα τα ζώα μέχρι το πέρας των δύο μηνών, διάστημα μετά από το οποίο τα ζώα θυσιάστηκαν για εξέταση του εγκεφάλου τους. Ένα από τα ποντίκια τα οποία ενοφθαλμίστηκαν με ομάδες δειγμάτων εγκεφάλων παρουσίασε την επόμενη ημέρα συμπτώματα αρρώστιας και πέθανε την δεύτερη ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό. Εξέταση του ενδοπεριτοναϊκού υλικού από το ζώο αυτό, καθώς και αιμοσυγκόλληση στο αίμα του αποδείχτηκαν αρνητικά για

παρουσία *T. gondii*. Το δεύτερο ποντίκι το οποίο ενοφθαλμίστηκε με το ίδιο υλικό δεν παρουσίασε κανένα σύμπτωμα, η αιμοσυγκόλληση στο αίμα του παρέμεινε αρνητική, και το ζώο θυσιάστηκε μετά από δύο μήνες για εξέταση του εγκεφάλου του, η οποία δεν έδειξε παρουσία *T. gondii*. Για τον λόγο αυτό, το αποτέλεσμα του πρώτου ποντικιού αποδόθηκε σε λανθασμένο χειρισμό κατά τον ενδοπεριτοναϊκό ενοφθαλμισμό. Η εξέταση των εγκεφάλων των ποντικιών μετά το πέρας των δύο μηνών από τον ενοφθαλμισμό τους πραγματοποιήθηκε με παρατήρηση νωπού παρασκευάσματος, με χρώσεις επεξεργασμένου υλικού και με PCR. Σε καμία περίπτωση δεν αποκτήθηκε θετικό αποτέλεσμα.

Συζήτηση

Το *T. gondii* είναι ένα από τα περισσότερο γνωστά πολυξενικά παράσιτα, αφού είναι ικανό να μολύνει όλα τα θερμόαιμα ζώα και τον άνθρωπο [Levine, 1961; 1977; Dubey & Beattie, 1988; Jackson & Hutchison, 1989; Dubey *et al.*, 1998; Dubey, 1986; 1993; Tenter, 1977; 2000; Frenkel, 2000]. Το *T. gondii* είναι διαδεδομένο στις περισσότερες περιοχές του κόσμου και παρουσιάζει ιατρικό και κτηνιατρικό ενδιαφέρον, καθώς προκαλεί αποβολή και συγγενή νόσο στους ενδιάμεσους ξενιστές του. Ο εντοπισμός των κύριων δεξαμενών του *T. gondii* στο περιβάλλον, και κατά συνέπεια η αναγνώριση των κύριων πηγών μετάδοσής του σε δεδομένο γεωγραφικό χώρο, θα βοηθούσε σημαντικά στην πρόληψη μόλυνσης των ενδιάμεσων ξενιστών: στους ανθρώπους στην προστασία των εγκύων και των ασθενών με HIV, και στα ζώα παραγωγής στη μείωση της παρουσίας ιστικών κύστεων στο κρέας και την μείωση των αποβολών. Γενικά, πιστεύεται ότι η πλειοψηφία των οριζόντιων μεταδόσεων του *T. gondii* (Εικόνα 1-3, σελ. 33) προκαλούνται από κατάποση είτε ιστικών κύστεων οι οποίες εμπεριέχονται στο κρέας, ή από ωοκύστες οι οποίες μολύνουν το νερό και το φαγητό [Dubey & Beattie, 1988; Dubey, 1993]. Με σκοπό να επιβεβαιωθεί το γεγονός αυτό, αναζητήθηκε το *T. gondii* στο περιβάλλον κατά τη διάρκεια τριών χρόνων, με την πραγματοποίηση συλλογών άγριων αρουραίων για τον εντοπισμό ιστικών κύστεων στους εγκεφάλους τους, τη συλλογή καρδιών από ζώα παραγωγής για τον εντοπισμό ιστικών κύστεων, και την αναζήτηση ωοκύστεων σε κόπρανα αδέσποτων γατών.

Αρουραίοι μολυσμένοι με *T. gondii* θεωρούνται σημαντικοί στη επιδημιολογία της τοξοπλάσμωσης για το γεγονός ότι αποτελούν δεξαμενές μόλυνσης για άλλους

ενδιάμεσους ξενιστές όπως τα ζώα παραγωγής και τις γάτες. Παράσιτα *T. gondii* έχουν απομονωθεί από 0–68 % των παγιδευμένων αρουραίων παγκόσμια, ενώ αντισώματα έχουν βρεθεί σε 0–100% των αρουραίων που μελετήθηκαν σε διαφορετικές χώρες του κόσμου [Dubey & Frenkel, 1998]. Καμία από τις ορολογικές μεθόδους ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι του *T. gondii* δεν έχει αποδειχθεί αξιόπιστη σε αρουραίους, αφού το *T. gondii* έχει απομονωθεί από ζώα χωρίς ανιχνεύσιμα αντισώματα, ενώ δεν ήταν εφικτό να απομονωθεί το *T. gondii* από αρουραίους με υψηλούς τίτλους αντισωμάτων [Frenkel *et al.*, 1995; Dubey & Frenkel, 1998]. Φαίνεται πως οι ιστικές κύστες δεν παραμένουν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής των αρουραίων, αφού ερευνητές δεν μπόρεσαν να βρουν *T. gondii* σε ιστούς και εγκεφάλους από αρουραίους ακόμα και 1-3 εβδομάδες μετά τον ενοφθαλμισμό τους με το παράσιτο [Callot & Puech 1952; Van Thiel 1956; Hellbrugge *et al.*, 1953; 1956].

Αρκετοί παράγοντες όπως ο ρυθμός αποβολής ωοκύστεων από γάτες, και η επιρροή του κλίματος στην επιβίωση των ωοκύστεων, μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα τις μεγάλες διαφορές της παρουσίας *T. gondii* στους αρουραίους. Στην παρούσα μελέτη, κανένα από τα δείγματα εγκεφάλων αρουραίων τα οποία εξετάστηκαν δεν αποδείχτηκε θετικό για την παρουσία *T. gondii*, χωρίς να υπάρχουν στοιχεία για την ύπαρξη ή όχι αντισωμάτων έναντι του *T. gondii*. Η επιβίωση των αρουραίων μετά από μόλυνση με *T. gondii* εξαρτάται από το στέλεχος με το οποίο μολύνθηκαν, αφού τα λοιμογόνα στελέχη είναι θανατηφόρα για αυτούς. Εάν λοιπόν τα συγκεκριμένα στελέχη επικρατούν σε μία περιοχή, η στατιστική πιθανότητα απομόνωσης στελεχών του *T. gondii* στις περιοχές αυτές μειώνεται σημαντικά [Dubey & Frenkel, 1998]. Είναι σημαντικό να γίνεται επιβεβαίωση του αποτελέσματος της άμεσης παρατήρησης του υλικού εγκεφάλου στο μικροσκόπιο με κάποια άλλη μέθοδο όπως PCR ή/και καλλιέργεια, γιατί έχει αποδειχτεί ότι η πρώτη δεν είναι τόσο ευαίσθητη [Dubey & Beatie, 1988]. Όλες οι παραπάνω μέθοδοι πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα για την ανίχνευση του *T. gondii* σε όλα τα δείγματα τα οποία εξετάστηκαν, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι η μη-ανίχνευση του *T. gondii* οφείλεται στην απουσία του από τα δείγματα αυτά, και όχι στην αδυναμία των τεχνικών να το ανιχνεύσουν.

Η γάτα είναι το μοναδικό κατοικίδιο ζώο το οποίο χρησιμοποιείται ως τελικός ξενιστής από το *T. gondii*, και επομένως, φαίνεται να κατέχει σημαντικό ρόλο στην επιδημιολογία της τοξοπλάσμωσης. Μέχρι και το 71% των κατοικίδιων γατών έχει

καταγραφεί να έχει αντισώματα έναντι του *T. gondii*, η παρουσία των οποίων επηρεάζεται από το είδος της τροφής και από το εάν οι γάτες ζουν αυστηρά στο εσωτερικό του σπιτιού ή όχι. Ο επιπολασμός αντισωμάτων είναι συνήθως υψηλότερος σε αδέσποτες γάτες και φτάνει το 73% [Tenter *et al.*, 2000].

Οι γάτες μολύνονται είτε από την κατάποση ωοκύστεων από το περιβάλλον, ή από την κατάποση ιστικών κύστεων από ενδιάμεσους ξενιστές. Ανάλογα με την εποχή του χρόνου, την γεωγραφική περιοχή και το είδος του ξενιστή, μέχρι και το 73% των μικρών τρωκτικών και το 71% των άγριων πουλιών μπορεί να είναι μολυσμένο με *T. gondii* [Jackson & Hutchison, 1989; Tenter *et al.*, 2000]. Σχεδόν όλες οι γάτες που μολύνονται με *T. gondii* εκκρίνουν ωοκύστες στο περιβάλλον με τα κόπρανά τους για περίοδο όχι μεγαλύτερη των 20 ημερών [Jackson & Hutchison, 1989; Frenkel, 2000; Dubey, 1986]. Η εκ νέου έκκριση ωοκύστεων μετά από νέα μόλυνση ή χωρίς νέα μόλυνση είναι σπάνια [Tenter *et al.*, 2000]. Η επιδημιολογική σημασία των ωοκύστεων φαίνεται από το γεγονός ότι παρά τη μεγάλη διάδοση του *T. gondii*, μολύνσεις με αυτό το παράσιτο είναι πρακτικά απύσες από μέρη του κόσμου τα οποία δεν φιλοξενούν γάτες [Wallace, 1969; Munday, 1972]. Στην παρούσα μελέτη δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία ωοκύστεων σε καμία από τις γάτες οι οποίες εξετάστηκαν. Φαίνεται ότι είναι πρακτικά μάταιη η αναζήτηση ωοκύστεων σε κόπρανα γατών, αφού η περίοδος έκκρισής τους είναι εξαιρετικά περιορισμένη. Για την διαμόρφωση μίας εικόνας της σπουδαιότητας των γατών στην επιδημιολογία της τοξοπλάσμωσης σε μία συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή, θα ήτανε περισσότερο χρήσιμη μία ορο-επιδημιολογική μελέτη η οποία θα εξερευνούσε στην παρουσία αντισωμάτων στις γάτες.

Το γεγονός ότι το χοιρινό κρέας θεωρείται η κύρια οδός μετάδοσης του *T. gondii* στον άνθρωπο [Dubey, 2000; 1984], προκύπτει από το γεγονός ότι ιστικές κύστες του παρασίτου έχουν βρεθεί στα περισσότερα δείγματα χοιρινού κρέατος του εμπορίου [Dubey *et al.*, 1986], και από υπολογισμούς του επιπολασμού μόλυνσης με *T. gondii* οι οποίες πραγματοποιήθηκαν τις δεκαετίες του 1970 και του 1980 [Dubey & Beatie, 1988]. Τα αποτελέσματα αυτά, όμως, εξαρτώνται από τη μέθοδο η οποία χρησιμοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση. Στις περισσότερες χώρες, τα ζώα παραγωγής δεν ελέγχονται επιδημιολογικά σε τακτική βάση για μόλυνση με *T. gondii*. Πρόσφατες μελέτες σε χοίρους μεγαλωμένους σε εγκαταστάσεις εντατικής παραγωγής στην

Ολλανδία, την Αυστρία, και τη Γερμανία, έδειξαν ότι ο επιπολασμός του *T. gondii* στα ζώα αυτά έχει μειωθεί σημαντικά σε λιγότερο από 1%, ως αποτέλεσμα των αλλαγών στην παραγωγή και την διαχείριση των εγκαταστάσεων παραγωγής. Σε άλλες χώρες το ποσοστό επιπολασμού έχει επίσης μειωθεί σημαντικά [Van Knippen *et al.*, 1995]. Η πλειονότητα των δειγμάτων καρδιακών ιστών χοίρων τα οποία εξετάστηκαν, προέρχονταν από ζώα μικρής ηλικίας. Μόνο τα δείγματα τα οποία προήλθαν από τα χοιροτροφεία της Creta Farm προήλθαν από «μάνες», μεγαλύτερα σε ηλικία ζώα τα οποία χρησιμοποιούνται για αναπαραγωγή. Τα τελευταία, λόγω ηλικίας, θα είχαν περισσότερες πιθανότητες να έχουν μολυνθεί με το παράσιτο, αλλά φαίνεται πως η εφαρμογή εντατικοποιημένης παραγωγής χοίρων κάτω από πρότυπες συνθήκες υγιεινής δεν επιτρέπει την μόλυνσή τους. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι είναι δυνατόν να μειωθεί σημαντικά η επικινδυνότητα μόλυνσης σε ζώα τα οποία υπόκεινται σε εντατικές μεθόδους παραγωγής, με την εφαρμογή επαρκών μεθόδων υγιεινής, περιορισμού, και πρόληψης [Tenter *et al.*, 2000]. Με τη χρήση τέτοιων μεθόδων είναι δυνατόν να παραχθούν χοίροι και πουλερικά ελεύθερα μόλυνσης από *T. gondii*, παρά το γεγονός ότι αυτό έχει επιτευχθεί μόνο στην Ολλανδία, τη Δανία, και την πρώην Ανατολική Γερμανία [Van Knippen *et al.*, 1995].

Αντίθετα, ζώα τα οποία μεγαλώνουν στο ύπαιθρο, έχουν περισσότερες πιθανότητες μόλυνσης με ωοκύστες του *T. gondii* οι οποίες μολύνουν το περιβάλλον. Πράγματι, ο επιπολασμός μόλυνσης με *T. gondii* σε αίγες και πρόβατα έχει καταγραφεί παγκοσμίως μέχρι 75% και 92%, αντίστοιχα [Tenter *et al.*, 2000]. Στην Κρήτη, το 14–21,3% των αιγών και το 23–27,6% των προβάτων αποδείχθηκαν οροθετικά [Stefanakis & Bizake, 1993; Stefanakis *et al.*, 1995]. Το γεγονός αυτό είναι σημαντικό, αφού ιστικές κύστες έχουν βρεθεί σε πολλούς βρώσιμους ιστούς των ζώων αυτών [Dubey & Kirkbride, 1989; Lundén & Uggla, 1992]. Στη μελέτη αυτή τα δείγματα καρδιών από αίγες αποδείχθηκαν αρνητικά, γεγονός το οποίο ίσως να οφείλεται στο μικρό, στατιστικά, δείγμα των 99 ζώων το οποίο εξετάστηκε.

Κεφάλαιο 6

Μοριακή Τυποποίηση & Φυλογενετική Ταξινόμηση Στελεχών του *Toxoplasma gondii*

Εισαγωγή

Το *T. gondii* είναι παράσιτο το οποίο ανήκει στο φύλο Apicomplexa, και συγγενεύει με τους αιτιολογικούς παράγοντες της ελονοσίας (*Plasmodium* spp) και της κοκκιδίωσης (*Eimeria* spp). Το *T. gondii* απαντάται σε όλο τον κόσμο σε υψηλή συχνότητα και εξαιρετικά ευρεία ποικιλία ξενιστών, καθιστώντας το ένα από τα πιο «επιτυχημένα» γνωστά παράσιτα. Παρά το γεγονός ότι η τοξοπλάσμωση είναι ασυμπτωματική σε υγιή άτομα, το *T. gondii* προκαλεί σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα σε συγγενώς μολυσμένα έμβρυα [Wong & Remington 1994], σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, κυρίως ασθενείς με HIV [Luft & Remington 1992], και δέκτες μοσχευμάτων [Israelski & Remington 1993].

Ο κύκλος ζωής του *T. gondii* είναι ασυνήθιστος για το γεγονός ότι είναι ικανό να αναπαραχθεί επ'άπειρον χρησιμοποιώντας είτε μονογονικούς είτε αμφιγονικούς υπό-κύκλους (Εικόνα 1-3, σελ. 33). Ο μονογονικός κύκλος λαμβάνει χώρα σε οποιοδήποτε θερμόαιμο ζώο ενώ μεταδίδεται μέσω ιστών μολυσμένων με ιστικές κύστεις. Θεωρητικά, ο μονογονικός τρόπος αναπαραγωγής θα μπορούσε να συνεχιστεί επ'άπειρον γύρω από την τροφική αλυσίδα. Ο αμφιγονικός κύκλος ζωής λαμβάνει χώρα μόνο μέσα στη γάτα, και συμπεριλαμβάνει γαμετογένεση και παραγωγή ωοκυστών οι οποίες εκκρίνονται στο περιβάλλον με τα κόπρανά της. Ο βαθμός στον οποίο οι δύο υπό-κύκλοι συνδυάζονται δεν είναι γνωστός, αλλά θεωρείται σημαντικός.

Οι πρώτες μαρτυρίες για την ύπαρξη διαφορετικών στελεχών του *T. gondii* προήλθαν από την ανάλυση ισο-ένζυμικών προφίλ, από μεγάλο αριθμό στελεχών κυρίως Γαλλικής προέλευσης, η οποία κατέδειξε μη-τυχαίο συσχετισμό των διαφορετικών isoforms για διάφορα ένζυμα, υπονοώντας την ύπαρξη ξεχωριστών στελεχών [Dardé *et al.*, 1988; 1992]. Πληθυσμιακή γενετική ανάλυση οδήγησε στην

υπόθεση ότι το *T. gondii* επιδεικνύει μία υψηλά κλωνική πληθυσμιακή δομή, παρόμοια με άλλα πρωτόζωα [Tibayrenc *et al.*, 1991], παρά την ευκαιρία για γενετικό ανασυνδυασμό στον τελικό ξενιστή. Παρόμοιες αναλύσεις βασισμένες σε ανάλυση του πολυμορφισμού των κλασμάτων του DNA (RFLP) έδειξαν ότι το *T. gondii* αποτελείται από μόνο τρεις κλωνικές γενεαλογίες (clonal lineages) οι οποίες ονομάστηκαν τύποι I, II και III, και οι οποίες απαντώνται σε ζώα και ανθρώπους [Howe & Sibley, 1995]. Τα αρχέτυπα στελέχη τύπου I κατέχουν το γνώρισμα του να είναι σταθερά θανατηφόρα σε ποντίκια, σε αντίθεση με τα στελέχη τύπου II και III τα οποία είναι σημαντικά λιγότερο μολυσματικά [Howe *et al.*, 1997; Sibley & Boothroyd, 1992]. Ισοενζυμική ανάλυση πολλαπλών θέσεων (multilocus isoenzyme analysis) οδήγησε στην καταγραφή 12 ζυμοδεμάτων (zymodemes) [Dardé *et al.*, 1992; Dardé, 1996]. Οκτώ ζυμοδέματα αποτελούνται από ένα στέλεχος το κάθε ένα, ενώ τα στελέχη τύπου I αντιστοιχούν στο Z1, τα στελέχη τύπου II στα Z2 και Z4, ενώ τα στελέχη τύπου III στο Z3 [Dardé *et al.*, 1996; Howe & Sibley, 1995]. Οι κλωνικές αυτές γενεαλογίες δεν επιδεικνύουν ισχυρά γεωγραφικά όρια ή όρια σχετικά με ξενιστές: κάθε μία είναι διαδεδομένη σε ολόκληρο τον κόσμο, και βρίσκεται σε ποικιλία διαφορετικών ξενιστών.

Γενετική ανάλυση μεταξύ στελεχών του ίδιου τύπου αποδεικνύει ότι η ποικιλομορφία ανάμεσα σε μέλη του ίδιου τύπου είναι εξαιρετικά σπάνια [Lehmann *et al.*, 2000; Fazaeli *et al.*, 2000; Grigg *et al.*, 2001], εκτός από την περίπτωση των υψηλά πολυμορφικών μικροδορυφόρων [Blackston *et al.*, 2001; Ajzenberg *et al.*, 2002]. Επομένως, είναι ξεκάθαρο ότι οι τρεις κλωνικές γενεαλογίες έχουν αναδυθεί σχετικά πρόσφατα, χωρίς τη δυνατότητα για γενετική εξέλιξη [Boothroyd & Grigg, 2002]. Εντούτοις, παρουσιάζεται ένας αυξανόμενος αριθμός στελεχών, διαφορετικών από τα τρία «κανονικά», τα οποία ανήκουν είτε σε «ανασυνδυασμένα» στελέχη τα οποία έχουν γονότυπους ξεκάθαρα συνδεδεμένους με τους τρεις επικρατείς τύπους, και σε «εξωτικά» στελέχη τα οποία προέρχονται από ξενιστές εκτός των συνηθισμένων. Ανάλυση του γονιδιώματος στα επονομαζόμενα «ανασυνδυασμένα» στελέχη υπονοεί ότι σε κάθε περίπτωση είναι παρόν ένα αλληλόμορφο σχεδόν πανομοιότυπο με αυτό που απαντάται σε στελέχη τύπων I και III, αλλά περιέργως ποτέ τύπου II [Lehmann *et al.*, 2000; Grigg *et al.*, 2001].

Έχει παρατηρηθεί υπολογίσιμη ποικιλομορφία στην εξέλιξη και τη σοβαρότητα της τοξοπλάσμωσης σε συγγενώς μολυσμένα νεογνά και σε ανοσοκατεσταλμένους

ασθενείς. Η ποικιλομορφία αυτή είναι πιθανώς συνισταμένη διαφόρων παραμέτρων, συμπεριλαμβανομένης της γενετικής του ξενιστή (McLeod *et al.*, 1989; Suzuki *et al.*, 1996) και του παρασίτου (Howe *et al.*, 1996; Sibley & Boothroyd 1992). Αρκετές μελέτες έχουν παρατηρήσει αυξημένη συχνότητα των στελεχών τύπου II σε σοβαρές περιπτώσεις ανθρώπινης νόσου (AIDS και ΣΤ), υπονοώντας ότι τα στελέχη αυτά μπορεί να είναι περισσότερο μολυσματικά και στους ανθρώπους [Howe & Sibley, 1995; 1997; Honore *et al.*, 2000; Ajzenberg *et al.*, 2002; Dardé *et al.*, 1992]. Αντίθετα, στελέχη των τύπων I, και III, βρέθηκαν ισομερώς διαδεδομένα σε 34 φυσικώς μολυσμένα ζώα, υποδεικνύοντας ειδική συνάφεια του γονότυπου II με την κλινική νόσο σε ανθρώπους [Howe & Sibley 1995]. Πρόσφατα δεδομένα, όμως, υποδεικνύουν ότι ενώ στελέχη τύπου II επικρατούν σε ασθενείς με AIDS, για τις περισσότερες περιπτώσεις ΣΤ ευθύνονται στελέχη τύπου I [Fuentes *et al.*, 2001].

Θα ήταν πλεονέκτημα να αναπτυχθούν μέθοδοι με τη δυνατότητα να αναλύουν τον γονότυπο των στελεχών του *T. gondii* από πρωτογενή κλινικά δείγματα, ή μετά από την ελάχιστη δυνατή καλλιέργεια [Howe *et al.*, 1997; Fuentes *et al.*, 2001], εφ'όσον αυτή μπορεί να μην είναι δυνατή σε όλες τις περιπτώσεις. Η απ' ευθείας ανάλυση θα ευνοούσε σημαντικά και την ανάλυση αποθηκευμένων δειγμάτων, όπως αίμα, αντικειμενοφόρες πλάκες και ιστούς διατηρημένους σε παραφίνη ή φορμαλίνη.

Στόχος της μελέτης αυτής ήταν η μοριακή τυποποίηση των στελεχών του *T. gondii* τα οποία αναγνωρίστηκαν σε δείγματα από άτομα τα οποία κατοικούν στην Ελλάδα (Κεφάλαιο 3), και να συσχετιστεί ο γονότυπος των συγκεκριμένων στελεχών του *T. gondii* με την προκεκλημένη μητρική ή/και εμβρυική νόσο. Τέλος να γίνει φυλογενετική σύγκριση των στελεχών του *T. gondii* τα οποία απαντώνται στην Ελλάδα, με άλλα στελέχη τα οποία έχουν απομονωθεί σε διαφορετικά μέρη του κόσμου.

Μεθοδολογία

Δείγματα

Τυποποιήθηκαν μοριακά με την τεχνική της PCR–RFLP, 11 δείγματα: 6 κλινικά δείγματα τα οποία αποδείχτηκαν θετικά για την παρουσία *T. gondii* με PCR στο γονίδιο *B1* (Κεφάλαιο 3), και 5 στελέχη αναφοράς τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες των διαφορετικών κλωνικών τύπων του *T. gondii*. Τα ίδια δείγματα αναλύθηκαν φυλογενετικά με αλληλούχιση μέρους του γονιδίου *SAG2*, με την προσθήκη 8 επιπλέον στελεχών των οποίων οι αλληλουχίες ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων GenBank (Πίνακας 6-1, σελ. 119).

Μοριακή Τυποποίηση Στελεχών

Ο τύπος της κλωνικής ταυτότητας των 11 δειγμάτων προσδιορίστηκε με ανάλυση PCR–RFLP στο γονίδιο *SAG2* (παράρτημα 1.8, σελ. 170), με την επίδραση περιοριστικών ενζύμων σε προϊόντα δύο nested PCR¹⁵, τα οποία πολλαπλασίασαν ξεχωριστά τα 5' και 3' άκρα του γονιδίου *SAG2* (Εικόνα 6-1, σελ. 118) [Howe *et al.*, 1997]. Για την αποφυγή πιθανών επιμολύνσεων, τηρήθηκε αυστηρός διαχωρισμός μεταξύ των διαφορετικών τεχνικών σταδίων της PCR [Kwok & Higuchi, 1989].

Οι πολλαπλασιασμοί εκτελέστηκαν σε τελικό όγκο αντίδρασης 50 μl, ο οποίος περιείχε 0,2 mM από κάθε ένα από τα dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0,5 μM από κάθε έναν από τους εναρκτές, 1 U Taq polymerase, και 3 mM MgCl₂. Σαν υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν 1–20 μl από το απομονωμένο DNA για τις πρώτες αντιδράσεις PCR, και 1–20 μl από τα προϊόντα των πρώτων αντιδράσεων για την nested PCR.

Το άκρο 5' πολλαπλασιάστηκε με τη χρήση των εναρκτών *SAG2.F4* (5'–GCT ACC TCG AAC AGG AAC AC–3') και *SAG2.R4* (5'–GCA TCA ACA GTC TTC GTT GC–3') και θερμοκρασία προσαρμογής εναρκτών 65°C. Για την nested PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εναρκτές *SAG2.F* (5'–GAA ATG TTT CAG GTT GCT GC–3') και *SAG2.R2* (5'–GCA AGA GCG AAC TTG AAC AC–3') σε θερμοκρασία προσαρμογής εναρκτών 58°C. Το αναμενόμενο προϊόν ήταν 241 bp για κάθε

¹⁵ **nested PCR**: δύο διαδοχικές PCR, η δεύτερη από τις οποίες πραγματοποιείται με εναρκτές που προσδένουν εσωτερικά των πρώτων εναρκτών.

δεδομένο στέλεχος του *T. gondii*. Το άκρο 3' πολλαπλασιάστηκε με τη χρήση των εναρκτών SAG2.F3 (5'-TCT GTT CTC CGA AGT GAC TCC-3') και SAG2.R3 (5'-TCA AAC CGT GCA TTA TCG C-3') και θερμοκρασία προσαρμογής εναρκτών 58°C. Για την nested PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εναρκτές SAG2.F2 (5'-ATT CTC ATG CCT CCG CTT C-3') και SAG2.R (5'-AAC GTT TCA CGA AGG CAC AC-3') σε θερμοκρασία προσαρμογής εναρκτών 55°C. Το αναμενόμενο προϊόν ήταν 221 bp για κάθε δεδομένο στέλεχος του *T. gondii*.

Οι πολλαπλασιασμοί πραγματοποιήθηκαν σε μηχανή PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, USA) ως εξής: αρχική επώαση των αντιδράσεων στους 94°C για 5 λεπτά, ακολουθούμενη 40 κύκλους πολλαπλασιασμού, ο καθένας από τους οποίους αποτελούνταν από θερμική μετουσίωση του DNA για 45 δευτερά στους 94°C, προσαρμογή των εναρκτών για 45 δευτερά στην απαιτούμενη για κάθε ζεύγος εναρκτών θερμοκρασία, και επιμήκυνση των εναρκτών για 1 λεπτό στους 72°C. Η τελική επιμήκυνση των εναρκτών έγινε στους 72°C για 10 λεπτά.

Τα πολλαπλασιασμένα προϊόντα SAG2 5' και SAG2 3' καθαρίστηκαν με Qiamp gel purification kit. Τα προϊόντα 5' υποβλήθηκαν στην επίδραση του περιοριστικού ενζύμου Sau3AI, σε αντίδραση η οποία περιείχε basal buffer 1X, BSA 100 µg/ml, και 10 U ενζύμου Sau3AI, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 µl. Τα προϊόντα 3' υποβλήθηκαν στην επίδραση του περιοριστικού ενζύμου HhaI σε αντίδραση η οποία περιείχε react buffer 2 1x και 10 U ενζύμου HhaI, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 µl. Οι αντιδράσεις επώαστηκαν στους 37°C για 2 ώρες, και τα προϊόντα του RFLP αναλύθηκαν σε αγαρόζη 2%. Το RFLP με την επίδραση του περιοριστικού ενζύμου Sau3A στα προϊόντα 5' οδήγησε στον διαχωρισμό των στελεχών τύπου III από τα στελέχη τύπων I, και II, ενώ επίδραση του περιοριστικού ενζύμου HhaI στα προϊόντα 3' οδήγησε στον διαχωρισμό των στελεχών τύπου II από τα στελέχη τύπου I και III.



Εικόνα 6-1. Σχηματική αναπαράσταση της θέσης (locus) του SAG2 γονιδίου.

Πίνακας 6-1. Στελέχη του *T. gondii* τα οποία τυποποιήθηκαν μοριακά και συγκρίθηκαν φυλογενετικά.

Στέλεχος	Κλινική εικόνα	Ξενιστής	Προέλευση	Χρον/γία	RFLP Τύπος	Zymodeme	Αριθμός Πρόσβασης GenBank
CRE1	-	Άνθρωπος	Ελλάδα, Ηράκλειο	2003	A	A	
CRE2	ΛΦ, θανατηφόρος ΣΤ	Άνθρωπος	Ελλάδα, Ηράκλειο	2003	A	A	
CRE3	-	Άνθρωπος	Ελλάδα, Ηράκλειο	2003	A	A	
ATH1	-	Άνθρωπος	Ελλάδα, Αθήνα	2003	A	A	
ATH2	-	Άνθρωπος	Ελλάδα, Αθήνα	2003	A	A	
ATH3	-	Άνθρωπος	Ελλάδα, Αθήνα	2003	A	A	
RH	TE	Άνθρωπος	ΗΠΑ	1939	I	1	
BOU	TE AIDS	Άνθρωπος	Γαλλία, Limoges	1985	II	2	
PSP-19	ΣΤ	Άνθρωπος	Γαλλία, Amiens	1997	A	2	
LGE94-2	ΣΤ	Άνθρωπος	Γαλλία, Limoges	1994	A	4	
NED	ασυμπτωματική ΣΤ	Άνθρωπος	Γαλλία, Limoges	1989	III	3	
C56 ^α	-	Κοτόπουλο	ΗΠΑ	1961	III	3	AF249698
BEVERLEY ^α	-	Κουνέλι	Αγγλία	1959	II	2	AF249697
COUGAR ^α	;	Κούγκαρ	Καναδάς	1996	II	A	AF249696
CASTELLS ^α	θανατηφόρος ΣΤ	Πρόβατο	Ουρουγουάη	1993	I	7	AF357582
RUB ^α	πνευμονίτιδα	Άνθρωπος	Γαλλική Γουινέα	1992	I	6	AF357581
MAS ^α	σοβαρή ΣΤ	Άνθρωπος	Γαλλία, Nice	1991	I	5	AF357580
LGE96-1 ^α	ΣΤ	Άνθρωπος	Γαλλία, Limoges	1996	III	4	AF357578
S48 ^α	ΣΤ	Πρόβατο	Νέα Ζηλανδία	1956	A	1	AF357577

^α μόνο φυλογενετική ταξινόμηση; TE, τοξοπλάσμική εγκεφαλίτιδα; ΛΦ, Λεμφαδενίτιδα; A, δεν έχει πραγματοποιηθεί μοριακή τυποποίηση.

Φυλογενετική Σύγκριση Στελεχών

Με τη μέθοδο της αλληλούχισης του DNA (Παράρτημα 1.10, σελ. 175), επιτεύχθηκε ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA για τα πολλαπλασιασμένα κομμάτια του γονιδίου SAG2. Χρησιμοποιήθηκαν τα προϊόντα των πρώτων αντιδράσεων της PCR (προηγούμενη παράγραφος) με τη διαφορά ότι οι εναρκτές της nested PCR ήταν επιμηκυσμένοι με την αλληλουχία των εναρκτών που χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για αλληλούχιση. Για τον πολλαπλασιασμό του 5' άκρου του SAG2 χρησιμοποιήθηκαν οι επιμηκυσμένοι εναρκτές SAG2.F-T7 (5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGA AAT GTT TCA GGT TGC TGC-3') και SAG2.R2-M13 (5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACG CAA GAG CGA ACT TGA ACA C-3'). Για τον πολλαπλασιασμό του 3' άκρου χρησιμοποιήθηκαν οι επιμηκυσμένοι εναρκτές SAG2.F2-T7 (5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAT TCT CAT GCC TCC GCT TC-3') και SAG2.R-M13 (5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACA ACG TTT CAC GAA GGC ACA C-3'). Η προετοιμασία των αντιδράσεων και η κυκλοποίηση ήταν όπως περιγράφηκε για την PCR-RFLP (σελ. 117).

Οι αντιδράσεις αλληλούχισης πραγματοποιήθηκαν με το kit ThermoSequenase (Amersham-Pharmacia), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι εναρκτές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι M13-700 (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') σημασμένος με IRD700, και T7-800 (5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG G-3') σημασμένος με IRD800. Η ανάλυση των αντιδράσεων αλληλούχισης πραγματοποιήθηκε σε μηχανή Li-Cor Long Reader 4200 (MWG-Biotech, Germany).

Οι αλληλουχίες από τα άκρα 5' και 3' και για τις δύο αλυσίδες DNA για το κάθε στέλεχος συναρμολογήθηκαν στο πρόγραμμα SeqPUP [Gilbert, 1995], προσθέτοντας σε όλα την αλληλουχία NNNN στο σημείο συνένωσης. Η ευθυγράμμιση πολλαπλών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα ClustalW Multiple Sequence alignment Program version 1.7 [Higgins *et al.*, 1997], εφαρμόζοντας τις προκαθορισμένες επιλογές (gap opening penalty: 10; gap extension penalty: 0,05; delay divergent sequences: 40%; DNA transitions weight: 0,05). Οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν, και αφαιρέθηκαν οι αλληλουχίες των εναρκτών, καθώς και οι αλληλουχίες για τις οποίες δεν υπήρχαν πληροφορίες για όλα τα στελέχη. Το προϊόν της επεξεργασίας αυτής εισήχθη στο πρόγραμμα Treecon version 1.3b, και η

επεξεργασία έγινε εφαρμόζοντας τις προκαθορισμένες επιλογές του Neighbor-Joining Distance program. Η στατιστική υποστήριξη δημιουργήθηκε με τη μέθοδο Bootstrap Resampling method (1.000 resamplings). Τα δεδομένα παρουσιάστηκαν σαν φυλόγραμμα (phylogram) χωρίς αφετηρία (midpoint rooting).

Αποτελέσματα

Μοριακή Τυποποίηση Στελεχών

Με τη χρήση της τεχνικής της PCR-RFLP καθίσταται δυνατή η κατηγοριοποίηση των στελεχών του *T. gondii* στους τρεις κλωνικούς τύπους I, II και III. Στην παρούσα μελέτη, η τυποποίηση των στελεχών του *T. gondii* πραγματοποιήθηκε με PCR-RFLP στο γονίδιο SAG2 του *T. gondii*. Τυποποιήθηκαν απ'ευθείας από εκχυλισμένο DNA 5 στελέχη αναφοράς και 6 στελέχη του *T. gondii* τα οποία προήλθαν από έγκυες γυναίκες με οξεία τοξοπλάσμωση (Κεφάλαιο 3).

Η μοριακή τυποποίηση με PCR-RFLP στο γονίδιο SAG2 οδήγησε στην κατηγοριοποίηση των στελεχών αναφοράς, όπως ήταν αναμενόμενο (Εικόνα 6-2, σελ. 124). Το στέλεχος RH χαρακτηρίστηκε ως στέλεχος τύπου I αφού τα πολλαπλασιασμένα προϊόντα 5' και 3' του γονιδίου SAG2 δεν πέφθηκαν με τα αντίστοιχα ένζυμα *Sau3AI* και *HhaI*. Τα στελέχη BOU, LGE 94-2 και PSP-19 χαρακτηρίστηκαν ως στελέχη τύπου II, αφού τα προϊόντα 3' του γονιδίου SAG2 πέφθηκαν με το ένζυμο *HhaI* ενώ τα προϊόντα 5' δεν πέφθηκαν. Το στέλεχος NED παρουσίασε μεικτή εικόνα περιορισμού με το ένζυμο *Sau3AI*. Επειδή είναι γνωστό στέλεχος τύπου III, μπορεί να υποθεθεί ότι η μεικτή εικόνα είναι αποτέλεσμα ατελούς πέψης. Επομένως, το στέλεχος NED χαρακτηρίστηκε ως στέλεχος τύπου III, αφού τα προϊόντα 5' του γονιδίου SAG2 πέφθηκαν με το ένζυμο *Sau3AI*, ενώ τα προϊόντα 3' δεν πέφθηκαν με το ένζυμο *HhaI*.

Όσον αφορά στην τυποποίηση των κλινικών δειγμάτων με PCR-RFLP στο γονίδιο SAG2, μόνο ένα από τα στελέχη (CRE2) κατηγοριοποιήθηκε τελεσίδικα ως στέλεχος τύπου I, αφού τα πολλαπλασιασμένα προϊόντα 5' και 3' του γονιδίου SAG2 δεν πέφθηκαν με τα ένζυμα *Sau3AI* και *HhaI*. Τα υπόλοιπα στελέχη παρουσίασαν μεικτή εικόνα με τον περιορισμό των προϊόντων 5' με το ένζυμο *Sau3AI*, ενώ δεν υπήρξε πέψη με το ένζυμο *HhaI* (Εικόνα 6-2, σελ. 124). Το γεγονός αυτό υπονοεί τρία πράγματα: (α) για κάποιο λόγο υπάρχει ατελής πέψη των προϊόντων, εντούτοις τα

στελέχη ανήκουν είτε σε αυτά του τύπου I ή σε τύπου III (β) το κλινικό δείγμα είναι μολυσμένο με δύο στελέχη *T. gondii*: ένα στέλεχος τύπου I και ένα στέλεχος τύπου III, και (γ) πρόκειται για ανασυνδυασμένα στελέχη τα οποία προήλθαν από ανασυνδυασμό μεταξύ στελεχών τύπου I και III.

Για να διερευνηθεί περαιτέρω η ταυτότητα των στελεχών που παρουσίασαν μικτή εικόνα, αλλά και για να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα για τα υπόλοιπα στελέχη, πραγματοποιήθηκε άμεση αλληλούχιση στα δείγματα της nested PCR. Με τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA στα προϊόντα 5' και 3' του γονιδίου *SAG2* για το στέλεχος NED, επιβεβαιώθηκε πως η μεικτή εικόνα ήταν αποτέλεσμα ατελούς πέψης με το ένζυμο *Sau3AI*, αφού το στέλεχος κατέχει το σημείο περιορισμού για το ένζυμο *Sau3AI* (GATC) (Πίνακας 6-2, σελ. 123), αλλά όχι το σημείο περιορισμού για το ένζυμο *HhaI* (GCGC). Επίσης, επιβεβαιώθηκε ότι το στέλεχος CRE2 ανήκει στα στελέχη τύπου I αφού δεν κατέχει τα σημεία περιορισμού για το *Sau3AI* και το *HhaI*. Τα στελέχη ATH2, CRE1 και CRE3, κατηγοριοποιούνται τελεσίδικα ως στελέχη τύπου III, αφού κατέχουν το σημείο περιορισμού για το ένζυμο *Sau3AI*, αλλά όχι για το *HhaI*. Τέλος, τα στελέχη ATH1 και ATH3 φαίνεται να αποτελούν ανασυνδυασμό μεταξύ στελεχών τύπου II και στελεχών τύπου III, αφού κατέχουν τα σημεία περιορισμού και για το *Sau3AI* και για το *HhaI*.

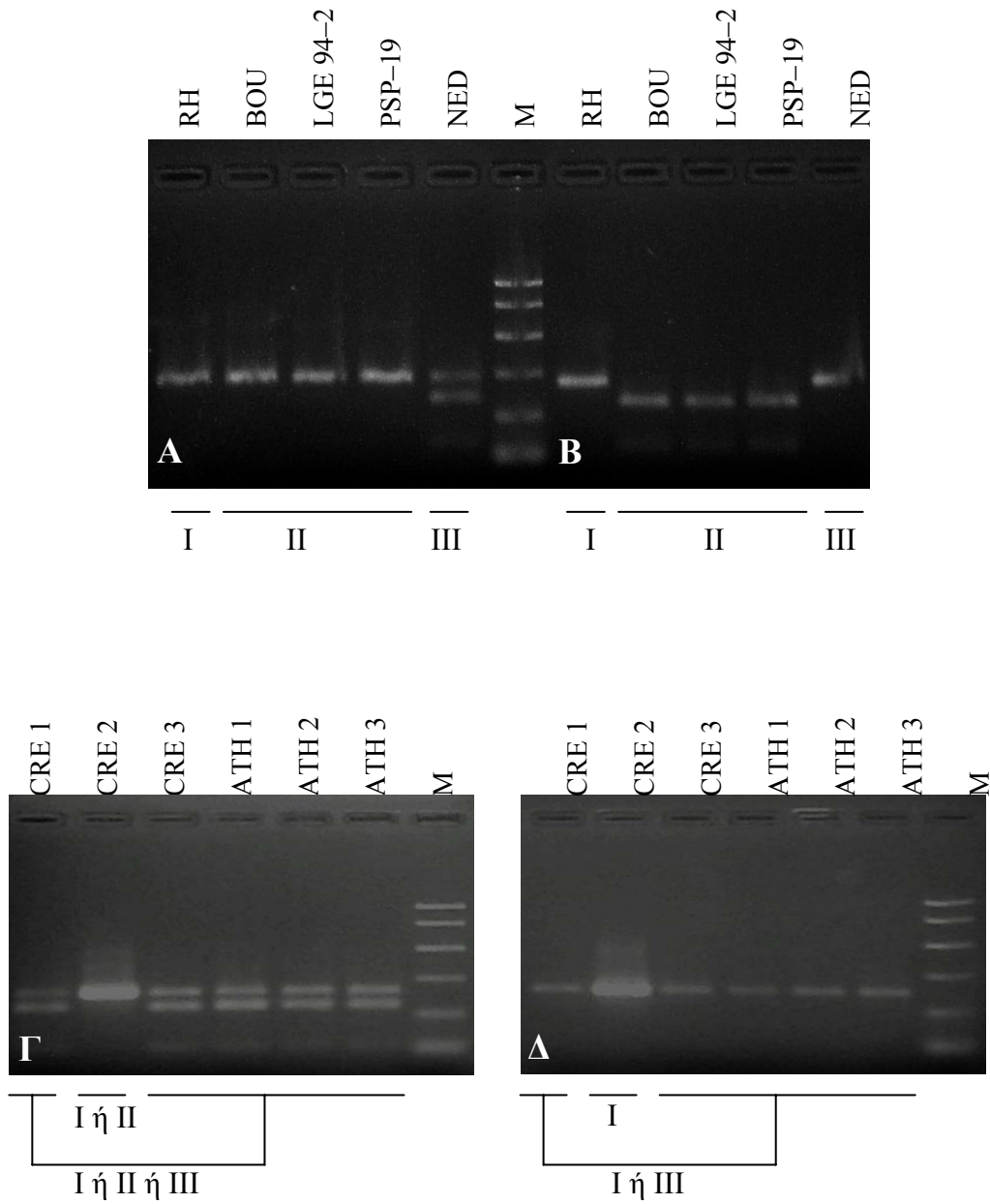
Φυλογενετική Σύγκριση Στελεχών

Η ευθυγράμμιση των 19 αλληλουχιών (6 κλινικών δειγμάτων, και 13 στελεχών αναφοράς) στο ClustalW Multiple Sequence alignment Program (Παράρτημα 7, σελ. 182), οδήγησε στην αναγνώριση μόνο 8 διαφορετικών κατηγοριών αλληλουχιών οι οποίες συγκέντρωσαν και τα 19 δείγματα τα οποία αναλύθηκαν (Πίνακας 6-3, σελ. 125). Τα αλληλόμορφα B, D, E συγκέντρωσαν τα 14 από τα 19 στελέχη, ενώ παρατηρήθηκαν 5 μοναδικά αλληλόμορφα (A, C, F, G, H) (Πίνακας 6-3, σελ. 125). Τα αλληλόμορφα A, C, E (στελέχη ATH1, ATH3, BOU, LGE94-2, LGE96-1, PSP19, BEVERLEY) και τα αλληλόμορφα D, G, H (στελέχη CRE2, RH, MAS, S48, CASTELLS, RUB) παρουσιάζουν μεταξύ τους μία μόνο νουκλεοτιδική διαφορά (0,28% από τα 355bp) η οποία δεν θεωρείται υπολογίσιμη αφού είναι μικρότερη από 0,5% [Grigg *et al.*, 2001] (Πίνακας 6-4, σελ. 126). Επομένως, υπάρχουν τελικά 4 διαφορετικά αλληλόμορφα (Πίνακας 6-3, σελ. 125, υπογραμμισμένα).

Στο φυλόγραμμα το οποίο προέκυψε (Εικόνα 6-4, σελ. 126), φαίνεται ότι τα στελέχη κατατάσσονται σε δύο γενεαλογικές γραμμές γεγονός το οποίο υποστηρίζεται από τιμή αυτοδυναμίας (bootstrap) 65%: μία στην οποία ομαδοποιούνται τα στελέχη τύπου I και III (σε ξεχωριστούς κλάδους), και μία δεύτερη στην οποία ομαδοποιούνται τα στελέχη τύπου II, μαζί με τα ATH1 και ATH3, τα οποία με την PCR-RFLP αποτελούσαν πιθανά ανασυνδυασμένα στελέχη. Το στέλεχος COUGAR φαίνεται πως συνδέεται περισσότερο με τα στελέχη τύπου I και III, παραμένοντας όμως ανεξάρτητο στο φυλόγραμμα. Από την ανάλυση, φαίνεται πως τα στελέχη τα οποία ανήκουν στα ζυμοδέματα 1, 5, 6 και 7, είναι πανομοιότυπα, ενώ μαζί κατατάσσονται και τα στελέχη τα οποία ανήκουν στα ζυμοδέματα 2 και 4 (Εικόνα 6-4, σελ. 126).

Πίνακας 6-2. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα μοριακής τυποποίησης στελεχών του *T. gondii* με RFLP και αλληλούχισης.

Στέλεχος	SAG2		
	RFLP	Αλληλουχία στο σημείο περιορισμού	Ευθυγράμμιση αλληλουχιών
CRE 1	I ή III	III	III
CRE 2	I	I	I
CRE 3	I ή III	III	III
ATH 1	I ή III	II ή III	II
ATH 2	I ή III	III	III
ATH 3	I ή III	II ή III	II
RH	I	I	I
BOU	II	II	II
LGE 94-2	II	II	II
PSP-19	II	II	II
NED	III	III	III



Εικόνα 6-2. PCR-RFLP στο γονίδιο SAG2 του *T. gondii*. (A) Επίδραση *Sau3AI* σε προϊόντα SAG2 5' στελεχών αναφοράς, (B) Επίδραση *HhaI* σε προϊόντα SAG2 3' στελεχών αναφοράς (Γ) Επίδραση *Sau3AI* σε προϊόντα SAG2 5' κλινικών δειγμάτων, (Δ) Επίδραση *HhaI* σε προϊόντα SAG2 3' κλινικών δειγμάτων; M, Promega PCR markers (1.000, 750, 500, 300, 100, 50 bp).

Εικόνα 6-3. Διαφορές μεταξύ των στελεχών του *T. gondii* τα οποία τυποποιήθηκαν μοριακά και ταξινομήθηκαν φυλογενετικά. Τα νουκλεοτίδια 26–29 αντιπροσωπεύουν το σημείο αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου *Sau3AI* (GATC, με κόκκινο όσα στελέχη το κατέχουν), ενώ τα νουκλεοτίδια 332–335 αντιπροσωπεύουν το σημείο αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου *HhaI* (GCGC, με κόκκινο όσα στελέχη το κατέχουν). Οι πλύες αντιπροσωπεύουν βάσεις τις οποίες κάποια στελέχη δεν κατέχουν. Οι αστερίσκοι αντιπροσωπεύουν τα νουκλεοτίδια στα οποία παρατηρείται πολυμορφισμός.

	2222672222223333333
	67899212468890113333
Taxon/Node	83253491232345

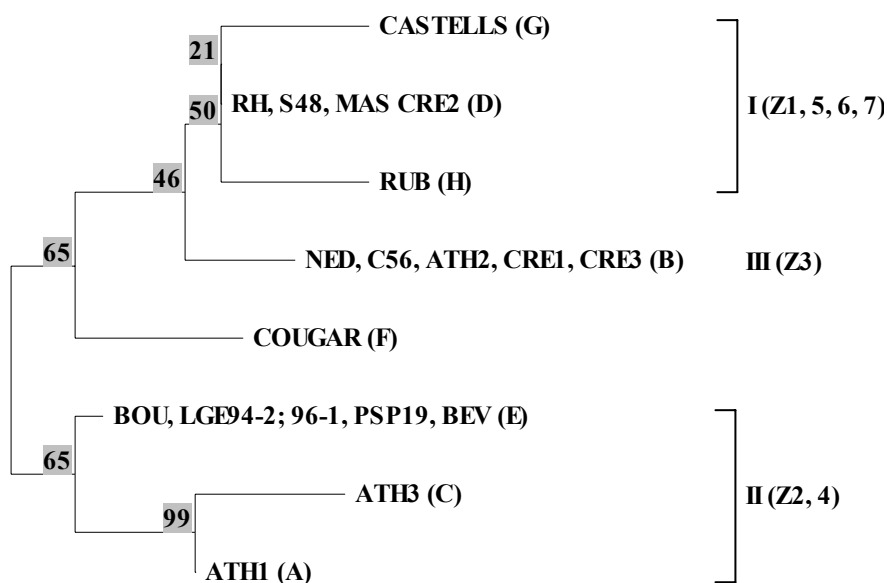
ATH1	GATC TTG --ACGGAG- GCGC
ATH2	GATC TTG TTACGGACGGTGC
ATH3	GATC TTG --NGNNNG- GCGC
CRE1	GATC TTG --ACGGAC-GTGC
CRE2	GATTTTG--ACGGAC-GTGC
CRE3	GATC TTG --ACGGAC-GTGC
BOU	GATTTTG--ACGGAG- GCGC
LGE94-2	GATTTTG--ACGGAG- GCGC
NED	GATC TTG --ACGGAC-GTGC
PSP19	GATTTTG--ACGGAG- GCGC
RH	GATTTTG--ACGGAC-GTGC
C56	GATC TTG --ACGGAC-GTGC
BEVERLEY	GATTTTG--ACGGAG- GCGC
COUGAR	GATTTTG--ACGGAC- GCGC
CASTELLS	GATTTGG--ACGGAC-GTGC
RUB	GATTTTA--ACGGAC-GTGC
MAS	GATTTTG--ACGGAC-GTGC
LGE96-1	GATTTTG--ACGGAG- GCGC
S48	GATTTTG--ACGGAC-GTGC
.....	***** * *

Πίνακας 6-3. Αλληλόμορφα που προέκυψαν από την ευθυγράμμιση των αλληλουχιών.

Αλληλόμορφο	Προσδιορισμός αλληλόμορφου	Πανομοιότυπα στελέχη
CTTGCGC	<u>A</u>	ATH1
CTTGCCT	<u>B</u>	NED, C56, CRE1, CRE3, ATH2
CTTGGGC	C	ATH3
TTTGCCT	<u>D</u>	RH, MAS, S48, CRE2
TTTGCGC	E	BOU, LGE94-2, PSP19, BEVERLEY, LGE96-1
TGTGCCC	<u>F</u>	COUGAR
TTGGCCT	G	CASTELLS
TTTACCT	H	RUB

Πίνακας 6-4. Νουκλεοτιδικές διαφορές των αλληλόμορφων.

Διαφορά νουκλεοτιδίων (%) στα διαφορετικά αλληλόμορφα								
	A	B	C	D	E	F	H	
A		0,56	0,28	0,85	0,28	0,85	1,13	1,13
B	0,56		0,85	0,28	0,85	0,85	0,56	0,56
C	0,28	0,85		1,13	0,56	1,13	1,41	1,41
D	0,85	0,56	1,13		0,56	0,56	0,28	0,28
E	0,28	0,85	0,56	0,56		0,56	0,85	0,85
F	0,85	0,85	1,13	0,56			0,85	0,85
G	1,13	0,85	1,41	0,28	0,85	0,85		0,56
H	1,13	0,56	1,41	0,28	0,85	0,85	0,56	



Εικόνα 6-4. Φυλόγραμμα των στελεχών του *T. gondii*. Οι τιμές bootstrap (αυτοδυναμίας) φαίνονται πάνω στις γραμμές των κλάδων. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως φυλόγραμμα, με αφετηρία μέσου σημείου (midpoint rooting).

Συζήτηση

Παρά το γεγονός ότι η τοξοπλάσμωση είναι μία ζωνόσος συνήθως ασυμπτωματική σε υγιή άτομα, το *T. gondii* προκαλεί σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα σε συγγενώς μολυσμένα έμβρυα, σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, κυρίως ασθενείς με HIV, και δέκτες μοσχευμάτων [Luft & Remington 1992; Wong & Remington 1994; Israelski & Remington 1993]. Το *T. gondii* απαντάται σε όλο τον κόσμο σε υψηλή συχνότητα και εξαιρετικά ευρεία ποικιλία ξενιστών, και έχει έναν καλά μελετημένο αμφιγονικό κύκλο ζωής. Εντούτοις, η συντριπτική πλειοψηφία των στελεχών του *T. gondii* (>94%) κατηγοριοποιούνται σε μία από μόνο τρεις ξεχωριστές κλωνικές γραμμές (τύπου I, II και III), και δεν επιδεικνύουν την πρόσμιξη που θα αναμενόταν από έναν πληθυσμό με αμφιγονικό κύκλο ζωής [Howe & Sibley, 1995; Dardé *et al.*, 1996]. Οι τρεις κλωνικοί τύποι διαφέρουν όχι μόνο στο γονότυπο, αλλά και στον φαινότυπο, αφού τα στελέχη τύπου I είναι εξαιρετικά λοιμογόνα σε ποντίκια και πιθανώς και στον άνθρωπο [Grigg *et al.*, 2001], ενώ τα στελέχη τύπου II και III είναι σχετικά μη-λοιμογόνα [Sibley & Boothroyd, 1992; Sibley & Howe, 1996; Howe *et al.*, 1996; 1997]. Οι δύο μη-λοιμογόνοι τύποι επικρατούν, παρ'όλα αυτά, και εγκαθιστούν χρόνιες λοιμώξεις σε ανθρώπους και ζώα [Howe & Sibley, 1995; Howe *et al.*, 1997].

Στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν η μοριακή τυποποίηση των στελεχών του *T. gondii* τα οποία απαντώνται στην Ελλάδα, ο συσχετισμός του γονότυπου των συγκεκριμένων στελεχών με την προκεκλημένη μητρική ή/και εμβρυϊκή νόσο, και η φυλογενετική σύγκριση των στελεχών τα οποία απαντώνται στην Ελλάδα με άλλα στελέχη τα οποία έχουν απομονωθεί σε διαφορετικά μέρη του κόσμου.

Για πρώτη φορά στη Ελλάδα τυποποιήθηκαν μοριακά στελέχη του *T. gondii*. Με τη χρήση της τεχνικής της PCR-RFLP στο γονίδιο *SAG2* [Howe *et al.*, 1997] καθίσταται δυνατή η κατηγοριοποίηση των στελεχών του *T. gondii* στους τρεις κλωνικούς τύπους I, II και III. Τυποποιήθηκαν απ'ευθείας από εκχυλισμένο DNA, 5 στελέχη αναφοράς και 6 στελέχη του *T. gondii* τα οποία προήλθαν από έγκυες γυναίκες με οξεία τοξοπλάσμωση (Κεφάλαιο 3). Η μοριακή τυποποίηση στο γονίδιο *SAG2* οδήγησε στην κατηγοριοποίηση του στελέχους RH ως στέλεχος τύπου I, των στελεχών BOU, LGE 94-2 και PSP-19 ως στελέχη τύπου II, και του στελέχους NED ως

στέλεχος τύπου III. Μόνο ένα από τα 6 στελέχη (CRE2) τα οποία προήλθαν από κλινικά δείγματα κατηγοριοποιήθηκε τελεσίδικα ως στέλεχος τύπου I με την PCR–RFLP. Τα υπόλοιπα στελέχη κατηγοριοποιούνται ως στελέχη I/III, γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται σε τρία πράγματα: (α) για κάποιο λόγο υπάρχει ατελής πέψη των προϊόντων, εντούτοις τα στελέχη ανήκουν είτε σε αυτά του τύπου I ή σε τύπου III (β) το κλινικό δείγμα είναι μολυσμένο με δύο στελέχη *T. gondii*: ένα στέλεχος τύπου I και ένα στέλεχος τύπου III, και (γ) πρόκειται για ανασυνδυασμένα στελέχη τα οποία προήλθαν από ανασυνδυασμό μεταξύ στελεχών τύπου I και III.

Για να διερευνηθεί περαιτέρω η ταυτότητα των στελεχών που παρουσίασαν μικτή εικόνα, πραγματοποιήθηκε άμεση αλληλούχιση στα δείγματα της nested PCR. Έτσι, τα στελέχη ATH2, CRE1 και CRE3, κατηγοριοποιήθηκαν ως στελέχη τύπου III, αφού κατέχουν το σημείο περιορισμού για το ένζυμο *Sau3AI*, αλλά όχι για το *HhaI*, και συμπεραίνεται πως πράγματι, η μικτή εικόνα ήταν αποτέλεσμα ατελούς πέψης των προϊόντων της PCR. Όσον αφορά στα στελέχη ATH1 και ATH3 τα οποία επίσης με την PCR–RFLP φαίνεται να παρουσιάζουν μικτή εικόνα I/III, με την αλληλούχιση αποκλείεται η πιθανότητα ατελούς πέψης αφού κατέχουν τα σημεία περιορισμού και για το *Sau3AI* και για το *HhaI*. Παραμένει λοιπόν η πιθανότητα είτε να αποτελούν ανασυνδυασμό μεταξύ στελεχών τύπου II και στελεχών τύπου III, ή να πρόκειται για μόλυνση με δύο διαφορετικά στελέχη του *T. gondii*.

Οι τρεις γενεαλογικές γραμμές του *T. gondii* διαφέρουν μόνο 1–2% στο επίπεδο της αλληλουχίας του DNA [Howe & Sibley 1995], και η ασυνήθιστη διμορφική αλληλική συγκρότηση υποδηλώνει ότι έχουν προέλθει από κοινό, πρόσφατο πρόγονο [Grigg *et al.*, 2001]. Το γεγονός ότι ένα είδος με τόσο ξεκάθαρο αμφιγονικό κύκλο είναι δυνατόν να έχει μία τέτοια πληθυσμιακή δομή οφείλεται πιθανώς σε δύο γεγονότα: ο αμφιγονικός κύκλος δεν είναι υποχρεωτικός αφού ο κύκλος μπορεί να διαιωνιστεί μέσω σαρκοφαγίας χωρίς την εμπλοκή της γάτας, επιτρέποντας στα περισσότερα ικανά στελέχη του *T. gondii* να επικρατήσουν. Επιπλέον, το *T. gondii* είναι απλοειδής οργανισμός. Επομένως μία γάτα η οποία μολύνεται με ένα μόνο στέλεχος, θα παράξει ωοκύστεις γενετικά πανομοιότυπες με το αρχικό στέλεχος. Εντούτοις, δεν είναι γνωστή η συχνότητα με την οποία μία γάτα δύναται να μολυνθεί με περισσότερα από ένα στέλεχος την ίδια στιγμή, αφού τα παραδείγματα μικτών μολύνσεων στη φύση είναι σπάνια [Ajzenberg *et al.*, 2002].

Η ευθυγράμμιση των 19 αλληλουχιών (6 κλινικών δειγμάτων, και 13 στελεχών αναφοράς) οδήγησε στην αναγνώριση μόνο 8 διαφορετικών κατηγοριών αλληλουχιών (αλληλόμορφων). Τα αλληλόμορφα B (ATH2, CRE1, CRE3, NED, C56, NED), D (CRE2, RH, MAS, S48), και E (BOU, LGE94–2, LGE96–1, PSP19, BEVERLEY) συγκέντρωσαν τα περισσότερα στελέχη, ενώ παρατηρήθηκαν 5 μοναδικά αλληλόμορφα A (ATH1), C (ATH3), F (COUGAR), G (CASTELLS) και H (RUB). Τα αλληλόμορφα A, C, E (στελέχη ATH1, ATH3, BOU, LGE94–2, LGE96–1, PSP19, BEVERLEY) και τα αλληλόμορφα D, G, H (στελέχη CRE2, RH, MAS, S48, CASTELLS, RUB) παρουσιάζουν μεταξύ τους μία μόνο νουκλεοτιδική διαφορά (0,28% από τα 355bp) η οποία δεν θεωρείται υπολογίσιμη αφού είναι μικρότερη από 0,5% [Grigg *et al.*, 2001]. Επομένως, υπάρχουν τελικά 4 διαφορετικά αλληλόμορφα: A (A, C, E), B, D (D, G, H) και F. Η μεγαλύτερη ποικιλομορφία παρουσιάζεται μεταξύ του αλληλόμορφου C με τα αλληλόμορφα G και H (1,41%).

Στο φυλόγραμμα το οποίο προέκυψε (Εικόνα 6-4, σελ. 126), φαίνεται ότι τα στελέχη κατατάσσονται σε δύο γενεαλογικές γραμμές γεγονός το οποίο υποστηρίζεται από τιμή αυτοδυναμίας (bootstrap) 65%: μία στην οποία ομαδοποιούνται τα στελέχη τύπου I και III (σε ξεχωριστούς κλάδους), και μία δεύτερη στην οποία ομαδοποιούνται τα στελέχη τύπου II, μαζί με τα ATH1 και ATH3. Φαίνεται λοιπόν, πως κατά πάσα πιθανότητα, τα στελέχη ATH1 και ATH3 αποτελούν μέλη των στελεχών τύπου II. Το στέλεχος COUGAR φαίνεται πως συνδέεται περισσότερο με τα στελέχη τύπου I και III, παραμένοντας όμως ανεξάρτητο στο φυλόγραμμα. Γεγονός παραμένει πως η ανάλυση των στελεχών με PCR–RFLP, χωρίς την εισαγωγή της αλληλούχισης, θα είχε οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα σχετικά με την ταυτότητα των στελεχών.

Έχει παρατηρηθεί υπολογίσιμη ποικιλομορφία στην εξέλιξη και την σοβαρότητα της τοξοπλάσμωσης σε συγγενώς μολυσμένα νεογνά και σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Αρκετές μελέτες έχουν παρατηρήσει αυξημένη συχνότητα των στελεχών τύπου II σε σοβαρές περιπτώσεις ανθρώπινης νόσου (AIDS και ΣΤ), υπονοώντας ότι τα στελέχη αυτά μπορεί να είναι περισσότερο μολυσματικά και στους ανθρώπους [Howe & Sibley, 1995; 1997; Honore *et al.*, 2000; Ajzenberg *et al.*, 2002; Dardé *et al.*, 1992]. Αντίθετα, στελέχη των τύπων I, και III, βρέθηκαν ισομερώς διαδεδομένα σε 34 φυσικώς μολυσμένα ζώα, υποδεικνύοντας ειδική συνάφεια του γονότυπου II με την κλινική νόσο σε ανθρώπους [Howe & Sibley 1995].

Εντούτοις, όλα τα αναλυμένα στελέχη απομονώθηκαν από επαναλαμβανόμενες ιστοκαλλιέργειες και καλλιέργειες σε ποντίκια, και επομένως οι φαινομενικές συχνότητες των συγκεκριμένων κλωνικών ταυτοτήτων είναι πιθανόν να ευνοήθηκαν σε σχέση με στελέχη που είναι δυσκολότερο να απομονωθούν. Πρόσφατα δεδομένα, με απ'ευθείας τυποποίηση στελεχών του *T. gondii* από κλινικά δείγματα, υποδεικνύουν ότι ενώ στελέχη τύπου II επικρατούν σε ασθενείς με AIDS, για τις περισσότερες περιπτώσεις ΣΤ ευθύνονται στελέχη τύπου I [Fuentes *et al.*, 2001].

Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν 6 κλινικά δείγματα: 5 από παρασιταίμιες εγκύων, και 1 από διαπλακουντική μετάδοση του παρασίτου στο έμβρυο. Από τα δείγματα αυτά 1 ανήκει στα στελέχη τύπου I, 3 στα στελέχη τύπου III, και 2 ανασυνδυασμένα στελέχη II/III. Το στέλεχος CRE2 (I) προέκυψε από γυναίκα που κυοφορούσε τρίδυμα, και απέβαλε το ένα παρουσιάζοντας εικόνα έντονης λεμφαδενοπάθειας, παρουσία ορολογικής εικόνας οξείας τοξοπλάσμωσης. Το στέλεχος ATH2 (III) προέκυψε από εξέταση αμνιακού υγρού, ενώ μετά από θεραπεία το νεογνό γεννήθηκε υγιές. Όσον αφορά στα υπόλοιπα στελέχη CRE1, CRE3 (III) και ATH1, ATH3 (II/III), μετά από θεραπεία, δεν ανιχνεύθηκε διαπλακουντική μεταφορά του παρασίτου από εξέταση του αμνιακού υγρού, και τα νεογνά γεννήθηκαν υγιή. Αν και το δείγμα το οποίο εξετάστηκε, από άποψη αριθμού στελεχών, είναι μικρό, φαίνεται ξεκάθαρα το γεγονός ότι το στέλεχος τύπου I προκάλεσε τη σοβαρότερη εκδήλωση ΣΤ με την αυτόματη αποβολή του εμβρύου, ενώ τα υπόλοιπα στελέχη δεν προκάλεσαν ΣΤ συμφωνώντας με άλλους ερευνητές [Fuentes *et al.*, 2001].

Θα ήταν πλεονέκτημα να αναπτυχθούν μέθοδοι με τη δυνατότητα να αναλύουν τον γονότυπο των στελεχών του *T. gondii* από πρωτογενή κλινικά δείγματα, ή μετά από την ελάχιστη δυνατή καλλιέργεια [Howe *et al.*, 1997; Fuentes *et al.*, 2001], εφ'όσον αυτή μπορεί να μην είναι δυνατή σε όλες τις περιπτώσεις. Η απ' ευθείας ανάλυση θα ευνοούσε σημαντικά και την ανάλυση αποθηκευμένων δειγμάτων, όπως αίμα, αντικειμενοφόρες πλάκες και ιστούς διατηρημένους σε παραφίνη ή φορμαλίνη.

Είναι η πρώτη φορά που τυποποιούνται μοριακά και συγκρίνονται φυλογενετικά στελέχη τα οποία απαντώνται στην Ελλάδα, με άλλα στελέχη τα οποία έχουν απομονωθεί σε άλλα μέρη του κόσμου. Θα ήταν εξαιρετικά ενδιαφέρον να τυποποιηθούν συστηματικά τα στελέχη τα οποία ευθύνονται για λοιμώξεις σε ανθρώπους και ζώα, και να συσχετιστούν επιδημιολογικά. Έτσι θα ήταν, ίσως, δυνατόν

να προσδιοριστούν οι δεξαμενές του παρασίτου στην Ελλάδα, και να προσδιοριστεί ο τύπος των τελεχών ο οποίος ευθύνεται για τις μολύνσεις σε κάθε ξενιστή.

I Βιβλιογραφία

- Ajzenberg D, Banuls AL, Tibayrenc M, Dardé ML.** Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int J Parasitol.* 2002;32:29–38.
- Akstein RB, Wilson LA, Teutsch SM.** Acquired toxoplasmosis. *Ophthalmology.* 1982;89:1299–302.
- Alford CA, Stagno S, Reynolds DW.** Congenital toxoplasmosis: clinical, laboratory, and therapeutic considerations, with special reference to sub-clinical cases. *Bull N Y Acad Med.* 1974;50:160–81.
- Alfors K, Börjeson M, Huldth G, Forsberg E.** Incidence of toxoplasmosis in pregnant women in the city of Malmö, Sweden. *Scand J Infect Dis.* 1989;21:315–21.
- Antoniou M, Tselentis Y, Babalis T, Gikas A, Stratigakis N, Vlachonicolis I, Kafatos A, Fioretos M.** The seroprevalence of ten zoonoses in two villages of Crete, Greece. *Eur J Epidemiol.* 1995;11:415–23.
- Antoniou M, Economou I, Wang X, Psaroulaki A, Spyridaki I, Papadopoulos B, Christidou A, Tsafantakis E, Tselentis Y.** Fourteen-year seroepidemiological study of zoonoses in a Greek village. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(1):80–5.
- Antoniou M, Tzouvali H, Sifakis S, Galanakis E, Georgopoulou E, Liakou V, Giannakopoulou C, Koumantakis E, Tselentis Y.** Incidence of toxoplasmosis in 5,532 Pregnant Women in Crete, Greece: Management of 185 Cases at Risk. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003 (in press).
- Antsaklis A, Daskalakis G, Papantoniou N, Mentis A, Michalas S.** Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenat Diagn* 2002;22:1107–11.
- Asbury C.** Toxoplasmosis: a survey of policy and practice in UK antenatal clinics. *Midwives.* 1994;107:388–89.

- Ashburn D, Davidson MM, Joss AW, Pennington TH, Ho-Yen DO.** Improved diagnosis of reactivated toxoplasmosis. *Mol Pathol.* 1998;51(2):105–9.
- Aspöck H, Pollak A.** Prevention of prenatal toxoplasmosis by serological screening of pregnant women in Austria. *Scand J Infect Dis (Suppl).* 1992;84:32–7.
- Beaman MH, McCabe RE, Wong SY, Remington JS.** *Toxoplasma gondii.* 1993. In: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R. eds. Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone. pp. 2455–73.
- Bessières MH, Berrebi A, Rolland M, Bloom MC, Roques C, Cassaing S, Courjault C, Seguela JP.** Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001;94:37–45.
- Blackston CR, Dubey JP, Dotson E, Su C, Thulliez P, Sibley D, Lehmann T.** High-resolution typing of *Toxoplasma gondii* using microsatellite loci. *J Parasitol.* 2001;87:1472–5.
- Bobić B, Šibalić D, Djurković–Djaković O.** High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary *Toxoplasma* infection. *Gynecol Obstet Invest.* 1991;31:182–4.
- Boothroyd JC, Grigg ME.** Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol.* 2002;5:438–42.
- Brade V, Engelhardt A, Harms D.** Konnatale toxoplasmose mit verzögerter immunantwort des kindes. *Dtsch Med Wochenschr.* 1987;112:837–41.
- Bretagne S, Costa JM, Fleury–Feith J, Poron F, Dubreuil–Lemaire ML, Vivaud M.** Quantitative competitive PCR with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of toxoplasmosis in AIDS patients. *J Clin Microbiol.* 1995;33(6):1662–1664.
- Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC.** Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989;27(8):1787–92.
- Callot J, Puech J.** Toxoplasmose du rat blanc. *Ann Parasitol.* 1952;27:51–5.

- Carme B, Tirard–Fleury V.** Toxoplasmosis among pregnant women in France: seroprevalence, seroconversion and knowledge levels. Trends 1965–1995. *Med Mal Infect.* 1996;26:431–36.
- Cazevane J, Forestier F, Bessières MH, Broussin B, Beggueret J.** Contribution of a new PCR assay for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenatal Diagn.* 1992;12:119–27.
- Chambouris R, Stunzner D, Sebek Z, Sixl W, Kock M.** Toxoplasmosis in dogs in Greece *Geogr Med Suppl.* 1989;3:19–22.
- Charvalos A, Manetas S, Georgiladakis A, Tselentis Y.** Epidemiological investigation of Toxoplasmosis in rural areas in Greece. *Med J Infect Paras Dis.* 1995;10:200–2.
- Chatterton JMW.** Pregnancy. In: Ho–Yen DO, Joss AWL, eds. *Human toxoplasmosis.* Oxford: Oxford University Press, 1992. pp. 144–83.
- Chumpitazi BFF, Boussaid A, Pelloux H, Racinet C, Bost M, Goullier–Fleuret A.** Diagnosis of congenital toxoplasmosis by immunoblotting and relationship with other methods. *J Clin Microbiol* 1995;33(6):1479–1485.
- Contini C, Romani R, Magno S, Delia S.** Diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in AIDS patients by a tissue–culture technique. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1995;14(5):434–40.
- Cook AJC, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, Foulon W, Semprini AE, Dunn DT.** Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multi–center case–control study. *BMJ.* 2000;321:142–7.
- Couvreur J, Thulliez P, Daffos F, Aufrant C, Bompard Y, Gesquiere A, Desmonts G.** Foetopathie toxoplasmique: traitement in utero par l’ association de pyrimethamine–sulfamides. *Arch Pediatr* 1991;48:397–403.
- Daffos F, Forestier F, Capella–Pavlovsky M, Thulliez P, Aufrant D, Valenti D, Cox WL.** Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis. *N Engl J Med.* 1988;318:271–5.
- Dahl RJ, Johnson AM.** Purification of *Toxoplasma gondii* from host cells. *J Clin Pathol.* 1983;36:602–4.

- Dardé ML, Bouteille B, Pestre–Alexandre M.** Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. *Am J Trop Med Hyg.* 1988;39:551–8.
- Dardé ML, Bouteille B, Pestre–Alexandre M.** Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates: biological and epidemiological implications. *J Parasitol.* 1992;78:786–94.
- Dardé ML.** Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;219:27–41.
- Decavalas G, Papapetropoulou M, Giannoulaki E, Tzigounis V, Kondakis XG.** Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in gravidas and recently aborted women and study of risk factors. *Eur J Epidemiol.* 1990;6(2):223–6.
- Department of Health.** The patients’s charter. 1991. London: HMSO.
- Derouin F, Mazon MC, Garin YJ.** Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol.* 1987;25:1597–1600.
- Derouin F, Thulliez P, Garin Y.** [Value and limitations of toxoplasmosis serology in HIV patients. *Path Biol.* 1991;39:254–9.
- Derouin F, Leport C, Pueyo S, Morlat P, Letrillart B, Chêne G, Echobicon JL, Luft B, Aubertin J, Hafner R, Vildé JL, Salamon R, ANRS 005/ACTG 154 Trial Group.** Predictive value of *Toxoplasma gondii* antibody titers on the occurrence of toxoplasmic encephalitis in HIV–infected patients. *AIDS.* 1996;10:1521–7.
- Desmots G, Remington JS.** Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma*. *J Clin Microbiol.* 1980;11:562–568.
- Desmots G, Naot Y, Remington JS.** IgM–immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. *J Clin Microbiol.* 1981;14:486–91.
- Desmots G.** Les recherches d’anticorps IgM spécifiques par immuno–adsorption (immunosorbent assay). *Lyon Méd.* 1982;248:37–41.
- Desmots G, Couvreur J.** Toxoplasmose congenitale. Etude prospective de l’ issue de la grossesse chez 542 femmes atteintes de toxoplasmose acquise en cours de gestation. *Semaine des Hospitaux de Paris.* 1986;62:1418–22.

- Desmonts C, Couvreur J, Alison F, Baudelot J, Gerbeaux J, Lelong M.** Epidemiological study on toxoplasmosis: the influence of cooking slaughter animal meat on the incidence of human infection. *Rev Fr Etud Clin Biol.* 10:952–8.
- Dubey JP, Frenkel JK.** Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool.* 1972;19:155–77.
- Dubey JP, Frenkel JK.** Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J Protozool.* 1976;23:537–46.
- Dubey JP.** Toxoplasmosis in cats. *Feline Pract.* 1986;16:12–45.
- Dubey JP, Murrell KD, Fayer R.** Distribution of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in commercial cuts of pork. *J Am Vet Med Assoc.* 1986;188:1035–7.
- Dubey JP.** Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *Toxoplasma gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *Am J Vet Res.* 1988;49:910–3.
- Dubey JP, Beattie CP.** Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton, F. L: CRC Press, 1988.
- Dubey JP.** Toxoplasmosis in sheep, goats, pigs, and cattle. In: Dubey JP, Beattie C. eds. Toxoplasmosis in animals and man. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1988;61–14.
- Dubey JP, Kirkbride CA.** Economic and public health considerations of congenital toxoplasmosis in lambs. *J Am Vet Med Assoc.* 1989;195:1715–6.
- Dubey JP.** Toxoplasmosis: an overview. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1991;22:88–92.
- Dubey JP.** *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidian of humans and animals. 1993. In: Kreier JP, editor. Parasitic protozoa, 2nd ed. Parasitic protozoa, vol. 6. pp. 1–158.
- Dubey JP, Thulliez P.** Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Am I Vet Res.* 1993;54:270–3.
- Dupey JP.** Toxoplasmosis. *J Am Vet Med Assoc.* 1994;205:1593–8.
- Dubey JP, Weigel RM, Siegel AM, Thulliez P, Kitron UD, Mitchell MA, Mannelli A, Mateus-Pinilla NE, Shen SK, Kwok OCH, Todd KS.** Sources and

- reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection of 47 swine farms in Illinois. *J Parasitol.* 1995;81:723–9.
- Dubey JP.** Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. *Vet Parasitol.* 1996;64:65–70.
- Dubey JP.** Toxoplasmosis, sarcocystosis, isosporosis, and cyclosporiasis. 1998. In: Palmer SR, Soulsby EJJ, Simpson DJH. eds. *Zoonoses.* Oxford: Oxford University Press. pp. 579–97.
- Dubey JP.** Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 1998;28:1019–24.
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA.** Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(2):267–99.
- Dubey JP.** The scientific basis for prevention of *Toxoplasma gondii* infection: studies on tissue cyst survival, risk factors and hygiene measures. In: Ambroise–Thomas P, Petersen E. eds. *Congenital toxoplasmosis: scientific background, clinical management and control.* Paris: Springer–Verlag. 2000. pp. 271–5.
- Dubey JP, Graham DH, Blackston CR, Lehmann T, Gennari SM, Ragozo AM, Nishi SM, Shen SK, Kwok OC, Hill DE.** Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings. *Int J Parasitol.* 2002;32:99–105.
- Dubremetz JF, Schwartzman JD.** Subcellular organelles of *Toxoplasma gondii* and host cell invasion. *Res Immunol.* 1993;144(1):31–3.
- Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R.** Mother–to–child transmission of toxoplasmosis: risk estimate for clinical counseling. *Lancet.* 1999;353:1829–33.
- Dupouy–Camet J, Bougnoux ME, Lavareda de Souza S, Thulliez P, Mandelbrot L, Ancelle T, Tourte–Schaefer C, Benarous R.** Comparative value of polymerase chain reaction and conventional diagnostic tests for the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Ann Biol Clin.* 1992;50:315–9.

- Ebbesen P.** Placenta physiology. In: Ambroise–Thomas P, Petersen E, eds. Congenital toxoplasmosis: scientific background, clinical management and control. Paris: Springer–Verlag, 2000. pp. 27–35.
- Edelhofer R.** Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in pigs in Austria—an evaluation of data from 1982 and 1992. Parasitol Res. 1994;80:642–4.
- Evans R.** Life cycle and animal infection. 1992. In: Ho–Yen DO, Joss AWL. eds. Human toxoplasmosis. Oxford: Oxford Univeristy Press. pp. 26–55.
- Fazaeli A, Carter PE, Dardé ML, Pennington TH.** Molecular typing of *Toxoplasma gondii* strains by GRA6 gene sequencing analysis. Int J Parasitol. 2000;30:637–42.
- Ferguson DJP, Birch–Andersen A, Slim JC, Hutchison WM.** Observations of the ultrastructure of the sporocyst and the initiation of sporozoite formation in *Toxoplasma gondii*. Acta Pathol Microbiol Scand Sect B. 1978;86:165–7.
- Filice GA, Hitt JA, Mitchell CD, Blackstad M, Sorensen W.** Diagnosis of *Toxoplasma* parasitemia in patients with AIDS by gene detection after amplification with polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1993;31(9):2327–31.
- Francis JM, Joyson DHM.** Duration of specific immunoglobulin A antibodies following acute toxoplasmosis as determined by enzyme immunoassay and immunosorbent agglutination assay. Eur J Microbiol Infect Dis. 1993;12:556–7.
- Franck J, Mary C, Laugier M, Dumon H, Quilici M.** Apport du western blot au diagnostic de la toxoplasmose congénitale. Bull Soc Fr Parasitol. 1992;10:3–11.
- Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL.** *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. Science. 1970;167(919):893-6.
- Frenkel JK.** *Toxoplasma* in and around us. BioScience. 1973;23:343-52.
- Frenkel JK.** Biology of *Toxoplasma gondii*. In: Ambroise–Thomas P, Peterse E. eds. Congenital toxoplasmosis: scientific background, clinical management and control. Paris: Springer–Verlag. 2000. pp. 9–25.
- Frydas S, Theodoridis Y, Rallis T, Adamama–Moraitou KK, Papazahariadou M, Hatzistilianou M, Di Gioacchino M, Felaco M, Di Gioacchino M, Cavallucci E, Verna N, Paolini F, Ciuffreda S, Raimondo S, Sciascio MB, Di Stefano F, Romano A, Boscolo P.** A seroepidemiological study of *Toxoplasma gondii*

- infection in children of northern Greece. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2000;13(3):157–62.
- Fuentes I, Rubio JM, Ramirez C, Alvar J.** Genotypic characterisation of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: Direct analysis from clinical samples. *J Clin Microbiol*. 2001; 39 (4): 1566–70.
- Fulton JD, Fleck DG, Payne RA.** Prevalence of *toxoplasma* antibodies in sera from Greece and Africa. *J Hyg (Lond)*. 1966;64(1):75–9.
- Gatopoulou AT, Zorba CG, Giakoum GP, Panagiotopoulou AG, Athanasopoulos PK.** Serological investigations of antibodies to *Toxoplasma gondii* in women of reproductive age living in Achaia in the four-year period 1991–1995. *Acta Microbiol Hell*. 1997;42:513–21.
- Gavinet MF, Robert F, Firtion G, Delouvrier E, Hennequin C, Maurin JR, Tourte-Schaeffer C, Dupouy-Camet J.** Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. *J Clin Microbiol*. 1997;35(5):1276–7.
- Gay-Andrieu F, Marty P, Pialat J, Sournies G, Drier de Laforte T, Peyron F.** Fetal toxoplasmosis and negative amniocentesis: necessity of an ultrasound follow-up. *Prenat Diagn*. 2003;23(7):558–60.
- Gershoni JM, Palade GE.** Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem*. 1983;131:1–15.
- Grigg ME, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y, Boothroyd JC.** Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science*. 2001;294:161–65.
- Grover CM, Thulliez P, Remington JS, Boothroyd JC.** Rapid prenatal diagnosis of congenital *toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *J Clin Microbiol*. 1990;28(10):2297–301.
- Guay JM, Dubois D, Morency MJ, Gagnon S, Mercier J, Levesque RC.** Detection of the pathogenic parasite *Toxoplasma gondii* by specific amplification of ribosomal sequences using comultiplex polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1993;31(2):203–7.
- Gump DW, Holden RA.** Acquired chorioretinitis due to toxoplasmosis. *Ann Intern Med*. 1979;90:58–60.

- Guo ZG, Johnson AM.** Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Parasitology*. 1995;111:127–32.
- Hellbrugge T, Dahme E.** Experimentelle toxoplasmose. Bemerkungen zur arbeit von Schultz und Bauer uber placentalbefunde bei ratten. *Klin Wochem Schr*. 1953;31:789–91.
- Hellbrugge T, Spiegler W, Grewing W.** Klinische, morphologische und serologische befunde bei der generalisierten toxoplasmose der ratte. *Zent Bakt Infekt Hyg*. 1956;165:495–506.
- Hellerbrand C, Goebel FD, Disko R.** High predictive value of *Toxoplasma gondii* IgG antibody levels in HIV–infected patients for diagnosis of cerebral toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1996; 15:869–72.
- Higgins DG, Thomson JD, Gibson TJ.** CLUSTAL W Multiple sequence alignment program. version 1.7 (<http://www.sgi.com/chembio/resources/clustalw/>). 1997
- Hitt JA, Filice GA.** Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by gene amplification, cell culture, and mouse inoculation. *J Clin Microbiol*. 1992;30(12):3181–4.
- Hohlfeld P, Daffos JM, Thulliez P, Aufrant C, Couvreur J, MacAleese J, Descombey D, Forestier F.** Fetal toxoplasmosis: outcome of pregnancy and infant follow–up after in utero treatment. *J Pediatr*. 1989;115:765–9.
- Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vivaud M.** Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase chain reaction on amniotic fluid. *N Engl J Med*. 1994;331(11):695–9.
- Holliman RE, Johnson JD.** The post–natal serodiagnosis of congenital toxoplasmosis. *Serodiagn Immunother Infect Dis*. 1989;3:323–7.
- Holliman RE.** Recent developments in the diagnosis of toxoplasmosis. *Serodiagn Immunother Infect Dis*. 1994;6:5–16.
- Honore S, Couvelard A, Garin YJ, Bedel C, Henin D, Dardé ML, Derouin F.** Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients. *Pathol Biol (Paris)*. 2000;48:541–7.
- Howe DK, Sibley LD.** *Toxoplasma gondii* comprises of three clonal lineages: Correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*. 1995;172:1561–6.

- Howe DK, Summers BC, Sibley LD.** Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 1996;64:5193–8.
- Howe DK, Honoré S, Derouin F, Sibley LD.** Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 1997;35(6):1411–4.
- Ho–Yen DO.** Immunocompromised patients. In: Ho–Yen DO and Joss AWL eds. Human toxoplasmosis. Oxford Medical Publications, Oxford, United Kingdom. 1992. p. 184–203.
- Ho–Yen DO.** Clinical features. In: Ho–Yen DO and Joss AWL eds. Human toxoplasmosis. Oxford Medical Publications, Oxford, United Kingdom. 1992. pp. 56–78.
- Ho–Yen DO, Dargie L, Chatterton JMW, Petersen E.** *Toxoplasma* health education in Europe. *Health Educ J.* 1995;54:415–20.
- Hutchison WM.** Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature.* 1965;206:961–2.
- Israelski DM, Remington JS.** Toxoplasmosis in the non–AIDS immunocompromised host. *Curr Clin Top Infect Dis.* 1993;13:322–56.
- Jackson MH, Hutchison WM.** The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Adv Parasitol.* 1989;28:55–105.
- Jacobs L, Jones FE.** The parasitemia in experimental toxoplasmosis. *J Infect Dis.* 1957;87:78–89.
- Jacobs L, Melton ML.** Toxoplasmosis in chickens. *J Parasitol.* 1966;52:1158–62.
- Janku J.** Pathogénèse et anatomie pathologique de la macula dans un oeil de dimension normale et dans un oeil microphthalmique avec parasite dans la rétine. *Casopis Lekaruv Ceskych* 1923;62: 21–7.
- Johnson AM.** Speculation on possible life cycles for the clonal lineages in the genus *Toxoplasma*. *Parasitol Today.* 1997;13:393–7.
- Joiner KA, Dubremetz JF.** *Toxoplasma gondii*: A protozoan for the nineties. *Infect Immun.* 1993;61:1169–72.
- Joss AWL.** Diagnosis. 1992. In: Ho–Yen DO, Joss AWL. eds. Human toxoplasmosis. Oxford: Oxford University Press. pp. 79–118.

- Kasper LH, Boothroyd JC.** *Toxoplasma gondii* and toxoplasmosis. In: Warren KS. Immunology and molecular biology of parasitic infections. 1993. Blackwell Scientific Publications. pp. 269–549.
- Kasper LH, Mineo JR.** Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. Parasitol Today. 1994;10(5):184–7.
- Kritsepi-Konstantinou M.** Serological survey of cattle for toxoplasmosis. Bull Hell Vet Med Soc. 1992;43:48–52
- Kwok S, Higuchi R.** Avoiding false positives with PCR. Nature. 1989;339:237–8.
- Ladas ID, Rallatos CL, Kanaki CS, Damanakis AG, Zafirakis PK, Rallatos G.** Presumed congenital ocular toxoplasmosis in two successive siblings. Ophthalmologica. 1999;213(5):320–2.
- Lebech M, Joynson DHM, Seitz HM, Thulliez P, Gilbert R, Dutton GN, Ovlisen B, Petersen E.** Classification system and case definitions of *Toxoplasma gondii* infection in immunocompetent pregnant women and their congenitally infected offspring. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996;15:799–805.
- Lebech M, Andersen O, Christensen NC, Hertel J, Nielsen HE, Peitersen B, Rechnitzer C, Larsen SO, Norgaard-Pedersen B, Petersen E.** Feasibility of neonatal screening for *toxoplasma* infection in the absence of prenatal treatment. Lancet. 1999;353:1834–1837.
- Lehman T, Blackston CR, Parmley SF, Remington JS, Dubey JP.** Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. J Parasitol. 2000;86:960–71.
- Leport C, Raffi F, Matheron S, Kaltlama C, Régnier B, Saimot AG, Marche C, Verdrenne C, Vildé JL.** Treatment of central nervous system toxoplasmosis with pyrimethamine/sulphadiazine combination in 35 patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Efficacy of long-term continuous therapy. Am J Med. 1988; 84:94–100.
- Levine ND.** Protozoan parasites of domestic animals and of man. Chapter 12, *Sarcocystis, Toxoplasma* and related protozoa. Minneapolis: Burgess Publishing company. 1961. pp. 317–46.
- Levine ND.** Taxonomy of *Toxoplasma*. J Protozool. 1977;24:36–41.

- Levine ND, Corliss JO, Cox FE.** A newly revised classification of the Protozoa. *J Protozool.* 1980;27:37–58.
- Loewer–Sieger DH, Rothova A, Koppe JG, Kylstra A.** Congenital toxoplasmosis, a prospective study based on 1821 pregnant women. In: Saari KM (ed): *Uveitis update.* Elsevier, 1984, p. 203–7.
- Lolis D, Koutsogiannis D, Papadopoulou C, Antoniadis G.** The risk of primary toxoplasmosis during pregnancy in Greece. *Mediterr J Infect Parasit Dis.* 1996;11:89–92.
- Longo MC, Berninger MS, Hartley JL.** Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene.* 1990;93:125–8.
- Luft BJ, Brooks RG, Conley FK, McCabe RE, Remington JS.** Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *JAMA.* 1984;252:913–7.
- Luft BJ, Remington JS.** Toxoplasmic encephalitis. *J Infect Dis.* 1988;157:1–6.
- Luft BJ.** *Toxoplasma gondii.* In: Walzer PD, Genta RM, eds. *Parasitic infections in the compromised host.* New York: Marcel Dekker, 1989. pp. 179–279.
- Luft BJ, Remington JS.** Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis.* 1992;15:211–2.
- Lundén A, Ugglå A.** Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. *Int J Food Microbiol.* 1992;15:357–63.
- Masur H, Jones TC, Lempert JA, Cherubini TD.** Outbreak of toxoplasmosis in a family and documentation of acquired retinochoroiditis. *Am J Med.* 1978;64:396–402.
- McCabe R, Remington JS.** Toxoplasmosis: the time has come. *N Engl J Med.* 1988;318(5):313–5.
- McLeod RE, Skamene CR, Brown PB, Eisenhauer, Mack DG.** Genetic regulation of early survival and cyst number after peroral *T. gondii* infection of AXB/BXA recombinant inbred and congenital mice. *J Immunol.* 1989;143:3031–4.
- McLeod RE, Boyer K, eds.** Management and outcome for the newborn infant with congenital toxoplasmosis. In: Ambroise–Thomas P, Petersen E, *et al.*, eds.

- Congenital toxoplasmosis: scientific background, clinical management and control. Paris: Springer-Verlag, 2000. pp. 189–213.
- Mercier P, Pangalos GE.** Experimental and epidemiological study of toxoplasmosis in Greece *Minerva Med.* 1956;47(24):876–80.
- Mercier P, Tzamouranis N, Crimbithis E.** Toxoplasmosis in Greece. Serological study *Arch Inst Pasteur Hell.* 1961;7:83–93.
- Munday BL.** Serologic evidence of *Toxoplasma* infection in isolated groups of sheep. *Res Vet Sci.* 1972;13:100–2.
- Navia BA, Petitto CK, Gold JWM, Cho ES, Jordon BD, Price RW.** Cerebral toxoplasmosis complicating the acquired immune deficiency syndrome: clinical and neuropathological findings in 27 patients. *Ann Neurol.* 1986;19:224–38.
- Newton LH, Hall SM.** Survey of local policies for prevention of congenital toxoplasmosis. *Common Dis Rep CDR Rev.* 1994;4:R121–4.
- Newton LH, Hall SM.** A survey of health education material for the primary prevention of congenital toxoplasmosis. *Common Dis Rep CDR Rev.* 1995;5:R21–7.
- Nicole C, Manceaux L.** Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *Comp Ren Acad Sci Paris.* 1908;147:763–6.
- Nicole C, Manceaux L.** Sur une protozoaire nouveau du gondii. *C R Hebd Seances Aced Sci.* 1909;148:369–72.
- O’Connell E, Wilkins MF, Te Punga WA.** Toxoplasmosis in sheep II. The ability of a live vaccine to prevent lamb losses after an intravenous challenge with *Toxoplasma gondii*. *NZ Vet J.* 1988;36:1–4.
- Parmely SF, Goebel FD, Remington JS.** Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30(11):3000–2.
- Partanen P, Turunen HJ, Paasivuo RTA, Leinikki PO.** Immunoblot analysis of *Toxoplasma gondii* antigens by human immunoglobulins G, M and A antibodies at different stages of infection. *J Clin Microbiol.* 1984;20:133–5.
- Pelloux H, Thelu J, Derouin F, Ambroise–Thomas P.** Specific antitoxoplasmic immunoglobulin G detected by Western Blot in AIDS patients: relationship to visceral localisation. *AIDS.* 1992;6(8):885–6.

- Pelloux H, Weiss J, Simon J, Muet F, Fricker-Hidalgo H, Goullier-Fleuret A, Ambroise-Thomas P.** A new set of primers for the detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid using polymerase chain reaction. FEMS Microbiol Lett. 1996;138:11–5.
- Pelloux H, Dupouy-Camet J, Derouin F, Aboulker JP, Raffi F, the Bio-Toxo study group.** A multicenter prospective study for the polymerase chain reaction (PCR) detection of *Toxoplasma gondii* DNA in blood samples from 186 AIDS patients with suspected toxoplasmic encephalitis. AIDS. 1997;11:1888–90.
- Pelloux H, Guy E, Angelici MA, Aspöck H, Bessières MH, Blatz R, Del Pezzo M, Girault V, Gratzl R, Holberg-Petersen M, Johnson J, Kruger D, Lappalainen M, Naessens A, Olsson M.** A second collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. FEMS Microbiol Lett. 1998;165:231–7.
- Perrin TL, Brigham GD, Pickens EG.** Toxoplasmosis in wild rats. J Infect Dis. 1943;72:91–6.
- Pfefferkorn ER, Kasper LH.** *Toxoplasma gondii*: genetic crosses reveal phenotypic suppression of hydroxyurea resistance by fluorodeoxyuridine resistance. Exp Parasitol. 1983;55:207–18.
- Pinon JM, Chemla C, Villena I, Foudrinier F, Aubert D, Puygauthier-Toubas D, Leroux B, Dupouy D, Quereux C, Talmud M, Trenque T, Potron G, Pluot M, Remy G, Bonhomme A.** Early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: value of comparative enzyme-linked immunofiltration assay immunological profiles and anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin M (IgM) or IgA immunocapture and implications of postnatal therapeutic strategies. J Clin Microbiol. 1996;34(3):579–583.
- Porter SB, Sande MA.** Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med. 1992; 237:1643–1648.
- Potasman I, Araujo FG, Desmots G, Remington JS.** Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens recognized in human sera obtained before and after acute infection. J Infect Dis. 1986;154:650–7.
- Raffi F, Aboulker JP, Michelet C, Reliquet V, Pelloux H, Huart A, Poizot-Martin I, Morlat P, Dupas B, Mussini JM, Leport C, the BIOTOXO Study group.**

- A prospective study of the criteria for the diagnosis of toxoplasmic encephalitis in 186 AIDS patients. *AIDS*. 1997;11:177–84.
- Raffi F, Franck J, Pelloux H, Derouin F, Reliquet V, Ambroise–Thomas P, Aboulker JP, Leport C, Dumon H.** Specific anti–toxoplasmic IgG immunoblot profiles in patients with AIDS–associated *Toxoplasma* encephalitis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1999;34:51–56.
- Remington JS, Araujo FG, Desmonts G.** Recognition of different *Toxoplasma* antigens by IgG and IgM antibodies in mothers and their congenitally infected newborns. *J Infect Dis*. 1985;152:1020–4.
- Remington JS, Desmonts G.** Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO (ed): *Infectious diseases of the fetus and the newborn infant*. 3rd ed. The W. B Saunders Company, Philadelphia. 1990. pp. 89–195.
- Remington JS, Klein JO.** eds. *Infectious diseases of the fetus and the newborn infant*. Philadelphia: The W. B Saunders Company, 1995.
- Remington JS, McLeod R, Desmonts G.** Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO (ed): *Infectious diseases of the fetus and the newborn infant*. 4th ed. The W. B Saunders Company, Philadelphia, 1995, p. 191–332, 140–267.
- Roberts A, Hedman K, Luyasu V, Zufferey J, Bessieres MH, Blatz RM, Candolfi E, Decoster A, Enders G, Gross U, Guy E, Hayde M, Ho–Yen D, Johnson J, Lecolier B, Naessens A, Pelloux H, Thulliez P, Petersen E.** Multicenter evaluation of strategies for serodiagnosis of primary infection with *Toxoplasma gondii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001;20:467–474.
- Romand S, Wallon M, Franck J, Thulliez P, Peyron F, Dumon H.** Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. *Obstet Gynecol*. 2001;97(2):296–300.
- Saah AJ, Hoover DR.** «Sensitivity » and «specificity» reconsidered: the meaning of these terms in analytic and diagnostic settings. *Ann Intern Med*. 1997;126:91–4.
- Sabin AB.** Biological and immunological identity of *Toxoplasma* of animal and human origin. *Proc Soc Exp Biol*. 1939;41:75–80.
- Sabin AB, Feldman HA.** Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science*. 1948;108:660–3.

- Sacks JJ, Roberto RR, Brooks NF.** Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. *J Am Med Assoc.* 1982;98:1299–32.
- Sangiorgi G.** *Toxoplasma ratti* n. sp. *Giorn R Acad Med Torino.* 1915;78:381–385.
- Sharma SD, Mullenax J, Araujo FG, Erlich HA, Remington JS.** Western Blot analysis of the antigens of *Toxoplasma gondii* recognized by human IgM and IgG antibodies. *J Immunol.* 1983;131:977–983.
- Šibalić D, Djurković–Djaković O, Bobić B.** Onset of ocular toxoplasmosis In congenital toxoplasmosis associated with immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis.* 1990;9:671–4.
- Šibalić D, Bobić B, Djurković–Djaković O.** Specific IgM antibodies as parameters of *Toxoplasma* infection in pregnancy. *Gynecol Obstet Invest.* 1993;36:91–5.
- Sibley LD, Boothroyd JC.** Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature (London).* 1992;359:82–5.
- Smith JL.** Foodborne toxoplasmosis. *J Food Safety.* 1991;12:17–57.
- Smith KL, Wilson M, Hightower AW, Kelly PW, Struewing JP, Juranek DD, McAuley JB.** Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in US military recruits in 1989: comparison with data published in 1956. *Clin Infect Dis.* 1996;23:1182–3.
- Splendore A.** Un nuovo protozoa parassita de' conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d' une malatti che ricorda in molti punti kala-azar dell' uomo. Nota preliminar. *Rev Soc Sci Sao Paulo* 1908;3:109–12.
- Stefanakis A, Bizake A.** Επιζωοτιολογική μελέτη της τοξοπλάσμωσης των αιγοπροβάτων της Κρήτης. In: Επιζωοτιολογική μελέτη Κρήτης. Geotechnical Chamber of Greece, Peripheral Outlier of Crete, 1993, p. 164–222.
- Stefanakis A, Bizake A, Krambovitis E.** Seroprevalence of toxoplasmosis in the sheep and goats of Crete, Greece. *Bull Hell Vet Med Soc.* 1995;46:243–9.
- Sulahian A, Nuges C, Garin YJF, Pelloux H, Longuet P, Slizexicz B, Derouin F.** Serodiagnosis of toxoplasmosis in patients with acquired or reactivating toxoplasmosis and analysis of the specific IgA antibody response by ELISA, agglutination and immunoblotting. *Immunol Infect Dis.* 1993;3:63–9.
- Suzuki Y, Wong, SY, Grumet FC, Fessel J, Montoya JG, Zolopa AR, Portmore A, Schumacher-Perdreau F, Schrappe M, Koppen S.** Evidence for genetic

- regulation of susceptibility to toxoplasmic encephalitis in AIDS patients. *J Infect Dis.* 1996;173:265–8.
- Tenter AM, Johnson AM.** Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidia. *Adv Parasitol.* 1997;39:69–139.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM.** *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000;30:1217–58.
- Thomaidis T, Anastasea-Vlachou K, Mandalenaki-Lambrou C, Theodoridis C, Vrahnou E.** Chronic lymphoglandular enlargement and toxoplasmosis in children. *Arch Dis Child.* 1977;52(5):403–7.
- Thornton CG, Hartley JL, Rashtchian A.** Utilizing Uracil DNA Glycosylase to control carryover contamination in PCR: characterization of residual UDG activity following thermal cycling. *Biotechniques.* 1992;13(2):180–3.
- Thulliez P.** Screening programme for congenital toxoplasmosis in France. *Scand J Infect Dis (Suppl).* 1992;84:43–5.
- Tibayrenc M, Kjellberg F, Arnaud J, Oury B, Brenière SF, Dardé ML, Ayala FJ.** Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:5129–33.
- Tissot Dupont D, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Bost-Bru C, Ambroise-Thomas P, Pelloux H.** Usefulness of Western blot in serological follow-up of newborns suspected of congenital toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003;22:122–5.
- Tjalma W, Vanderheyden T, Naessens A, Vanderheyden J, Foulon W.** Discordant prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis in a dizygotic pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Repr Biol.* 1998;79:107–8.
- Wallace GD.** Serologic and epidemiologic observations on toxoplasmosis on three Pacificatolls. *Am J Epidemiol.* 1969;90:103–11.
- Wallon M, Mallaret MR, Mojon M, Reyron E.** Congenital toxoplasmosis, assessment of prevention policy. *Presse Medicale.* 1994;23:1467–70.
- Wallon M, Liou C, Garner P, Peyron F.** Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. *BMJ.* 1999;318:1511–4.

- WarnekuLASuriya MR, Johnson JD, Holliman RE.** Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. *Int J Food Microbiol.* 1998;45:211–5.
- Wastling JM, Nicoll S, Buxton D.** Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep. *J Med Microbiol.* 1993;8:360–5.
- Weiss LM, Udem SA, Tanowitz H, Wittner M.** Western Blot analysis of the antibody response of patients with AIDS and *Toxoplasma* encephalitis: Antigenic diversity among *Toxoplasma* strains. *J Infect Dis.* 1988;157(1):7–13.
- Werk R.** How does *Toxoplasma gondii* enter host cells? *Rev Infect Dis.* 1985;7(4):449–57.
- Wilder HC.** *Toxoplasma* chorioretinitis in adults. *AMA Arch Ophthalmol.* 1952;48:127–36.
- Wilson CB, Remington JS, Stagno S, Reynolds DW.** Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital *Toxoplasma* infection. *Pediatrics.* 1980;66:767–74
- Wong SY, Remington JS.** Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS.* 1993;7(3):299–316.
- Wong SY, Remington JS.** Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin Infect Dis.* 1994;18:853–62.
- Van Knapen F, Kremers AFT, Franchimont JH, Narucka U.** Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cattle and swine in the Netherlands: towards an integrated control of livestock production. *Vet Q.* 1995;17:87–91.
- Van Thiel PH.** The persistence of *Toxoplasma* strains in albino rats. *Antonie van Leeuwenhoek* 1956;22:243–47.

II Παράρτημα

Παράρτημα 1 Πρωτόκολλα

Στο Παράρτημα 1 περιγράφονται αναλυτικά όλα τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν στην διατριβή αυτή. Οι οδηγίες παρασκευής των διαφόρων διαλυμάτων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονται στο παράρτημα Παράρτημα 2, σελ. 177.

1.1 Επεξεργασία Βιολογικών Δειγμάτων για PCR και Καλλιέργεια

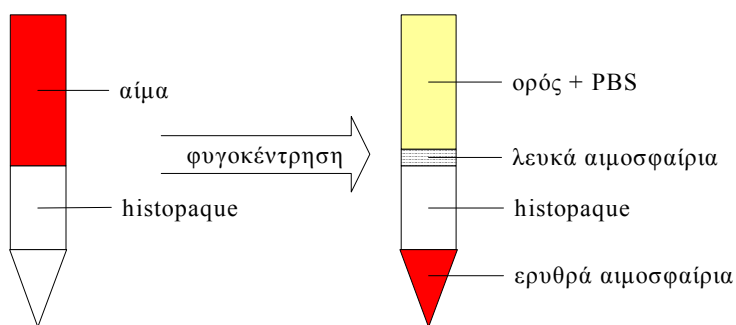
Τα διαφορετικά βιολογικά δείγματα υπόκεινται σε ξεχωριστή επεξεργασία, σε στείρες συνθήκες, μέχρι ενός σημείου. Μετά από κοινή αρχική επεξεργασία σε στείρες συνθήκες, τα δείγματα διαχωρίζονται σε τρία ισόποσα μέρη (ένα για PCR, ένα για ιστοκαλλιέργεια και ένα για καλλιέργεια σε ποντίκια). Τα ειδικά πρωτόκολλα εργασίας περιγράφονται αναλυτικά στις επιμέρους ενότητες.

Πίνακας Π-1. Τεχνικές οι οποίες εφαρμόστηκαν σε κάθε είδος δείγματος.

Δείγμα	Μικροσκοπικές		PCR	Καλλιέργεια σε:		W.B
	Μέθοδοι			ποντίκια	MRC-5	
	Giemsa	IFA				
Αίμα	✓	✓	✓	✓	✓	
Αμνιακό υγρό	✓	✓	✓	✓	✓	
Πλακούντας	✓	✓	✓	✓		
Υλικό βιοψίας	✓	✓	✓	✓		
Κόπρανα γάτας	✓	✓	✓			
Εγκέφαλος ποντικού	✓	✓	✓	✓		
Καρδιακός ιστός	✓	✓	✓	✓		
Οροί μητέρας-παιδιού						✓

1.1.1 Περιφερικό Αίμα

1. Η συλλογή του αίματος (3–6 ml) γίνεται σε στείρο σωληνάριο (με EDTA).
2. Εναποθέτηση Histopaque 1119 σε σωληνάριο falcon των 15 ml.
3. Αραίωση του αίματος 1:1 με PBS και εναποθέτησή του, με προσοχή, στην επιφάνεια της histopaque (αναλογία *histopaque* : αραιωμένο αίμα, 1:2) έτσι ώστε να επικαθίσει και όχι να αναμιχθεί (Εικόνα II-1, σελ. 153).
4. Φυγοκέντρηση σε $600 \times g$ για 30 λεπτά, χωρίς φρένο. Απόρριψη υπερκείμενου ορού με πιπέττα pasteur, ώστε να μην αναταραχθεί η λευκή στοιβάδα.
5. Συλλογή της λευκής στοιβάδας (λευκά αιμοσφαίρια). Προσθήκη 8 ml PBS.
6. Φυγοκέντρηση σε $600 \times g$ για 10 λεπτά. Απόρριψη υπερκείμενου.
7. Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος σε 10 ml PBS.
8. Επανάληψη της πλύσης με PBS, δύο φορές.
9. Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος σε 3 ml θρεπτικού υλικού EMEM 15%.
10. Μοίρασμα σε 3 ισόποσα μέρη για PCR, και καλλιέργειες.



Εικόνα II-1. Απομόνωση λευκών κυττάρων από περιφερικό αίμα.

1.1.2 Αμνιακό Υγρό

1. Φυγοκέντρηση του αμνιακού υγρού (τουλάχιστον 6 ml) σε $600 \times g$ για 10 λεπτά. Απόρριψη υπερκείμενου.
2. Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος σε 10 ml PBS.
3. Φυγοκέντρηση σε $600 \times g$ για 10 λεπτά. Απόρριψη υπερκείμενου.
4. Επανάληψη της πλύσης με PBS, δύο φορές.
5. Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος σε 3 ml θρεπτικού υλικού EMEM 15%.
6. Μοίρασμα σε 3 ισόποσα μέρη για PCR, και καλλιέργειες.

1.1.3 Πλακούντας

1. Μακροσκοπική εξέταση πλακούντα για τον εντοπισμό σημείων με αλλοιώσεις. Αφαίρεση 3–4 τεμαχίων του 1 cm^3 περίπου (χωρίς υμένα) από τα σημεία αυτά.
2. Αποτύπωση σε 2 αντικειμενοφόρους πλάκες για Giemsa και ανοσοφθορισμό. Τεμαχισμός με τη χρήση στείρων νυστεριών.
3. Εναποθέτηση 50 ml NaCl 0,9 % και 5 ml trypsin (1:250) σε δύο στείρα σωληνάρια falcon. Προσθήκη του τεμαχισμένου ιστού στα δοχεία.
4. Επώαση στους 37°C για 30 λεπτά, υπό ανάδευση.
5. Μοίρασμα του υλικού κάθε σωληναρίου falcon σε δύο ισόποσα μέρη. Προσθήκη 25 ml NaCl 0,9 % και 2,5 ml trypsin (1:250) σε κάθε σωληνάριο.
6. Επώαση στους 37°C για 30 λεπτά, υπό ανάδευση.
7. Διήθηση (χωρίς την επιβολή δύναμης) του υλικού μέσα από αποστειρωμένη, διπλή γάζα 2 φορές, και από τετραπλή γάζα, μία φορά.
8. Φυγοκέντρηση σε $600 \times g$ για 10 λεπτά. Απόρριψη υπερκείμενου.
9. Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος σε 45 ml NaCl 0,9 %, και προσθήκη 5 ml OEM.
10. Φυγοκέντρηση σε $600 \times g$ για 10 λεπτά. Απόρριψη υπερκείμενου.
11. Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος σε 10 ml θρεπτικού υλικού EMEM 15%.
12. Φυγοκέντρηση σε $600 \times g$ για 10 λεπτά. Απόρριψη υπερκείμενου.
13. Επανάληψη της πλύσης με θρεπτικό υλικό EMEM 15%, δύο φορές.
14. Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος σε 2 ml θρεπτικού υλικού EMEM 15%.
15. Μοίρασμα σε 2 ισόποσα για PCR και καλλιέργεια σε ποντίκια.

1.1.4 Κόπρανα Γάτας

1. Εναποθέτηση 15 ml ZnSO₄ 33% σε σωληνάριο falcon των 15 ml.
2. Προσθήκη ποσότητας κοπράνων, περίπου 1 cm³. Ανάδευση.
3. Φυγοκέντρηση σε 500 × g για 2 λεπτά.
4. Αφαίρεση της κορυφαίας στοιβάδας με τη χρήση κρικοφόρου στυλεού, και εναποθέτηση σε σωληνάριο το οποίο περιέχει 3 ml PBS (5–10 επαναλήψεις).
5. Φυγοκέντρηση σε 600 × g για 10 λεπτά. Απόρριψη υπερκείμενου.
6. Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος σε PBS.
7. Φυγοκέντρηση σε 600 × g για 10 λεπτά. Απόρριψη υπερκείμενου.
8. Επανάληψη πλύσης με PBS, δύο φορές.
9. Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος σε 1 ml PBS.

1.1.5 Εγκέφαλοι Αρουαίων/Ποντικών

1. Θυσία ζώου με αιθέρα.
2. Αφαίρεση του εγκεφάλου και τοποθέτηση σε 3 ml θρεπτικού υλικού EMEM 15%.
3. Διαλυτοποίηση εγκεφάλου με τη χρήση κρικοφόρου στυλεού.
4. Αφαίρεση μικρής ποσότητας και τοποθέτηση ανάμεσα σε αντικειμενοφόρο πλάκα και καλυπτρίδα, και άσκηση πίεσης ώστε να απλωθεί το υλικό.
5. Παρατήρηση σε μικροσκόπιο για εντοπισμό κύστεων (μεγέθυνση ×40, ×100).
6. Φυγοκέντρηση σε 600 × g για 10 λεπτά. Απόρριψη υπερκείμενου.
7. Επανάληψη της πλύσης με θρεπτικό υλικό EMEM 15%, δύο φορές.
8. Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος σε 2 ml θρεπτικού υλικού EMEM 15%.
9. Μοίρασμα σε 2 ισόποσα μέρη για PCR, και καλλιέργεια σε ποντίκια.

1.2 Ιστοκαλλιέργειες

1.2.1 Γενικές Οδηγίες

1. Όλα τα υλικά των ιστοκαλλιεργειών πρέπει να είναι στείρα. Η αποστείρωση των υλικών γίνεται είτε σε αυτόκαυστο, ή με πέραςμα του υλικού από στείρο φίλτρο με διάμετρο πόρων 0,2 μm και συλλογή του διηθήματος σε στείρο δοχείο.
2. Όλες οι εργασίες γίνονται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής και κοντά σε φλόγα, για να διασφαλίζονται οι στείρες συνθήκες.
3. Πριν τη χρήση τους, τα υλικά τα οποία διατηρούνται σε ψύξη πρέπει να περιέρχονται σε θερμοκρασία δωματίου (Θ.Δ).
4. Πριν την έναρξη της εργασίας, ο θάλαμος και τα χέρια καθαρίζονται με αιθανόλη 70%. Τα δοχεία που εισέρχονται στο θάλαμο ψεκάζονται με αιθανόλη 70%.
5. Μετά τα τέλος της εργασίας, ο θάλαμος καθαρίζεται πρώτα με χλωρίνη 30%, και μετά με αιθανόλη 70%.
6. Πριν ανοιχτεί ο επωαστικός κλίβανος, τα χέρια καθαρίζονται με αιθανόλη 70%.
7. Η χρήση γαντιών επιβάλλεται σε περιπτώσεις κατά τις οποίες πραγματοποιείται επεξεργασία δειγμάτων τα οποία είναι δυνητικά μολυσματικά (βιολογικά δείγματα από ασθενείς, ή ζώα).
8. Όλες οι ιστοκαλλιέργειες απαιτούν 5% CO₂. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται είτε φιάλες καλλιέργειας με καπάκι το οποίο έχει ενσωματωμένο φίλτρο, ή τα καπάκια αφήνονται ελαφρώς χαλαρά.

1.2.2 Καλλιέργεια MRC-5

1. Αφαίρεση θρεπτικού υλικού από φιάλη καλλιέργειας η οποία περιέχει συμπληρωμένη μονοστοιβάδα ινοβλαστών MRC-5 (ταπήτιο).
2. Προσθήκη 20–30 ml PBS, και επώαση υπό ανάδευση σε Θ.Δ. για 10 λεπτά.
3. Αφαίρεση του PBS και επανάληψη της πλύσης, 1 φορά.
4. Προσθήκη 2 ml trypsin (1:250). Ελαφρά ανάδευση για 30 δευτέρα. Αφαίρεση της trypsin, και χτύπημα της φιάλης μέχρι να αποκολληθούν τα κύτταρα.
5. Προσθήκη 10 ml θρεπτικού υλικού EMEM 15% για απενεργοποίηση της trypsin.
6. Διάλυση των συσσωματωμάτων των κυττάρων με διαδοχικές αναρροφήσεις και απορρίψεις του εναιωρήματος των κυττάρων με πιπέττα των 10 ml.

7. Μοίρασμα του εναιωρήματος των κυττάρων σε καινούριες φιάλες, και προσθήκη φρέσκου θρεπτικού υλικού EMEM 15%.
8. Επώαση στους 37°C με 5% CO₂ και υγρασία.

1.2.3 Καλλιέργεια *T. gondii* σε MRC-5

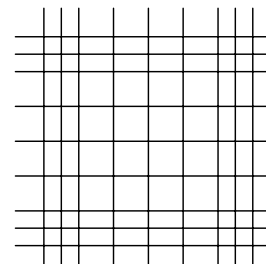
1. Αφαίρεση θρεπτικού υλικού από φιάλη συμπληρωμένης μονοστοιβάδας.
2. Προσθήκη 5×10^6 ταχυζωιδίων. Επώαση σε Θ.Δ. για 30 λεπτά, για να πραγματοποιηθεί η μόλυνση των κυττάρων.
3. Προσθήκη θρεπτικού υλικού EMEM 15%.
4. Επώαση σε κλίβανο στους 37° C με 5% CO₂ και υγρασία. Ανανέωση του θρεπτικού υλικού την επόμενη ημέρα.
5. Συλλογή ταχυζωιδίων από το υπερκείμενο της καλλιέργειας.

1.2.4 Διαχωρισμός MRC-5 από *T. gondii*

1. Απόξυση μολυσμένης μονοστιβάδας από την φιάλη καλλιέργειας, και μεταφορά σε σωληνάριο falcon.
2. Φυγοκέντρηση σε 600 × g για 10 λεπτά. Απόρριψη υπερκείμενου.
3. Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος σε 10 ml NaCl 0,9%.
4. Πέρασμα του εναιωρήματος μέσα από βελόνα 27-gauge 3-5 φορές, ώστε να σπάσουν οι ινοβλάστες, και να απελευθερωθούν τα ενδοκυττάρια ταχυζωίδια.
5. Φυγοκέντρηση σε 100 × g για 2 λεπτά, για την κατακρύμνηση των ινοβλαστών.
6. Συλλογή του υπερκείμενου εναιωρήματος, και διήθησή μέσω φίλτρου διαμέτρου πόρων 3 μm, για τον διαχωρισμό ταχυζωιδίων και υπολλειμάτων ινοβλαστών.
7. Συλλογή του διηθήματος σε καθαρό σωλήνα falcon.
8. Φυγοκέντρηση σε 600 × g για 10 λεπτά, για τη συγκέντρωση των ταχυζωιδίων.

1.2.5 Μέτρηση Αριθμού Κυττάρων

1. Καθαρισμός της κυτταρομετρικής πλάκας και της καλυπτρίδας με αιθανόλη 70%, και προσαρμογή της καλυπτρίδας στην κυτταρομετρική πλάκα.
2. Πλήρωση των θαλάμων της κυτταρομετρικής πλάκας με το κυτταρικό εναιώρημα.
3. Προσαρμογή του πεδίου στο κεντρικό πλέγμα το οποίο περικλείεται από τρεις γραμμές σε όλες του τις πλευρές (Εικόνα II-2, σελ. 158). Μέτρηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων συμπεριλαμβανομένων αυτών στο ανώτατο και στο αριστερό όριο, αλλά όχι εκείνων στο κατώτατο και στο δεξί όριο.
4. Μέτρηση 100–500 κυττάρων. Επανάληψη στον δεύτερο θάλαμο.
5. Υπολογισμός: $C = N \times 10^4$ (Όπου C = αριθμός κυττάρων ml^{-1} , N = μέσος όρος μετρημένων κυττάρων, 10^4 = παράγοντας μετατροπής όγκου).



Εικόνα II-2. Πεδίο κυτταρομετρικής πλάκας.

1.2.6 Shell-Vials

Ο ενοφθαλμισμός βιολογικών δειγμάτων πραγματοποιείται σε σωληνάρια καλλιέργειας, shell-vials (Εικόνα II-3, σελ. 158). Τα σωληνάρια αυτά έχουν στον πυθμένα τους κινητή καλυπτρίδα, πάνω στην οποία καλλιεργείται η κυτταρική σειρά, έτσι ώστε να δημιουργηθεί μονοστιβάδα.

1. Αφαίρεση θρεπτικού υλικού από 2 shell-vials με συμπληρωμένη μονοστιβάδα MRC-5.
2. Μοίρασμα 1 ml επεξεργασμένου βιολογικού υλικού στα 2 shell-vials.
3. Φυγοκέντρωση σε $600 \times g$ για 30 λεπτά, χωρίς φρένο. Αφαίρεση του υπερκείμενου με μεγάλη προσοχή.
4. Προσθήκη 1 ml φρέσκου θρεπτικού υλικού EMEM 15%.
5. Επώαση στους $37^\circ C$ με 5%CO₂ και υγρασία.
6. Ανανέωση του θρεπτικού υλικού κάθε 48 ώρες.
7. Εξέταση του αφαιρούμενου θρεπτικού υλικού με χρώση Giemsa για τον εντοπισμό παρασίτων *T. gondii*.



Εικόνα II-3. Shell-vial.

1.2.7 Καλλιέργεια THP-1

1. Ανάδευση της καλλιέργειας THP-1.
2. Αφαίρεση μικρής ποσότητας, και ανάμιξή της με ίση ποσότητα trypan blue 0,4%.
3. Μέτρηση των ζωντανών κυττάρων σε κυτταρομετρική πλάκα. Για κάθε καινούρια φιάλη καλλιέργειας απαιτούνται 5×10^5 κύτταρα/ml.
5. Φυγοκέντρηση της απαιτούμενης ποσότητας καλλιέργειας σε $300-400 \times g$ για 10 λεπτά. Απόρριψη υπερκείμενου.
6. Επαναδιαλυτοποίηση σε 5 ml RPMI 10%.
7. Προσθήκη 25 ml RPMI 10% (σύνολο 30 ml).
8. Επώαση σε 5% CO₂ στους 37°C.
9. Ανακαλλιέργεια κάθε 3-4 ημέρες.

1.2.8 Μόλυνση THP-1 με *T. gondii*

1. Πλύση των THP-1, 2 φορές με PBS και 1 φορά με RPMI (χωρίς OEM) (1.400 r.p.m., 10 λεπτά).
2. Μέτρηση THP-1, και προσαρμογή της συγκέντρωσης τους σε 4×10^5 /ml, με τη χρήση trypan blue για τον διαχωρισμό νεκρών κυττάρων.
3. Μόλυνση των THP-1 με *T. gondii* RH (σε αναλογία 1:2).
4. Επώαση για 12 ώρες.

1.2.9 Διαχωρισμός Μολυσμένων THP-1 από *T. gondii*

1. Φυγοκέντρηση της μολυσμένης καλλιέργειας THP-1 σε 1.400 r.p.m., για 10 λεπτά. Απόρριψη υπερκείμενου.
2. Επαναδιαλυτοποίηση σε 4 ml RPMI (χωρίς OEM).
3. Τοποθέτηση σε 4 ml Histopaque 1077, φυγοκέντρηση στις 2.500 r.p.m. για 20 λεπτά). Συλλογή της λευκής στιβάδας.
4. Πλύση 2 φορές με PBS, και μία φορά με RPMI (χωρίς OEM) στις 900 r.p.m., για 10 λεπτά).
5. Επαναδιαλυτοποίηση σε 3 ml RPMI 10%.
6. Μέτρηση των μολυσμένων THP-1.

1.3 Καλλιέργεια σε Ποντίκια Balb/c

1.3.1 Καλλιέργεια *T. gondii* σε Ποντίκια

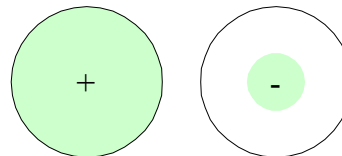
1. Για να επιβεβαιωθεί ότι τα ποντίκια είναι ορολογικά αρνητικά για μόλυνση με *T. gondii*, πραγματοποιείται άμεση συγκόλληση πριν από τη μόλυνση.
2. Ενδοπεριτοναϊκός ενοφθαλμισμός 5×10^6 ταχυζωιδίων στα ποντίκια.
3. Μετά από 3–4 ημέρες από τον ενοφθαλμισμό, πραγματοποίηση πλύσης της ενδοπεριτοναϊκής κοιλότητας του ποντικιού ως εξής:
4. Έγχυση 5 ml στείρου NaCl 0,9% στην περιτοναϊκή κοιλότητα με σύριγγα. Άντληση του υγρού από το ίδιο σημείο, μετά από 1–2 λεπτά.
5. Μέτρηση ταχυζωιδίων με κυτταρομετρική πλάκα
6. Ενοφθαλμισμός καινούριων ποντικιών με 5×10^6 ταχυζωίδια.

1.3.2 Ενοφθαλμισμός Δειγμάτων σε Ποντίκια

1. Ορολογικός έλεγχος ποντικιών για επιβεβαίωση απουσίας μόλυνσης *T. gondii*.
2. Ενοφθαλμισμός 500 μl επεξεργασμένου δείγματος στην ενδοπεριτοναϊκή κοιλότητα κάθε ενός από δύο ποντίκια balb/c.
3. Καθημερινή παρατήρηση των ποντικιών για εντοπισμό συμπτωμάτων αρρώστιας.
4. Εάν τα ποντίκια αρρωστήσουν, γίνεται άμεσα ενδοπεριτοναϊκή πλύση, ενοφθαλμισμός του ενδοπεριτοναϊκού υλικού σε δεύτερο ποντίκι, και χρώση του υλικού για τον εντοπισμό ταχυζωιτών.
5. Εάν τα ποντίκια παραμείνουν υγιή, γίνεται ορολογικός έλεγχος σε μία εβδομάδα από τον ενοφθαλμισμό, για να διαπιστωθεί εάν έχουν μόλυνση από *T. gondii*.
6. Τα ποντίκια τα οποία παραμένουν υγιή (ανεξάρτητα από την εμφάνιση ή όχι αντισωμάτων), θυσιάζονται 1 μήνα από τον ενοφθαλμισμό, για τον εντοπισμό κύστεων στον εγκέφαλό τους.

1.3.3 Αιμοσυγκόλληση σε Αίμα Ποντικών

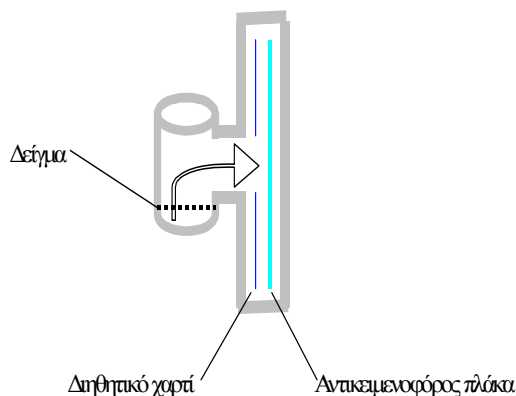
1. Μασάζ της ουράς από κορυφή προς άκρη, 3–4 φορές. Κόψιμο της άκρης, απόκτηση μίας σταγόνας αίματος (5 μl), και τοποθέτηση στο πρώτο βοθρίο κενής πλάκας ELISA.
2. Προσθήκη 100 μl PBS στο πρώτο βοθρίο, και 25 μl στο τρίτο και τέταρτο. Επώαση σε Θ.Δ. για 2 ώρες.
3. Μεταφορά 25 μl από το υπερκείμενο του πρώτου βοθρίου στο δεύτερο βοθρίο. Ομογενοποίηση. Μεταφορά 5 μl από το δεύτερο βοθρίο στο τρίτο βοθρίο. Ομογενοποίηση. Μεταφορά 5 μl από το τρίτο βοθρίο στο τέταρτο βοθρίο. Ομογενοποίηση.
4. Προσθήκη 25 μl αντιγόνου *T. gondii* στα βοθρία 2, 3 και 4. (Προσθήκη 50 μl *Evans Blue* στο αντιγόνο για τη διευκόλυνση του διαβάσματος). Ομογενοποίηση.
5. Επώαση σε υγρό περιβάλλον σε Θ.Δ., για 12 ώρες. Διάβασμα αποτελέσματος (Εικόνα II-4, σελ. 161).



Εικόνα II-4. Αποτέλεσμα αιμοσυγκόλλησης σε αίμα ποντικιού.

1.4 Μικροσκοπικές Μέθοδοι

Για την παρατήρηση βιολογικών υλικών σε μικροσκόπιο για την ανίχνευση *T. gondii*, απαιτείται η χρήση μεγεθύνσεων 40, και 100. Στη μεγέθυνση 40 γίνεται επισκοπική παρατήρηση του υλικού, ενώ είναι δυνατόν να παρατηρηθούν εξωκυτταρικά ταχυζωΐδια και να εντοπιστούν κύστεις σε υλικό από εγκέφαλο. Για την παρατήρηση ενδοκυττάρων ταχυζωΐδιων, απαιτείται μεγέθυνση 100.



Εικόνα II-5. Θάλαμος κυτταροφυγόκεντρου.

1.4.1 Κυτταροφυγόκεντρωση

Με την τεχνική της κυτταροφυγόκεντρωσης επιτυγχάνεται η ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων προς παρατήρηση στην αντικειμενοφόρο πλάκα.

1. Τοποθέτηση 1-2 σταγόνων του υλικού προς παρατήρηση στον ειδικό θάλαμο (Εικόνα II-5, σελ. 162).
2. Φυγόκεντρωση στις 1.200 r.p.m για 8 λεπτά. Εάν το δείγμα είναι από ασθενή, ή τα κύτταρα είναι μολυσμένα, τότε γίνεται φυγόκεντρωση σε 900 r.p.m. για 12 λεπτά.

1.4.2 Χρώση Giemsa

1. Στέγνωμα του δείγματος από κυτταροφυγόκεντρωση σε Θ.Δ.
2. Μονιμοποίηση σε μεθανόλη για 2–3 λεπτά.
3. Τοποθέτηση σε χρωστική May–Gruenwald's για 3 λεπτά.
4. Πλύση με μεθανόλη.
5. Τοποθέτηση σε χρωστική Giemsa για 20 λεπτά (αραίωση 1:20 σε απεστ. H₂O).
6. Πλύση με απεστ. H₂O.
7. Στύπωμα με διηθητικό χαρτί.
8. Παρατήρηση σε μικροσκόπιο (×40, ×100).

1.4.3 Έμμεσος Ανοσοφθορισμός

1. Μονιμοποίηση δειγμάτων από κυτταροφυγοκέντρηση με την προσθήκη 20 μl ακετόνης στο αποτύπωμα του δείγματος, και εξάτμιση σε Θ.Δ., δύο φορές.
2. Πλύση δύο φορές με PBS (5 λεπτά κάθε φορά).
3. Επώαση σε διάλυμα σαπωνίνης 0,01% για 10 λεπτά σε Θ.Δ.
4. Πλύση δύο φορές με PBS (5 λεπτά κάθε φορά).
5. Αραίωση 1:30 ενός θετικού δείγματος (τίτλος 1:36.450) με PBS, και εναποθέτηση 50 μl στο αποτύπωμα του δείγματος προς εξέταση.
6. Επώαση στους 37° C για 1 ώρα, σε υγρό περιβάλλον.
7. Πλύση δύο φορές με PBS (5 λεπτά κάθε φορά).
8. Εναποθέτηση 50 μl της φθορίζουσας στο αποτύπωμα του δείγματος.
9. Επώαση στους 37° C για 1 ώρα, σε περιβάλλον με υγρασία και σκοτάδι.
10. Πλύση δύο φορές με PBS (5 λεπτά κάθε φορά).
11. Στέγνωμα της περιοχής γύρω από το αποτύπωμα του δείγματος, και εναποθέτηση μίας σταγόνας γλυκερόλης και καλυπτρίδας.
12. Παρατήρηση σε μικροσκόπιο (×40, ×100).

1.5 PCR για Ανίχνευση *T. gondii*

1.5.1 Εκχύλιση DNA

1.5.1.a Βρασμός-Ψύξη

1. Πλύση επεξεργασμένου δείγματος με PBS, τρεις φορές (14.000 r.p.m, 5 λεπτά).
2. Επαναδιαλυτοποίηση ισήματος με 150 μl στείρο, απεστ. H₂O για το αίμα, το αμνιακό και το υλικό βιοψίας, με 500 μl H₂O για τα κόπρανα γάτας, τις καρδιές και τον πλακούντα, και με 1 ml H₂O για τους εγκεφάλους.
3. Πραγματοποίηση 3 κύκλων βρασίματος και παγώματος στους -80°C (10 λεπτά για το κάθε στάδιο).
4. Φυγοκέντρηση σε 14.000 r.p.m. για 1 λεπτό, και χρήση του υπερκείμενου.

1.5.1.b Φαινόλη–Χλωροφόρμιο

1. Πλύση επεξεργασμένου δείγματος με PBS, τρεις φορές (14.000 r.p.m., 5 λεπτά).
2. Προσθήκη 100 μl Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (24:4:1) στο ίζημα.
3. Φυγοκέντρηση σε 12.000 r.p.m. για 7 λεπτά. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο σωληνάριο.
4. Προσθήκη 100 μl Chloroform/Isoamyl alcohol (23:4).
5. Φυγοκέντρηση σε 12.000 r.p.m. για 3 λεπτά, και μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό σωληνάριο.
6. Προσθήκη 10 μl από 3M Na Acetate (pH 5.2).
7. Προσθήκη 220 μl αιθανόλης 100%.
8. Τοποθέτηση στους -80°C για 15 λεπτά.
9. Φυγοκέντρηση σε 12.000 r.p.m. για 15 λεπτά. Απόρριψη υπερκείμενου.
10. Πλύση του ιζήματος με 150 μl παγωμένη αιθανόλη 70%.
11. Φυγοκέντρηση σε 12.000 r.p.m. για 15 λεπτά. Απόρριψη υπερκείμενου.
12. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος με 100 μl απεστ. H_2O .

1.5.1.c Giagen DNA Blood Extraction Mini Kit

Το πρωτόκολλο ισχύει για αίμα, αμνιακό υγρό, ούρα, κόπρανα γάτας.

1. Προσθήκη 20 μl Protease και 200 μl διαλύματος AL σε 200 μl επεξεργασμένου δείγματος, και ισχυρή ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα.
2. Επώαση στους 56°C για 10 λεπτά.
3. Προσθήκη 200 μl αιθανόλης 100%, και ισχυρή ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα.
Τοποθέτηση στην κολώνα.
4. Φυγοκέντρηση στις 8.000 r.p.m. για 1 λεπτό.
5. Προσθήκη 500 μl διαλύματος AW1 στην κολώνα.
6. Φυγοκέντρηση στις 8.000 r.p.m. για 1 λεπτό.
7. Προσθήκη 500 μl διαλύματος AW2 στην κολώνα.
8. Φυγοκέντρηση στις 8.000 r.p.m. για 3 λεπτά.
9. Τοποθέτηση της κολώνας σε καθαρό σωληνάριο, προσθήκη 200 μl απεστ. H_2O .
10. Επώαση σε Θ.Δ. για 1 λεπτό.
11. Φυγοκέντρηση σε 8.000 r.p.m. για 1 λεπτό. Συλλογή του διηθήματος.

1.5.1.d Qiagen DNA Extraction Mini Kit

Το πρωτόκολλο ισχύει για πλακούντα, υλικό βιοψίας, εγκεφάλους ποντικών.

1. Προσθήκη 20 μl Proteinase K, και 180 μl διάλυμα ATL σε 25 mg ιστού, και ισχυρή ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα.
2. Επώαση σε 72°C για 12 ώρες.
3. Προσθήκη 200 μl διαλύματος AL.
4. Η συνέχεια του πρωτοκόλλου είναι πανομοιότυπη με εκείνη για την εκχύλιση DNA από αίμα (παράρτημα 1.5.1.c, σελ. 164).

1.5.2 Αντιδράσεις

1. Ετοιμασία κυρίων μειγμάτων (Πίνακας II-2, σελ. 166).
2. Μοίρασμα σε σωληνάρια PCR των 0,2 ml έτσι ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης μετά την προσθήκη του δείγματος στο κύριο μείγμα να είναι 50 μl (για τις αντιδράσεις με τους εναρκτές TBG11, TGB12), και 100 μl (για τις αντιδράσεις με τους εναρκτές B1-1, B1-4).
3. Θερμικός πολλαπλασιασμός των αντιδράσεων (Πίνακας II-3, σελ. 166).
4. Προσθήκη 2-3 μl χρώσης Orange G σε 20 μl του προϊόντος, και φόρτωμα σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.
5. Ηλεκτροφόρηση σε τάση 80-100 V, σε TAE 1X (0,05 μg/ml ethidium bromide).
6. Παρατήρηση του πηκτώματος της αγαρόζης σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

1.5.3 Παρασκευή Θετικού Μάρτυρα *T. gondii*

1. Συλλογή ταχυζωιδίων από φιάλη καλλιέργειας.
2. Μέτρηση αριθμού ταχυζωιδίων με κυτταρομετρική πλάκα.
3. Φυγοκέντρηση σε 600 × g για 10 λεπτά. Απόρριψη υπερκείμενου.
4. Προσθήκη 10 ml PBS, και φυγοκέντρηση σε 600 × g για 10 λεπτά. Επανάληψη της πλύσης 2 φορές.
5. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε H₂O έτσι ώστε να εμπεριέχονται 10³ ταχυζωίδια/μl. Βρασμός για 10 λεπτά.
6. Φυγοκέντρηση σε 14.000 r.p.m. για 5 λεπτά. Συλλογή υπερκείμενου (θετικός μάρτυρας), και φύλαξη στους -20°C.

Πίνακας II-2. Κύρια μείγματα αντιδράσεων PCR για ανίχνευση *T. gondii*.

Μείγμα TGB11, 12	[] ^α	Μείγμα B1-1, 4	[] ^α
PCR buffer	1X	PCR buffer	1x
dUTPs	0,2-0,4 mM ^β	dNTPs	0,4 mM
MgCl ₂	3 mM	MgCl ₂	3 mM
TGB 11 ^γ	0,4 μM	B1-1 ^γ	1 μM
TGB 12 ^γ	0,4 μM	B1-4 ^γ	1 μM
Taq	1,5 U	Taq	2,5 U
UDG	1 U	H ₂ O	έως 100 μl
H ₂ O	έως 50 μl		

^α τελική συγκέντρωση; ^β 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, και 0,4 mM dUTP; ^γ για αλληλουχίες εναρκτών, βλ. σελ. 179.

Πίνακας II-3. Θερμικός πολλαπλασιασμός αντιδράσεων για ανίχνευση *T. gondii*.

Κύκλοι TGB11,12	°C	Χρόνος	Κύκλοι B1-1, 4	°C	Χρόνος
40	37	10'	40	94	5'
	95	10'		93	1'
	94	30''		55	1'30''
	57	30''		72	2'
	72	1'		72	5'
	72	10'		4	“για πάντα”
	72	“για πάντα”			

1.6 Παγίδευση Αρουραίων και Ποντικών

Πλύση των παγίδων με άοσμο απορρυπαντικό (π.χ. SDS). Οι παγίδες δεν πρέπει να έρθουν σε επαφή με το ανθρώπινο δέρμα.

1. Χρήση των κλασικών παγίδων (φάκες) οι οποίες οδηγούν στην παγίδευση ζωντανών ποντικών/αρουραίων.
2. Χρήση σαλαμιού, τυριού, ή βουτύρου φυστικιών ως δόλωμα.
3. Τοποθέτηση των παγίδων σε απόσταση η μία από την άλλη, σε στενά σημεία, ώστε να μην υπάρχει οπτική επαφή μεταξύ τους.
4. Παρακολούθηση για 2-3 ημέρες για ανανέωση του δολώματος, και αφαίρεση παγίδων που έχουν παγιδεύσει ζώο.

1.7 Western Blotting

1.7.1 Παρασκευή Αντιγόνου *T. gondii*

Το πρωτόκολλο είναι συνέχεια του διαχωρισμού MRC-5 από *T. gondii* (παράρτημα 1.2.4, σελ. 157)

1. Απόρριψη υπερκείμενου.
2. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε NaCl 0,9%.
3. Επανάληψη της πλύσης, δύο φορές.
4. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 2 ml NaCl 0,9%, και τοποθέτηση σε πάγο.
5. Πραγματοποίηση 5 γύρων υπερήχων (30 δευτερόλεπτα ο κάθε ένας, με διαλείμματα των 30 δευτερολέπτων), κρατώντας πάντα το δείγμα σε πάγο.
6. Φυγοκέντρηση σε $2.000 \times g$ για 20 λεπτά, στους 4°C . Συλλογή του υπερκείμενου, το οποίο περιέχει την πρωτεΐνη.
7. Φύλαξη στους -80°C .

1.7.1.a Ποσοτικοποίηση Πρωτεΐνης (Bradford)

1. Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων bovine albumin γνωστής συγκέντρωσης.
2. Παρασκευή αραιώσης της προς μέτρηση πρωτεΐνης, σε απεσταγμένο H_2O .
3. Εναποθέτηση 0,1 ml από κάθε αραιώση σε καθαρούς δοκιμαστικούς σωλήνες.
4. Προσθήκη 5 ml αραιωμένου αντιδραστηρίου Bradford (1:5 σε απεστ. H_2O).
5. Επώαση σε Θ.Δ. για 5 λεπτά–1 ώρα. Μέτρηση οπτικής απορρόφησης (O.D_{595}).
6. Σχηματισμός γραφικής παράστασης των τιμών της O.D_{595} προς τις πρότυπες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης. Υπολογισμός της υπό διερεύνηση συγκέντρωσης της πρωτεΐνης.

1.7.2 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών

1. Πλύση των τζαμιών με 10% SDS, μετά με 70% αιθανόλη, και συναρμολόγηση.
2. Προσθήκη πηκτώματος ανάλυσης 12%, επίστρωση με 200 μl ισοβουτανόλης, πολυμερισμός για 30 λεπτά.
3. Ξέπλυμα ισοβουτανόλης με απεστ. H_2O , στέγνωμα με διηθητικό χαρτί.
4. Προσθήκη πηκτώματος συμπύκνωσης 5% και τοποθέτηση της χτένας. Πολυμερισμός για 1 ώρα.
5. Αφαίρεση χτένας και πλύση πηγαδιών με απεστ. H_2O .

6. Τοποθέτηση στη συσκευή, προσθήκη διαλύματος ηλεκτροφόρησης.
7. Προσθήκη διαλύματος φόρτωσης σε αναλογία 1:1 (v/v) στο αντιγόνο. Βρασμός για 3 λεπτά, τοποθέτηση σε πάγο, και εναποθέτηση 10 µg αντιγόνου σε κάθε πηγάδι. Εναποθέτηση μάρτυρα σε ένα πηγάδι.
8. Ηλεκτροφόρηση σε τάση 75–80 V στο πήκτωμα συμπύκνωσης, και σε τάση 130 V όταν το αντιγόνο και ο μάρτυρας περάσουν στο πήκτωμα ανάλυσης.

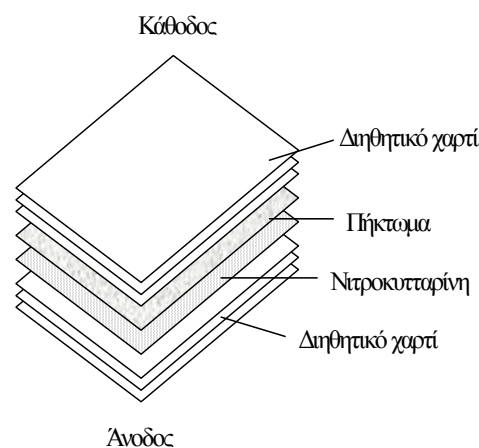
Πίνακας II-4. Επώσεις νιτροκυτταρίνης.

Αντίσωμα	Δείγμα Ορού		Anti-Ig (1 h, Θ.Δ)
	ορός ^a	Επόωση	Αραίωση
IgG	10	1 h, Θ.Δ	1:1000
IgM	25	1,5 h, Θ.Δ	1:1000
IgA	50	12 h, Θ.Δ	1:1000

^a µl ορού στα οποία προστίθεται 1 ml δεσμευτικού διαλύματος.

1.7.3 Ανοσοαποτύπωση

1. Αφαίρεση τζαμιών και χτένας από το πήκτωμα, και εμβάπτιση σε διάλυμα μεταφοράς υπό ανακίνηση.
2. Κοπή 1 φύλλου νιτροκυτταρίνης (0,45 µm), και 6 φύλλων διηθητικού χαρτιού, στις ίδιες διαστάσεις με το πήκτωμα ή ελαφρώς μικρότερα. Εμβάπτιση σε διάλυμα μεταφοράς για 10 λεπτά.
3. Τοποθέτηση στη συσκευή μεταφοράς (semi-dry transfer) (Εικόνα II-6, σελ. 27). Απομάκρυνση του παγιδευμένου αέρα με καθαρή γυάλινη πιπέττα.
4. Ηλεκτροφόρηση σε ένταση 0,8 mA/cm² πηκτώματος ακρυλαμίδης για 1,5 ώρες.
5. Εμβάπτιση της νιτροκυτταρίνης σε 0,1 % διαλύματος Ponceau S. Πλύση της νιτροκυτταρίνης σε πλαστικό διάλυμα για αφαίρεση του Ponceau S.
6. Πλύση νιτροκυτταρίνης 3 φορές (10 λεπτά κάθε φορά) σε δεσμευτικό διάλυμα.
7. Πλύση της νιτροκυτταρίνης (10 λεπτά κάθε φορά) με πλαστικό διάλυμα.



Εικόνα II-6. Τοποθέτηση υλικών στη συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών.

8. Κοπή 6 λωρίδων νιτροκυτταρίνης για κάθε ζευγάρι μητέρας-παιδιού, και επώαση με τους αραιωμένους ορούς (Πίνακας II-4, σελ. 168).
9. Πλύση 3 φορές (10 λεπτά κάθε φορά) με πλυστικό διάλυμα.
10. Επώαση με τα δευτερογενή αντισώματα (Πίνακας II-4, σελ. 168).
11. Πλύση 3 φορές (10 λεπτά κάθε φορά) με δεσμευτικό διάλυμα.
12. Πλύση 3 φορές (10 λεπτά κάθε φορά) με πλυστικό διάλυμα.
13. Πλύση για 10 λεπτά με διάλυμα αλκαλικής φωσφατάσης.
14. Επώαση με διάλυμα υποστρώματος NBT/BCIP για 5–10 λεπτά, σε σκοτάδι.
15. Τερματισμός της αντίδρασης με πλύση με απεστ. H₂O.

Πίνακας II-5. Κύρια μείγματα αντιδράσεων για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου SAG2 με PCR.

Μείγμα SAG2 5'	[] ^α	Μείγμα SAG2 3'	[] ^α
PCR buff	1X	PCR buff	1X
dNTPs	0,2 mM	dNTPs	0,2 mM
MgCl ₂	3 mM	MgCl ₂	3 mM
SAG2.F4 ^β	0,5μM	SAG2.F3 ^β	0,5μM
SAG2.R4 ^β	0,5μM	SAG2.R3 ^β	0,5μM
Taq	1 U	Taq	1 U
H ₂ O		H ₂ O	

^α τελική συγκέντρωση; ^β για αλληλουχίες εναρκτών, βλ. σελ. 179.

Πίνακας II-6. Θερμικός πολλαπλασιασμός των αντιδράσεων για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου SAG2 PCR.

Κύκλοι SAG2 5'	°C	Χρόνος	Κύκλοι SAG2 3'	°C	Χρόνος
40	94	5'	40	94	5'
	94	45''		94	45''
	58	45''		57	45''
	72	1'		72	1'
	72	10'		72	10'

1.8 PCR–RFLP

1.8.1 Nested PCR

1. Ετοιμασία κυρίων μειγμάτων της πρώτης PCR (Πίνακας II-5, σελ. 169).
2. Μοίρασμα σε σωληνάρια PCR των 0,2 ml ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης της PCR μετά την προσθήκη του δείγματος στο κύριο μείγμα να είναι 50 μl.
3. Θερμικός πολλαπλασιασμός των αντιδράσεων (Πίνακας II-6, σελ. 169).
4. Ετοιμασία κυρίων μειγμάτων της nested PCR (Πίνακας II-7, σελ. 171).
5. Μοίρασμα σε σωληνάρια PCR των 0,2 ml έτσι ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης της nested PCR μετά την προσθήκη του προϊόντος της πρώτης PCR στο κύριο μείγμα να είναι 50 μl.
6. Χρήση 1–20 μl από τα προϊόντα της πρώτης PCR για την nested PCR.
7. Θερμικός πολλαπλασιασμός των αντιδράσεων (Πίνακας II-8, σελ. 171).
8. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της nested PCR, σε τάση 80–100 V σε διάλυμα TAE 1X (0,05 μg/ml ethidium bromide).

1.8.2 RFLP

1. Καθαρισμός προϊόντων PCR (παράρτημα 1.9.2, σελ. 173). Ηλεκτροφόρηση 5 μl από τα καθαρισμένα προϊόντα για προσδιορισμό της ποσότητάς τους, σε τάση 80–100 V σε διάλυμα TAE 1X (0,05 μg/ml ethidium bromide).
2. Ετοιμασία μειγμάτων περιορισμού (Πίνακας II-9, σελ. 171) των προϊόντων SAG2 5' με το περιοριστικό ένζυμο Sau3AI, και των προϊόντων SAG2 3' με το περιοριστικό ένζυμο HhaI.
3. Επώαση στους 37°C για 2 ώρες. Απενεργοποίηση των ενζύμων στους 70°C για 10 λεπτά.
4. Ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων του DNA σε αγαρόζη 2% και σε διάλυμα TAE 1X (0,05 μg/ml ethidium bromide), σε τάση 80–100 V.
5. Παρατήρηση του πηκτώματος της αγαρόζης σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

Πίνακας II-7. Κύρια μείγματα αντιδράσεων για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου SAG2 με nested PCR.

Μείγμα SAG2 5'	[] ^α	Μείγμα SAG2 3'	[] ^α
PCR buff	1X	PCR buff	1X
dNTPs	0,2 mM	dNTPs	0,2 mM
MgCl ₂	3 mM	MgCl ₂	3 mM
SAG2.F ^β	0,5μM	SAG2.F2 ^β	0,5μM
SAG2.R2 ^β	0,5μM	SAG2.R ^β	0,5μM
Taq	1 U	Taq	1 U
H ₂ O		H ₂ O	

^α τελική συγκέντρωση; ^β για αλληλουχίες εναρκτών, βλ. σελ. 179.

Πίνακας II-8. Θερμικός πολλαπλασιασμός αντιδράσεων για πολλαπλασιασμό του SAG2 με nested PCR.

Κύκλοι SAG2 5'	°C	Χρόνος	Κύκλοι SAG2 3'	°C	Χρόνος
40	94	5'	40	94	5'
	94	45''		94	45''
	57	45''		57	45''
	72	1'		72	1'
	72	10'		72	10'

Πίνακας II-9. Μείγματα περιορισμού DNA για προϊόντα nested-PCR του γονιδίου SAG2.

Μείγμα SAG2 5'	[] ^α	Μείγμα SAG2 3'	[] ^α
buffer ^β	1X	buffer ^β	1X
Sau3AI	1 U/μl	HhaI	1 U/μl
DNA	X ^γ	DNA	X ^γ
H ₂ O	έως 25 μl	H ₂ O	έως 25 μl

^α τελική συγκέντρωση; ^β ειδικό για κάθε ένζυμο; ^γ συνήθως 200 ng DNA.

Πίνακας II-10. Μείγμα αντίδρασης απολίνωσης (ligation).

Μείγμα	Τελική [] ^α
T4 DNA Ligase buffer	1X
pGEM T-Easy vector	50 ng
T4 DNA Ligase	3 U
Προϊόν PCR	X μl
Απεστ. H ₂ O	X μl

^α τελική συγκέντρωση.

Πίνακας II-11. Κύριο μείγμα αντιδράσεων PCR για έλεγχο μετασηματισμένων αποικιών.

Μείγμα	Τελική [] ^α
PCR Buffer	1X
dNTPs	200 μM
MgCl ₂	2 mM
-47 ^β	0.2 μM
RProti ^β	0.2 μM
Taq	1 U
απεστ. H ₂ O	

^α τελική συγκέντρωση; ^β για αλληλουχίες ενεργών, βλ. σελ. 179.

1.9 Κλωνοποίηση Προϊόντων PCR

1.9.1 Ετοιμασία Ικανών Κυττάρων

1. Ενοφθαλμισμός 5 ml θρεπτικού υλικού L.B με το στέλεχος XL-2 Blue *E. coli*.
2. Επώαση στους 37°C, για 12 ώρες.
3. Ενοφθαλμισμός 100 ml φρέσκου υλικού L.B με 0,5 ml της καλλιέργειας.
4. Επώαση στους 37°C με ανάδευση μέχρι η O.D₅₅₀ να φτάσει 0,2 (± 0,02).
5. Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας σε 2.500 r.p.m για 10 λεπτά, στους 4°C.
6. Επαναδιαλυτοποίηση, προσεκτική, των κυττάρων σε 30 ml διάλυμα TfbI.
7. Επώαση σε πάγο για 30 λεπτά.
8. Φυγοκέντρηση των κυττάρων σε 3.500 r.p.m. για 10 λεπτά στους 4°C.
9. Επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων σε 4 ml διαλύματος TfbII, πολύ προσεκτικά.

10. Διαχωρισμός σε κρύα eppendorf ανά 100 μl. Άμεσο πάγωμα κυττάρων σε υγρό N₂ ή ξηρό πάγο.

1.9.2 Καθαρισμός Προϊόντων PCR

Το πρωτόκολλο ισχύει για το Qiagen Gel Purification kit

1. Κοπή του προϊόντος DNA από την αγαρόζη, και προσθήκη 3 όγκων (του βάρους της κομμένης αγαρόζης) διαλύματος QG. Ανάδευση.
2. Επώαση σε 50°C για 10 λεπτά, ή έως ότου διαλυθεί η αγαρόζη.
3. Προσθήκη 1 όγκου (του βάρους της κομμένης αγαρόζης) ισοπροπανόλης, και προσθήκη του μείγματος στη στήλη.
4. Φυγοκέντρηση σε 10.000 × g για 1 λεπτό. Απόρριψη του διηθήματος.
5. Προσθήκη 0,75 ml διαλύματος PE στη στήλη.
6. Φυγοκέντρηση σε 10.000 × g για 1 λεπτό. Απόρριψη του διηθήματος.
7. Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό.
8. Μεταφορά των στηλών σε καθαρά, κατάλληλα σημασμένα σωληνάρια τύπου eppendorf, και προσθήκη 35 μl απεστ. H₂O στο κέντρο της στήλης.
9. Επώαση σε Θ.Δ. για 1 λεπτό.
10. Φυγοκέντρηση σε 10.000 × g για 30–60 δευτερόλεπτα, και συλλογή διηθήματος.

1.9.3 Απολίνωση Προϊόντων PCR

Το πρωτόκολλο ισχύει για pGEM T–Easy Vector (Promega)

1. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR, και ηλεκτροφόρηση 5 μl σε αγαρόζη, για την επιβεβαίωση της ποιότητας και της ποσότητας του προϊόντος.
2. Ετοιμασία των αντιδράσεων απολίνωσης (Πίνακας Π-10, σελ. 172).
3. Υπολογισμός της κατάλληλης ποσότητας προϊόντος του PCR (insert) που θα συμπεριληφθεί στην αντίδραση απολίνωσης:

$$ng \text{ insert} = \frac{ng \text{ φορέα} \times Kb \text{ insert}}{\text{μέγεθος φορέα}} \times \frac{\text{insert}}{\text{φορέα}}$$

4. Ανάδευση και σύντομη φυγοκέντρηση για συγκέντρωση των υλικών.
5. Επώαση των αντιδράσεων στους 4°C, για 12 ώρες.

1.9.4 Μετασηματισμός Ικανών Κυττάρων

1. Παρασκευή τρυβλίων με υλικό L.B (15 µg/ml τετρακυκλίνη, 75 µg/ml αμπικιλίνη).
2. Ακριβώς πριν τον μετασηματισμό, επίστρωση στο τρυβλίο 20 µl από 100 mM IPTG, και 35 µl από 50 mg/ml X-gal, και επώαση στους 37°C μέχρι τη χρήση.
3. Μεταφορά σωληναρίων ικανών κυττάρων σε πάγο, μέχρι να ξεπαγώσουν.
4. Ανάδευση των κυττάρων χτυπώντας ελαφρά τα σωληνάκια, μεταφορά 100 µl σε κάθε σωληνάριο.
5. Προσθήκη 3–7 µl από κάθε αντίδραση απολίνωσης στα σωληνάκια που περιέχουν τα κύτταρα.
6. Επώαση των σωληναρίων σε πάγο για 30 λεπτά.
7. Θερμικός κλωνισμός των κυττάρων στους 42°C, για 90 δευτερόλεπτα.
8. Άμεση επαναφορά των σωληναρίων στον πάγο για 2 λεπτά.
9. Προσθήκη 300 µl καλλιεργητικού υλικού L.B σε Θ.Δ.
10. Επώαση στους 37°C για 1,5 ώρες, με ελαφρά ανάδευση.
11. Επίστρωση κάθε μετασηματισμού σε τρυβλίο με υλικό L.B (εμπλουτισμένο με αμπικιλίνη, τετρακυκλίνη, IPTG, και X-gal).
12. Επώαση στους 37°C για 16–24 ώρες.

1.9.5 Έλεγχος των Μετασηματισμένων Αποικιών με PCR

1. Ετοιμασία κυρίου μείγματος PCR (Πίνακας II-11, σελ. 172). Μοίρασμα 50 µl σε σωληνάκια 0,2 ml.
2. Επιλογή μεμονωμένων αποικιών (λευκών) με στείρους κρικοφόρους στυλεούς. Άγγιγμα του κρικοφόρου στυλεού σε καθαρό τρυβλίο L.B για αποθήκευση κλώνου, και εμβάπτιση του κρικοφόρου στυλεού σε σωληνάριο που περιέχει το κύριο μείγμα της PCR.
5. Θερμικός πολλαπλασιασμός των αντιδράσεων (Πίνακας II-12, σελ. 175).
6. Ηλεκτροφόρηση 5 µl σε πηκτή αгарόζης.

Πίνακας II-12. Θερμικός πολλαπλασιασμός για έλεγχο μετασχηματισμένων αποικιών.

Κύκλοι	°C	Χρόνος
35	94	5'
	94	20''
	60	30''
	72	30''
	72	10'
4	για πάντα	

Πίνακας II-13. Μείγμα αντιδράσεων αλληλούχισης.

Μείγμα	Όγκος
Υπόστρωμα DNA	X
M13-700 ^a	1
T7-800 ^a	1
H ₂ O	X
ΣΥΝΟΛΟ	13 μl

^a για αλληλουχίες εναρκτών, βλ. σελ. 179.

Πίνακας II-14. Θερμικός πολλαπλασιασμός αντιδράσεων αλληλούχισης.

Κύκλοι	°C	Χρόνος
20	95	30''
	55	30''
	72	1'

Πίνακας II-15. Εναρκτές για άμεση αλληλούχιση δειγμάτων με nested PCR.

Εναρκτές SAG2 5'	Εναρκτές SAG2 3'
SAG2.F-T7	SAG2.F2-T7
SAG2.R2-M13	SAG2.R-M13

1.10 Αλληλούχιση

Η αλληλούχιση μπορεί να πραγματοποιηθεί (α) με κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR, και (β) απ'ευθείας στα προϊόντα της PCR.

1.10.1 Καθαρισμός Προϊόντων PCR

παράρτημα 1.9.2, σελ. 173

1.10.2 Αντιδράσεις Αλληλούχισης

1. Στην περίπτωση αλληλούχισης μετά από κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR, χρησιμοποιούνται τα κλωνοποιημένα προϊόντα (παράρτημα 1.9, σελ. 172).
2. Στην περίπτωση άμεσης αλληλούχισης σε προϊόντα PCR, ακολουθείται το πρωτόκολλο της PCR-RFLP (παράρτημα 1.8, σελ. 170) μέχρι το βήμα 7 με μόνη διαφορά ότι οι εναρκτές για τη nested PCR είναι επιμηκυσμένοι, με την αλληλουχία των εναρκτών για αλληλούχιση (Πίνακας II-15, σελ. 175).
3. Πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις (Πίνακας II-13, σελ. 175).
4. Στο τέλος των αντιδράσεων (Πίνακας II-14, σελ. 175) προστίθενται 7 μl χρωστικής formamide.

1.10.3 Παρασκευή Γέλης Ακρυλαμίδης

1. Πλύσιμο των τζαμιών με H₂O της βρύσης και μερικές σταγόνες SDS 10%. Ξέπλυμα με H₂O της βρύσης, και μετά με απεσταγμένο H₂O
2. Στέγνωμα των τζαμιών στον αέρα.
3. Άπλωμα στα τζάμια αρκετής ποσότητας αιθανόλης 100%, και ελαφρύ σκούπισμα. Στέγνωμα των τζαμιών στον αέρα. Προσαρμογή των τζαμιών και των spacers.
4. Προετοιμασία μείγματος ακρυλαμίδης. Τοποθέτηση στα τζάμια με φίλτρο.
5. Πολυμερισμός για 2 ώρες. Τοποθέτηση χτένας.
6. Φόρτωμα περίπου 1,2 μl κάθε δείγματος στη γέλη ακρυλαμίδης.

Παράρτημα 2 Απαραίτητα Διαλύματα

2.1 Western Blotting

Ακρυλαμίδη 30 %	Συγκέντρωση / Ποσότητες	Διάλυμα Πλύσης	Συγκέντρωση / Ποσότητες
Ακρυλαμίδη	29,2 %	Tris pH 8,0	50 mM
Bis-ακρυλαμίδη	0,8 %	NaCl	150 mM
σε απεστ. H ₂ O		Triton	0,01 %
Διάλυμα Δέσμευσης		σε απεστ. H ₂ O	
Άπαχο γάλα	5 %	Διάλυμα Φόρτωσης	
Sodium azide	0,02 %	Tris	500 mM
Anti-foam A	0,1 %	SDS	20 %
σε πλυστικό διάλυμα		B-μερκαπτοαιθανόλη	20 %
Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης		Γλυκερόλη	40 %
Tris	25 mM	Bromophenol Blue	0,1 %
Γλυκίνη	0,192 M	σε απεστ. H ₂ O	
SDS	0,1 %	Διάλυμα Μεταφοράς	
σε απεστ. H ₂ O		Tris	48 mM
Ακρυλαμίδη ανάλυσης 12%		Γλυκίνη	39 mM
απεστ H ₂ O	16,5 ml	SDS	0,037 %
30% Ακρυλαμίδη	20,0 ml	Μεθανόλη	20 %
1,5 M Tris pH 8,8	12,5 ml	σε απεστ. H ₂ O	
SDS 10%	500 μl	Ponceau S	
AP 10%	500 μl	Ponseau S	2 %
TEMED	20 μl	Trichloroacetic acid	30 %
Ακρυλαμίδη συμπύκνωσης 5 %		Sulfosalicylic acid	30 %
απεστ H ₂ O	6,8 ml	σε απεστ. H ₂ O	
30% Ακρυλαμίδη	1,7 ml	Tris 1,5 M (pH 8,8)	
1 M Tris pH 6,8	1,25 ml	Tris	1,5 M
SDS 10%	100 μl	pH 8,8	με HCl
AP 10%	100 μl	σε απεστ. H ₂ O	
TEMED	10 μl	Tris 1 M (pH 6,8)	
Διάλυμα Αλκαλικής Φωσφατάσης		NaCl	100 mM
Tris	1,5 M	MgCl ₂	5 mM
pH 6,8	με HCl	Tris pH 9,5	100 mM
σε απεστ. H ₂ O		σε απεστ. H ₂ O	

2.2 Έμμεσος Ανοσοφθορισμός

Σαπωνίνη 0,01 %	Συγκέντρωση	Φθορίζουσα	Ποσότητες
Σαπωνίνη σε PBS	0,01%	PBS anti-IgG (FITC) Evans blue	970 μl 10 μl 20 μl

2.3 Ιστοκαλλιέργειες

EMEM (OEM 15%)	Συγκέντρωση	RPMI (OEM 10%)v	Συγκέντρωση
Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη	100 U / 100 mg	Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη	100 U / 100 mg
L-γλουταμίνη	2mM	L-γλουταμίνη	2mM
Ορός εμβρύου μόσχου σε EMEM	15 %	Ορός εμβρύου μόσχου σε RPMI	15 %

2.4 PCR

ZnSO ₄ 33 %, 100 ml	Συγκέντρωση	Orange G, PCR Loading Dye	Συγκέντρωση
ZnSO ₄ σε απεστ H ₂ O	33 %	Orange S σε γλυκερόλη 30%	0,6%

2.5 Κλωνοποίηση

Luria–Bertani (L.B)	Συγκέντρωση	TfbII	Συγκέντρωση
Τρυπτόνη	0,5%	MOPS	10 mM
Εκχύλισμα μυκήτων	1%	CaCl ₂	75 mM
NaCl	0,5%	KCl	10 mM
Άγαρ (για τρυβλία) σε απεστ H ₂ O	1,5%	Γλυκερόλη σε απεστ H ₂ O	15 %
TfbI			
K–acetate	30 mM		
MnCl ₂	50 mM		
KCl	100 mM		
CaCl ₂	10 mM		
Γλυκερόλη σε απεστ H ₂ O	15%		

2.6 Αλληλούχιση

Γέλη Ακρυλαμίδης	Ποσότητες	TBE 10x Long Run Buffer	Συγκέντρωση
Rapid gel XL Sol 40%	5,75 ml	Tris	1340 mM
Ουρία	21 g	Βορικό Οξύ	450 mM
10X TBE Long Run	5 ml	EDTA	25 mM
Απεστ. H ₂ O	30,5 ml	σε απεστ H ₂ O	
TEMED	50 μl		
AP 10%	350 μl		

Παράρτημα 3 Αλληλουχίες εναρκτών

Εναρκτής	Αλληλουχία
TGB11	F 5'-AGC GAA GAC TGC GGA TGA CT-3'
TGB12	R 5'-GAA TGG AGA CGA ACA CGC TA-3'
B1-1	F 5'-GGA ACT GCA TCC GTT CAT GAG-3'
B1-4	R 5'-TCT TAA AAG CGT TCG TGG TC-3'
SAG2.F4	F 5'-GCT ACC TCG AAC AGG AAC AC-3'
SAG2.R4	R 5'-GCA TCA ACA GTC TTC GTT GC-3'
SAG2.F	F 5'-GAA ATG TTT CAG GTT GCT GC-3'
SAG2.R2	R 5'-GCA AGA GCG AAC TTG AAC AC-3'
SAG2.F3	F 5'-TCT GTT CTC CGA AGT GAC TCC-3'
SAG2.R3	R 5'-TCA AAC CGT GCA TTA TCG C-3'
SAG2.F2	F 5'-ATT CTC ATG CCT CCG CTT C-3'
SAG2.R	R 5'-AAC GTT TCA CGA AGG CAC AC-3'
SAG2.F-T7	F 5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGA AAT GTT TCA GGT TGC TGC-3'
SAG2.R2-M13	R 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACG CAA GAG CGA ACT TGA ACA C-3'
SAG2.F2-T7	F 5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAT TCT CAT GCC TCC GCT TC-3'
SAG2.R-M13	R 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACA ACG TTT CAC GAA GGC ACA C-3'
-47	F 5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3'
RPopti	R 5'-GGA ATT GTG AGC GGA TAA CA-3'
T7-800	F 5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG G-3'
M13-700	R 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'

F: forward; R: reverse

Παράρτημα 4 Προέλευση Υλικών

Προϊόν	Οίκος	Προϊόν	Οίκος
Ammonium persulfate	Pharmacia	X-gal	Life Technologies
Anti-foam A	Sigma	Άγαρ	DIFCO
Bis-acrylamide	Gibco BRL	Αγαρόζη	Life Technologies
Blood mini kit, Gel purification kit, Nucleotide removal kit, DNA mini kit	Qiagen	Ακετόνη	Merck
Bradford	Biorad	Ακρυλαμίδη	Biorad
dNTPs	Invitrogen	Αμπικιλίνη	Life Technologies
dUTP	Amersham	Αντισώματα	Panbio INDX
Eagles's MEM	Biochem	Βορικό οξύ	Sigma
EDTA	Biorad	Βουτανόλη	Merck
Giemsa	Merck	Βρωμιούχο αιθίδιο	Sigma
HhaI	Amersham	Γάλα σε σκόνη	Carnation
Histopaque 1119	Sigma	Γλυκερόλη	Merck
IPTG	Invitrogen	Γλυκίνη	Biorad
L-γλουταμίνη	Life Technologies	Εκχύλισμα μυκήτων	DIFCO
May-gruenwald's	Merck	Εναρκτηές	MWG
MseI	NEB	Θειικός ψευδάργυρος	Merck
NBT/BCIP	Life Technologies	Θρυψίνη 1:250	Life Technologies
NciI	NEB	Ισοβουτανόλη	Merck
PBS	ICN/FLOW	Μάρτυρας DNA 100 bp	Promega
pGEM T-easy vector	Promega	Μάρτυρας πρωτεϊνών	Amersham
Ponceau S	Merck	Μεθανόλη	Merck
Rapid gel XL Sol 40%	Biorad	Μπλε βρωμοφαινόλης	Merck
SDS	Biorad	Μπλε του Evans	Merck
Shell-vials	Polylabo	Ορός εμβρύου μόσχου	Life Technologies
Sodium azide	Sigma	Ουρία	Life Technologies
TEMED	Biorad	Πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη	Life Technologies
ThermoSequenase	Amersham	Πολυμεράση Taq	Qiagen
Trichloroacetic acid	Merck	Σαπωνίνη	Sigma
Tris	Biorad	Σουλφοσαλυκυλικό οξύ	Merck
Triton	Merck	Τετρακυκλίνη	Life Technologies
Trypan blue	Merck	Τρυπτόνη	DIFCO
Uracil DNA glycosylase	Life Technologies	Υδροχλωρικό οξύ	Merck
		Χλωριούχο νάτριο	Merck
		Χλωροφόρμιο	Merck

Παράρτημα 5 Κλειδί για την Ανάγνωση Αλληλουχιών

R	A ή G
K	G ή T
Y	C ή T
S	C ή G
M	A ή C
W	A ή T
H	A ή C ή T
D	A ή G ή T
V	A ή C ή G
B	C ή G ή T
N	A ή C ή G ή T

Παράρτημα 6 Υποδιαιρέσεις Μονάδων

K (kilo)	10^3
m (milli)	10^{-3}
μ (micro)	10^{-6}
n (nano)	10^{-9}
p (pico)	10^{-12}
f (fenti)	10^{-15}

Παράρτημα 7 Ευθυγράμμιση Αλληλουχιών

Input data matrix:

Taxon/Node	1111111111222222223333333333444444445555555566666666777777777
ATH1	TGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATCCTGTGTGTTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACCTGAGTTGTGATTGT
ATH2	TGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATCCTGTGTGTTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACCTGAGTTGTGATTGT
ATH3	TGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATCCTGTGTGTTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACCTGAGTTGTGATTGT
CRE1	TGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATCCTGTGTGTTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACCTGAGTTGTGATTGT
CRE2	TGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATCCTGTGTGTTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACCTGAGTTGTGATTGT
CRE3	TGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATCCTGTGTGTTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACCTGAGTTGTGATTGT
BOU	TGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATCCTGTGTGTTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACCTGAGTTGTGATTGT
LGE94-2	TGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATCCTGTGTGTTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACCTGAGTTGTGATTGT
NED	TGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATCCTGTGTGTTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACCTGAGTTGTGATTGT
PSP19	TGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATCCTGTGTGTTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACCTGAGTTGTGATTGT
RH	TGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATCCTGTGTGTTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACCTGAGTTGTGATTGT
C56	TGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATCCTGTGTGTTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACCTGAGTTGTGATTGT
BEVERLEY	TGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATCCTGTGTGTTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACCTGAGTTGTGATTGT
COUGAR	TGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATCCTGTGTGTTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACCTGAGTTGTGATTGT
CASTELLS	TGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATCCTGTGTGTTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACCTGAGTTGTGATTGT
RUB	TGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATCCTGTGTGTTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACCTGAGTTGTGATTGT
MAS	TGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATCCTGTGTGTTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACCTGAGTTGTGATTGT
LGE96-1	TGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATCCTGTGTGTTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACCTGAGTTGTGATTGT
S48	TGCGAAGAAAACGAGCGCTGCTTGCATCCTGTGTGTTTTCACGGGTTGCAGTTCTAGGAACCTGAGTTGTGATTGT

Input data matrix (continued):

Taxon/Node	788888888899999999000000000011111111112222222233333333444444445555555
ATH1	GCACAAATGCGGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCACAACTCTTGTCTTGTTCGGAACCTATGAGTTCTCAAAGACCACGA
ATH2	GCACAAATGCGGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCACAACTCTTGTCTTGTTCGGAACCTATGAGTTCTCAAAGACCACGA
ATH3	GCACAAATGCGGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCACAACTCTTGTCTTGTTCGGAACCTATGAGTTCTCAAAGACCACGA
CRE1	GCACAAATGCGGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCACAACTCTTGTCTTGTTCGGAACCTATGAGTTCTCAAAGACCACGA
CRE2	GCACAAATGCGGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCACAACTCTTGTCTTGTTCGGAACCTATGAGTTCTCAAAGACCACGA
CRE3	GCACAAATGCGGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCACAACTCTTGTCTTGTTCGGAACCTATGAGTTCTCAAAGACCACGA
BOU	GCACAAATGCGGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCACAACTCTTGTCTTGTTCGGAACCTATGAGTTCTCAAAGACCACGA
LGE94-2	GCACAAATGCGGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCACAACTCTTGTCTTGTTCGGAACCTATGAGTTCTCAAAGACCACGA
NED	GCACAAATGCGGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCACAACTCTTGTCTTGTTCGGAACCTATGAGTTCTCAAAGACCACGA
PSP19	GCACAAATGCGGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCACAACTCTTGTCTTGTTCGGAACCTATGAGTTCTCAAAGACCACGA
RH	GCACAAATGCGGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCACAACTCTTGTCTTGTTCGGAACCTATGAGTTCTCAAAGACCACGA
C56	GCACAAATGCGGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCACAACTCTTGTCTTGTTCGGAACCTATGAGTTCTCAAAGACCACGA
BEVERLEY	GCACAAATGCGGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCACAACTCTTGTCTTGTTCGGAACCTATGAGTTCTCAAAGACCACGA
COUGAR	GCACAAATGCGGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCACAACTCTTGTCTTGTTCGGAACCTATGAGTTCTCAAAGACCACGA
CASTELLS	GCACAAATGCGGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCACAACTCTTGTCTTGTTCGGAACCTATGAGTTCTCAAAGACCACGA
RUB	GCACAAATGCGGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCACAACTCTTGTCTTGTTCGGAACCTATGAGTTCTCAAAGACCACGA
MAS	GCACAAATGCGGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCACAACTCTTGTCTTGTTCGGAACCTATGAGTTCTCAAAGACCACGA
LGE96-1	GCACAAATGCGGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCACAACTCTTGTCTTGTTCGGAACCTATGAGTTCTCAAAGACCACGA
S48	GCACAAATGCGGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCACAACTCTTGTCTTGTTCGGAACCTATGAGTTCTCAAAGACCACGA

Input data matrix (continued):

Taxon/Node	111111111111111111111111111111111111222222222222222222222222222222222
ATH1	GCCTAGCGTCGCTAGCGCTCANNNNNGAAATGTCTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATT?GCGATTGTTCT
ATH2	GCCTAGCGTCGCTAGCGCTCANNNNNGAAATGTCTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATT?GCGATTGTTCT
ATH3	GCCTAGCGTCGCTAGCGCTCANNNNNGAAATGTCTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATT?GCGATTGTTCT
CRE1	GCCTAGCGTCGCTAGCGCTCANNNNNGAAATGTCTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATT?GCGATTGTTCT
CRE2	GCCTAGCGTCGCTAGCGCTCANNNNNGAAATGTCTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATT?GCGATTGTTCT
CRE3	GCCTAGCGTCGCTAGCGCTCANNNNNGAAATGTCTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATT?GCGATTGTTCT
BOU	GCCTAGCGTCGCTAGCGCTCANNNNNGAAATGTCTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATT?GCGATTGTTCT
LGE94-2	GCCTAGCGTCGCTAGCGCTCANNNNNGAAATGTCTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATT?GCGATTGTTCT
NED	GCCTAGCGTCGCTAGCGCTCANNNNNGAAATGTCTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATT?GCGATTGTTCT
PSP19	GCCTAGCGTCGCTAGCGCTCANNNNNGAAATGTCTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATT?GCGATTGTTCT
RH	GCCTAGCGTCGCTAGCGCTCANNNNNGAAATGTCTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATT?GCGATTGTTCT
C56	GCCTAGCGTCGCTAGCGCTCANNNNNGAAATGTCTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATT?GCGATTGTTCT
BEVERLEY	GCCTAGCGTCGCTAGCGCTCANNNNNGAAATGTCTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATT?GCGATTGTTCT
COUGAR	GCCTAGCGTCGCTAGCGCTCANNNNNGAAATGTCTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATT?GCGATTGTTCT
CASTELLS	GCCTAGCGTCGCTAGCGCTCANNNNNGAAATGTCTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATT?GCGATTGTTCT
RUB	GCCTAGCGTCGCTAGCGCTCANNNNNGAAATGTCTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATT?GCGATTGTTCT
MAS	GCCTAGCGTCGCTAGCGCTCANNNNNGAAATGTCTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATT?GCGATTGTTCT
LGE96-1	GCCTAGCGTCGCTAGCGCTCANNNNNGAAATGTCTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATT?GCGATTGTTCT
S48	GCCTAGCGTCGCTAGCGCTCANNNNNGAAATGTCTGCAAAGAAAACGTTGTTGAGGGGTGGGATT?GCGATTGTTCT

Παράρτημα 8 Συντομογραφίες & Σύμβολα

Στμγρ/Σύμβολο	Επεξήγηση
%	Ποσοστό επί τοις εκατό
× g	Επιτάχυνση της βαρύτητας (gravity)
A	Αδενίνη
AIDS	Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (acquired immunodeficiency syndrome)
bp	Ζεύγος βάσεων (base pair)
C	Κυτοσίνη
D	Daltons
dA, C, G, T	Deoxy-adenine, cytosine, guanine, thymidine
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊνικό Οξύ (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Δεοξυριβονουκλεοσίδιο (2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate)
dUTP	2'-deoxyuridine 5'-triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
ELISA	Ενζυμική ανοσοπροσροφητική ανάλυση (enzyme-linked immunosorbent assay)
EMEM	Eagle's minimum essential medium
FBS	Ορός εμβρύου μόσχου
G	Γουανίνη
g	Γραμμάρια
H ₂ O	Νερό
HIV	Ιός της ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (human immunodeficiency virus)
IgG, M, A	Ανοσοσφαιρίνη A, M, G, E (immunoglobulin A, M, G, E)
IPTG	Isopropylthio-β-galactoside
ISAgA	Ανοσοπαγίδευση (immunosorbent agglutination assay)
l	Λίτρα
L.B	Luria-Bertani
M	Μοριακή συγκέντρωση
MB	Μοριακό βάρος
NBT/BCIP	Nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
O.D.	Οπτική πυκνότητα (optical density)
°C	Βαθμοί κελσίου (degrees celsius)
PAGE	Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου (polyacrylamide gel electrophoresis)

Στμγρ/Σύμβολο	Επεξήγηση
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction)
r.p.m.	Περιστροφές ανά λεπτό (revolutions per minute)
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SDS	Δωδεκυλοθειικό νάτριο (sodium dodecyl sulphate)
T	Θυμιδίνη
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Taq	Taq DNA πολυμεράση
TE	Τοξοπλασμική εγκεφαλίτιδα
TEMED	N, N, N'N'-tetramethylethylenediamine
U	Μονάδες (units)
UDG	Uracil DNA glycosylase
UV	Υπεριώδης ακτινοβολία (ultra violet)
V	Volts
WB	Western blotting
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside
A	Ampere
Θ.Δ	Θερμοκρασία δωματίου
ΚΝΣ	Κεντρικό νευρικό σύστημα
Μαρ	Μάρτυρας
XA	Χοριοαμφιβληστροειδίτιδα

Η συγγραφή της παρούσας διατριβής
ξεκίνησε το Γενάρη του 2003
και ολοκληρώθηκε τον Μάιο του 2004.
Συντάχθηκε σε Word 2000
και εκδόθηκε σε 30 αντίτυπα
από την ίδια τη συγγραφέα.