



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
ДЕПАРТМАН ЗА ВЕТЕРИНАРСКУ МЕДИЦИНУ

**ИНФЕКЦИЈА ПАРАЗИТОМ
Toxoplasma gondii КОД СВИЊА:
СЕРОЛОШКИ, ПАРАЗИТОЛОШКИ
И МОЛЕКУЛАРНИ НАЛАЗИ КАО
ПАРАМЕТРИ БЕЗБЕДНОСТИ МЕСА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор:
Проф. др Весна Лалошевић

Кандидат:
Љиљана Куруца, др вет.

Нови Сад, 2017. године

**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број: РБР	
Идентификациони број: ИБР	
Тип документације: ТД	Монографска документација
Тип записа: ТЗ	Текстуални штампани материјал
Врста рада (дипл., маг., докт.): ВР	Докторска дисертација
Име и презиме аутора: АУ	Љиљана Куруца
Ментор (титула, име, презиме, звање): МН	Др Весна Лалошевић, редовни професор
Наслов рада: НР	Инфекција паразитом <i>Toxoplasma gondii</i> код свиња: серолошки, паразитолошки и молекуларни налази као параметри безбедности меса
Језик публикације: ЈП	Српски
Језик извода: ЈИ	Српски / Енглески
Земља публикавања: ЗП	Србија
Уже географско подручје: УГП	Војводина
Година: ГО	2017.
Издавач: ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса: МА	Нови Сад, Трг Доситеја Обрадовића 8

Физички опис рада: ФО	(9 поглавља / 125 страна / 26 слика / 16 табела / 1 графикон / 347 референци / 4 прилога)
Научна област: НО	Ветеринарска медицина
Научна дисциплина: НО	Болести животиња и хигијена анималних производа
Предметна одредница, кључне речи: ПО	<i>Toxoplasma gondii</i> , свиње, серопреваленца, изолација, безбедност меса, генотипизација
УДК	636.09:599.731.1:576.89(043.3)
Чува се: ЧУ	Библиотека Пољопривредног факултета, Нови Сад
Важна напомена: ВН	Нема
<p>Извод: ИЗ</p> <p>Захваљујући глобалној дистрибуцији, широком спектру прелазних домаћина и способности да паразитира унутар готово сваке ћелије са једром, <i>Toxoplasma gondii</i> представља једног од најуспешнијих паразита људи и животиња. Код имунокомпетентних особа, инфекција токсоплазмозом у већини случајева пролази асимптоматски, док код имунокомпромитованих особа може имати озбиљне, чак смртоносне, последице, а код трудница довести до абортуса или рођења конгенитално инфициране деце. Важан извор инфекције за људе представља термички недовољно обрађено месо инфицираних производних животиња, нарочито свиња, које представљају једну од врста из чијих ткива је паразит најчешће изолован.</p> <p>У Србији је од шездесетих година прошлог века спроведено више истраживања у којима је потврђено присуство антитела против <i>T. gondii</i> код домаћих свиња. Инфективни паразити су изоловани из крви серопозитивних свиња, као и из мозга и срца свиња непознатог серолошког статуса. Ова дисертација представља прву студију која се бавила испитивањем присуства везе између налаза IgG антитела против <i>T. gondii</i> у серуму и вијабилних циста у јестивим ткивима свиња.</p> <p>У ту сврху, на присуство специфичних антитела је (методом модификоване аглутинације, МАТ) испитано 200 свиња из три различита система узгоја (комерцијалне фарме, домаћинства и слободно). Ткива серопозитивних, и неких серонегативних, свиња су затим испитана на присуство циста, биолошким огледом (БО) и/или молекуларним методама (qPCR). Антитела против <i>T. gondii</i> су пронађена код укупно 21,5% свиња, што се може сматрати средње високом вредношћу у поређењу са другим европским земљама. Антитела су у већем проценту пронађена код слободно држаних свиња (66,7%), него код фармских свиња (17,8%) и свиња из домаћинства (16,3%), међу којима није било разлике у серопреваленци. На присуство циста је, барем једном од две методе (БО, qPCR), прегледано укупно 59 свиња и паразит је пронађен у 19 случајева. Од тога, вијабилна <i>T. gondii</i> је доказана у 12 случајева, што чини 6% свих серолошки испитаних свиња у овој студији. Сви добијени изолати <i>T. gondii</i>, осим једног, потицали су од серопозитивних свиња, међутим, веза између титра антитела и степена изолације није доказана.</p> <p>За потребе генотипизације, 18 од 19 узорак у којима су доказане цисте <i>T. gondii</i> испитано је методом анализе полиморфизма дужина рестрикционих фрагмената заснованој на мултиплекс „nested“ PCR-у (Mn-PCR-RFLP), помоћу шест генских</p>	

маркера (alt. SAG2, BTUB, GRA6, C22-8, PK1 и Apico). Одређивање генотипа је било могуће за укупно девет изолата *T. gondii*; два изолата су идентификована као тип III, а седам као тип II, чиме су добијени прве подаци о популационој структури *T. gondii* код домаћих свиња у Србији, који су у складу са претходним налазом типова II и III код оваца, голубова и коња.

У закључку, налаз специфичних антитела код свиња из различитих система узгоја и демонстрација инфективних циста у њиховим јестивим ткивима, потврђују значај свињског меса као потенцијалног извора хумане инфекције са *T. gondii*. Висок проценат серопозитивности и изолације утврђен код традиционално гајених мангулица сугерише да би приликом производње и припреме меса и месних производа пореклом од ових свиња требало посветити посебну пажњу мерама инактивације циста *T. gondii*. Одсуство корелације између висине титра антитела и степена изолације *T. gondii* из ткива испитаних свиња, као и налаз живих циста у ткивима серонегативних животиња, указују на то да се серолошки статус свиња не може сматрати поузданом мером безбедности њиховог меса. Налаз типа II, а посебно типа III код свиња, представља важан допринос познавању популационе структуре *T. gondii* код производних животиња у Србији.

Датум прихватања теме од стране Сената: ДП	12.02.2015.
Датум одбране: ДО	
Чланови Комисије: КО	Председник: _____ Др Олгица Ђурковић-Ђаковић, научни саветник Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду Ментор: _____ Др Весна Лалошевић, редовни професор Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду Члан: _____ Др Ивана Клун, виши научни сарадник Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду Члан: _____ Др Неђељко Карабасил, ванредни професор Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду Члан: _____ Др Бојан Благојевић, доцент Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Doctoral dissertation
Author: AU	Ljiljana Kuruca
Mentor: MN	Dr Vesna Lalošević, full professor
Title: TI	<i>Toxoplasma gondii</i> infection in pigs: serological, parasitological and molecular findings as meat safety parameters
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2017.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8

Physical description: PD	(9 chapters / 125 pages / 26 images / 16 tables / 1 graph / 347 references / 4 appendices)
Scientific field SF	Veterinary medicine
Scientific discipline SD	Animal diseases and hygiene of animal products
Subject, Key words SKW	<i>Toxoplasma gondii</i> , pigs, seroprevalence, isolation, meat safety, genotyping
UC	636.09:599.731.1:576.89(043.3)
Holding data: HD	Library, Faculty of Agriculture, Novi Sad
Note: N	None
<p>Abstract: AB</p> <p>Due to its worldwide distribution, the widest range of intermediate hosts and its ability to parasitize virtually any nucleated cell, <i>T. gondii</i> is regarded as one of the most successful parasites of animals and humans. Immunocompetent individuals rarely suffer from clinical toxoplasmosis, while in immunocompromised individuals infection with <i>T. gondii</i> can have severe, even lethal, consequences. In pregnant women, infection during pregnancy can result in abortion or birth of congenitally infected children. Undercooked meat of infected animals, particularly pigs, represents an important source of human infection.</p> <p>In Serbia, several seroepizootiological studies have been conducted since the 60s, confirming the existence of <i>T. gondii</i>-specific antibodies in pigs. Viable cysts have been isolated from the blood of seropositive pigs as well as from the brain and the heart of pigs of unknown serological status. However, this was the first study to investigate the existence of correlation between the presence of <i>T. gondii</i>-specific IgG antibodies in pig sera and viable cysts in their edible tissues.</p> <p>For this purpose, a total of 200 pigs raised in different management systems (commercial farms, households and free-range systems) were investigated for the presence of anti-<i>T. gondii</i> antibodies. Tissues of seropositive, as well as of some seronegative pigs, were then examined for the presence of tissue cysts, using bioassay (BO) and/or molecular methods (qPCR). <i>T. gondii</i>-specific antibodies were detected in a total of 21.5% of pigs, which may be considered a moderately high finding compared to other European countries. The seroprevalence was higher in free-range pigs (66.7%) than in farm pigs (17.8%) and backyard pigs (16.3%), while no difference was observed between the latter two categories. A total of 59 pigs were examined for the presence of <i>T. gondii</i> tissue cysts using at least one of the two available methods (BO, qPCR) and the parasite was detected in 19 animals. Viable cysts were recovered from 12 out of the 19 samples, which is 6% of all examined pigs. All viable parasites but one originated from seropositive animals; nevertheless, no correlation between specific antibody titre and isolation rate was observed.</p> <p>For genotyping purposes, 18 out of the 19 cyst-positive samples, were investigated by restriction fragment length polymorphism analysis based on nested PCR (Mn-PCR-RFLP), using six genetic markers (alt. SAG2, BTUB, GRA6, C22-8, PK1 and Apico). Typing was successful in a total of nine isolates: two isolates were identified as type III and seven as type II. These results are the first data regarding the population structure of <i>T. gondii</i> in domestic pigs in Serbia and are in accordance with previous findings of type II and III in sheep, pigeons and horses.</p>	

To conclude, detection of *T. gondii*-specific antibodies in pigs from different management systems and demonstration of viable cysts in their tissues confirm the significance of pork as a potential source of human *T. gondii* infection. High seroprevalence as well as the isolation rate observed in traditionally raised “mangulica” pigs suggest that special attention should be paid to applying appropriate tissue cysts inactivation methods during the production and preparation of their meat. Absence of correlation between specific antibody titer and *T. gondii* isolation rate observed in this study, together with the detection of viable cysts in tissues of seronegative animals, lead to the conclusion that serological status of a pig is not a reliable measure of the safety of its meat for human consumption. Identification of pig isolates as type II and type III represents an important contribution to the understanding of the *T. gondii* population structure in meat-producing animals in Serbia.

Accepted on Senate on: AS	12.02.2015.
------------------------------	-------------

Defended: DE	
-----------------	--

Thesis Defense Board: DB	<p>President: _____ Dr Olgica Đurković-Đaković, Professor of Research Institute for Medical Research, University of Belgrade</p> <p>Mentor: _____ Dr Vesna Lalošević, Full Professor Faculty of Agriculture, University of Novi Sad</p> <p>Member: _____ Dr Ivana Klun, Associate Research Professor Institute for Medical Research, University of Belgrade</p> <p>Member: _____ Dr Neđeljko Karabasil, Associate Professor Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade</p> <p>Member: _____ Dr Bojan Blagojević, Assistant Professor Faculty of Agriculture, University of Novi Sad</p>
-----------------------------	---

Докторска дисертација је урађена у оквиру пројекта Министарства науке, просвете и технолошког развоја Републике Србије под називом „Одабране биолошке опасности за безбедност/квалитет хране анималног порекла и контролне мере од фарме до потрошача (ТР 31034).

Серолошке, паразитолошке и молекуларне анализе су обављене у Националној референтној лабораторији за токсоплазмозу у Институту за медицинска истраживања Универзитета у Београду, припрема узорака је вршена у Лабораторији за паразитологију, Департмана за ветеринарску медицину, Пољопривредног факултета Универзитета у Новом Саду, док је биолошки оглед извођен у виваријуму Завода за антирабичну заштиту „Пастеров завод“ у Новом Саду.

Овим путем желим да се захвалим свима који су ми на било који начин помогли током израде ове докторске дисертације, а посебно:

Проф. др Весни Лалошевић, мојој менторки, на њеној визији, поверењу и свим биткама против ветрењача, које је водила у моје име.

Др Олгици Ђурковић-Ђаковић, научном саветнику, на указаном гостопримству, пренетом знању и помоћи током финалне израде ове докторске дисертације.

Сјајном тиму људи запослених у **Националној референтној лабораторији за токсоплазмозу**, у Институту за медицинска истраживања Универзитета у Београду, а посебно **др Ивани Клун**, вишем научном сараднику, и **Александри Узелац**, чије знање, стрпљење и пријатељски савети су ми били драгоцене смерница током израде дисертације.

Проф. др Душану Лалошевићу, на уступљеном простору и средствима за извођење биолошког огледа, и дивним фотографијама које су употпуниле резултате ове докторске дисертације.

Управи и запосленима у индустрији меса „Neoplanta“ из Новог Сада, а нарочито колеги **др вет. Милошу Ђурићу**; господину **Слободану Симићу**, управнику Специјалног резервата природе „Засавица“, и господину **Ђорђу Беломарковићу** на великом разумевању и помоћи у сакупљању узорака.

Колеги **Ђорђу Вукомановићу**, на великој помоћи у извођењу биолошког огледа и стручности и племенитости које је показао у раду са животињама.

Колегама **Станиславу Симин** и **Анна Марији Галфи**, на свим корисним саветима и заједничким кафама.

Доц. др Бојану Благојевићу, на професионалној подршци и разумевању које је показао током завршне фазе израде ове докторске дисертације.

Мојим родитељима **Мири** и **Зорану**, на бескрајној љубави и подршци, као и свим акцијама транспорта узорака, које су на себе преузимали са пуно ентузијазма.

Мојој сестри **Зорици**, која је одувек била мој учитељ и анђео чувар и веровала у мене и када ја нисам.

Мом супругу **Браниславу**, мојој љубави, моме светлу,... зато што је био уз мене и када је било тешко, да ме подсети да сам „нинџа“ и увек извуче праву керефеку из шешира :)

Мојим сродним душама - мојим **Другарима**, који ми нису дозволили да заборавим ко сам и терали ме да се смејем до суза.

Драгој души, која ме је сваки дан водила у шетњу...

САДРЖАЈ

Кратак садржај.....	i
Summary.....	iii
1. УВОД.....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	5
2.1. Историјат открића <i>T. gondii</i>	6
2.2. Грађа и животни облици <i>T. gondii</i>	7
2.2.1 Тахизоити.....	8
2.2.2 Брадизоити.....	10
2.2.3 Тахизоити и брадизоити: прелаз између стадијума.....	12
2.2.4 Ооцисте.....	13
2.3. Животни циклус <i>T. gondii</i>	14
2.4. Трансмисија.....	17
2.5. Иmunски одговор домаћина.....	19
2.6. Генетска разноврсност популације <i>T. gondii</i>	20
2.7. Токсоплазмоза човека.....	21
2.7.1 Епидемиологија.....	21
2.7.2 Клиничке карактеристике хумане инфекције са <i>T. gondii</i>	22
2.7.2.1 Конгенитална токсоплазмоза.....	23
2.7.2.2 Стечена токсоплазмоза.....	23
2.7.3 Пuteви хумане инфекције са <i>T. gondii</i>	25
2.7.3.1 Инфекција људи ооцистама <i>T. gondii</i>	25
2.7.3.2 Инфекција људи ткивним цистама <i>T. gondii</i>	26
2.7.4 Дијагноза.....	26
2.7.5 Терапија.....	28
2.7.6 Превенција хумане инфекције са <i>T. gondii</i>	29
2.8. Токсоплазмоза животиња.....	30
2.8.1 Токсоплазмоза свиња.....	30
2.8.1.1 Епизоотиологија.....	30
2.8.1.2 Клиничка слика.....	31
2.8.1.3 Свињско месо као извор инфекције за људе.....	32
2.8.1.4 Методе дијагностике.....	33
2.8.1.4.1 Индиректне – серолошке методе.....	33

Инфекција паразитом *Toxoplasma gondii* код свиња: серолошки, паразитолошки и молекуларни налази као параметри безбедности меса

2.8.1.4.2	Директне методе дијагностике токсоплазмозе код свиња	35
2.8.1.5	Мере контроле са циљем елиминације или смањивања присуства <i>T. gondii</i> у месу свиња	40
2.8.1.5.1	Мере контроле на нивоу фарме.....	40
2.8.1.5.2	Мере контроле на нивоу кланице.....	41
2.8.1.5.3	Методе инактивације циста <i>T. gondii</i> у месу свиња	42
3.	ЦИЉЕВИ И ЗАДАЦИ.....	44
4.	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	46
4.1.	Узорак	47
4.1.1	Величина узорка	47
4.1.2	Испитиване животиње	48
4.1.3	Узимање и обрада узорака.....	49
4.2.	Серолошка испитивања	50
4.3.	Вештачка дигестија	52
4.4.	Биолошки оглед	53
4.5.	Молекуларна испитивања	54
4.5.1	Екстракција ДНК	54
4.5.1.1	Оптимизација reqGOLD кита за екстракцију ДНК	55
4.5.1.2	Екстракција ДНК из узорака употребом reqGOLD кита	56
4.5.2	Real-time quantitative PCR (qPCR)	57
4.5.3	Генотипизација	59
4.6.	Статистичка обрада података.....	64
5.	РЕЗУЛТАТИ.....	66
5.1.	Подаци о животињама.....	67
5.2.	Резултати испитивања серума свиња на присуство специфичних IgG антитела против <i>T. gondii</i>	68
5.3.	Организациони и зоохигијенски профил фарми	68
5.4.	Резултати биолошког огледа	70
5.5.	Резултати qPCR-а у дигестима ткива.....	74
5.6.	Генотипизација	76
6.	ДИСКУСИЈА.....	80
7.	ЗАКЉУЧЦИ	95
8.	ЛИТЕРАТУРА.....	98
9.	ПРИЛОЗИ.....	123

Кратак садржај

Захваљујући глобалној дистрибуцији, широком спектру прелазних домаћина и способности да паразитира унутар готово сваке ћелије са једром, *Toxoplasma gondii* представља једног од најуспешнијих паразита људи и животиња. Код имунокомпетентних особа, инфекција токсоплазмозом у већини случајева пролази асимптоматски, док код имунокомпромитованих особа може имати озбиљне, чак смртоносне, последице, а код трудница довести до абортуса или рођења конгенитално инфициране деце. Важан извор инфекције за људе представља термички недовољно обрађено месо инфицираних производних животиња, нарочито свиња, које представљају једну од врста из чијих ткива је паразит најчешће изолован.

У Србији је од шездесетих година прошлог века спроведено више истраживања у којима је потврђено присуство антитела против *T. gondii* код домаћих свиња. Инфективни паразити су изоловани из крви серопозитивних свиња, као и из мозга и срца свиња непознатог серолошког статуса. Ова дисертација представља прву студију која се бавила испитивањем присуства везе између налаза IgG антитела против *T. gondii* у серуму и вијабилних циста у јестивим ткивима свиња.

У ту сврху, на присуство специфичних антитела је (методом модификоване аглутинације, МАТ) испитано 200 свиња из три различита система узгоја (комерцијалне фарме, домаћинства и слободно). Ткива серопозитивних, и неких серонегативних, свиња су затим испитана на присуство циста, биолошким огледом (БО) и/или молекуларним методама (qPCR). Антитела против *T. gondii* су пронађена код укупно 21,5% свиња, што се може сматрати средње високом вредношћу у поређењу са другим европским земљама. Антитела су у већем проценту пронађена код слободно држаних свиња (66,7%), него код фармских свиња (17,8%) и свиња из домаћинства (16,3%), међу којима није било разлике у серопреваленци. На присуство циста је, барем једном од две методе (БО, qPCR), прегледано укупно 59 свиња и паразит је пронађен у 19 случајева. Од тога, вијабилна *T. gondii* је доказана у 12 случајева, што чини 6% свих серолошки испитаних свиња у овој

студији. Сви добијени изолати *T. gondii*, осим једног, потицали су од серопозитивних свиња, међутим, веза између титра антитела и степена изолације није доказана.

За потребе генотипизације, 18 од 19 узорака у којима су доказане цисте *T. gondii* испитано је методом анализе полиморфизма дужина рестрикционих фрагмената заснованој на мултиплекс „*nested*“ PCR-у (Mn-PCR-RFLP), помоћу шест генских маркера (alt. SAG2, BTUB, GRA6, C22-8, PK1 и Apico). Одређивање генотипа је било могуће за укупно девет изолата *T. gondii*; два изолата су идентификована као тип III, а седам као тип II, чиме су добијени прве подаци о популационој структури *T. gondii* код домаћих свиња у Србији, који су у складу са претходним налазом типова II и III код оваца, голубова и коња.

У закључку, налаз специфичних антитела код свиња из различитих система узгоја и демонстрација инфективних циста у њиховим јестивим ткивима, потврђују значај свињског меса као потенцијалног извора хумане инфекције са *T. gondii*. Висок проценат серопозитивности и изолације утврђен код традиционално гајених мангулица сугерише да би приликом производње и припреме меса и месних производа пореклом од ових свиња требало посветити посебну пажњу мерама инактивације циста *T. gondii*. Одсуство корелације између висине титра антитела и степена изолације *T. gondii* из ткива испитаних свиња, као и налаз живих циста у ткивима серонегативних животиња, указују на то да се серолошки статус свиња не може сматрати поузданом мером безбедности њиховог меса. Налаз типа II, а посебно типа III код свиња, представља важан допринос познавању популационе структуре *T. gondii* код производних животиња у Србији.

Summary

Due to its worldwide distribution, the widest range of intermediate hosts and its ability to parasitize virtually any nucleated cell, *T. gondii* is regarded as one of the most successful parasites of animals and humans. Immunocompetent individuals rarely suffer from clinical toxoplasmosis, while in immunocompromised individuals infection with *T. gondii* can have severe, even lethal, consequences. In pregnant women, infection during pregnancy can result in abortion or birth of congenitally infected children. Undercooked meat of infected animals, particularly pigs, represents an important source of human infection.

In Serbia, several seroepizootiological studies have been conducted since the 60s, confirming the existence of *T. gondii*-specific antibodies in pigs. Viable cysts have been isolated from the blood of seropositive pigs as well as from the brain and the heart of pigs of unknown serological status. However, this was the first study to investigate the existence of correlation between the presence of *T. gondii*-specific IgG antibodies in pig sera and viable cysts in their edible tissues.

For this purpose, a total of 200 pigs raised in different management systems (commercial farms, households and free-range systems) were investigated for the presence of anti-*T. gondii* antibodies. Tissues of seropositive, as well as of some seronegative pigs, were then examined for the presence of tissue cysts, using bioassay (BO) and/or molecular methods (qPCR). *T. gondii*-specific antibodies were detected in a total of 21.5% of pigs, which may be considered a moderately high finding compared to other European countries. The seroprevalence was higher in free-range pigs (66.7%) than in farm pigs (17.8%) and backyard pigs (16.3%), while no difference was observed between the latter two categories. A total of 59 pigs were examined for the presence of *T. gondii* tissue cysts using at least one of the two available methods (BO, qPCR) and the parasite was detected in 19 animals. Viable cysts were recovered from 12 out of the 19 samples, which is 6% of all examined pigs. All viable parasites but one originated from seropositive animals; nevertheless, no correlation between specific antibody titre and isolation rate was observed.

For genotyping purposes, 18 out of the 19 cyst-positive samples, were investigated by restriction fragment length polymorphism analysis based on nested PCR (Mn-PCR-RFLP), using

***Toxoplasma gondii* infection in pigs: serological, parasitological and molecular findings as meat safety parameters**

six genetic markers (alt. SAG2, BTUB, GRA6, C22-8, PK1 and Apico). Typing was successful in a total of nine isolates: two isolates were identified as type III and seven as type II. These results are the first data regarding the population structure of *T. gondii* in domestic pigs in Serbia and are in accordance with previous findings of type II and III in sheep, pigeons and horses.

To conclude, detection of *T. gondii*-specific antibodies in pigs from different management systems and demonstration of viable cysts in their tissues confirm the significance of pork as a potential source of human *T. gondii* infection. High seroprevalence as well as the isolation rate observed in traditionally raised “mangulica” pigs suggest that special attention should be paid to applying appropriate tissue cysts inactivation methods during the production and preparation of their meat. Absence of correlation between specific antibody titer and *T. gondii* isolation rate observed in this study, together with the detection of viable cysts in tissues of seronegative animals, lead to the conclusion that serological status of a pig is not a reliable measure of the safety of its meat for human consumption. Identification of pig isolates as type II and type III represents an important contribution to the understanding of the *T. gondii* population structure in meat-producing animals in Serbia.

1. УВОД

“We have been playing a game of chess with Toxoplasma for the last 100 years and we have made many advances. However, even with all our new knowledge, we are a long way from reaching ‘check mate’”

(Ferguson, 2009)

Toxoplasma gondii је облигатна интрацелуларна протозоа из кола *Apicomplexa* (Табела 1). Животни циклус овог паразита састоји се из асексуалне и сексуалне фазе, која се одвија искључиво у цревима дефинитивног домаћина – различитих врста из фамилије мачака (*Felidae*). Иако би се због постојања сексуалне фазе размножавања код овог паразита могла очекивати већа популациона разноврсност, већина досадашњих изолата *T. gondii* у Европи и Северној Америци припада једном од три главна клонска типа (тип I, II и III) (Howe и Sibley, 1995), док тропске крајеве, попут Африке и Јужне Америке, карактеришу тзв. атипични и/или рекомбинантни сојеви *T. gondii* (Ajzenberg и сар., 2004).

Табела 1. Таксономија *T. gondii* (Dubey, 2009a)

Коло:	<i>Apicomplexa</i> , Levine, 1970
Класа:	<i>Sporozoasida</i> , Leukart, 1879
Подкласа:	<i>Coccidiasina</i> , Leukart, 1879
Ред:	<i>Eimeriorina</i> , Leger, 1911
Фамилија:	<i>Toxoplasmatidae</i> , Биосса, 1956
Род:	<i>Toxoplasma</i> , Nicolle and Manceaux, 1909

Космополитска распрострањеност, широка лепеза прелазних домаћина (у које се убрајају сисари, птице и неке врсте хладнокрвних животиња), као и способност да

паразитира унутар практично сваке ћелије са једром, чине *T. gondii* једним од најуспешнијих паразита. Процењује се да је токсоплазмом инфицирана чак трећина светске хумане популације. Код имунокомпетентних особа, инфекција углавном има благ и самоограничавајући ток, док код имунокомпромитованих особа, инфекција са *T. gondii* може имати озбиљне, чак смртоносне, последице (Weiss и Dubey, 2009; McLeod и сар., 2013). Код жена, инфекција током трудноће може довести до абортуса или рођења конгенитално инфициране деце (Djurković-Djaković, 1995).

Људи се токсоплазмом најчешће инфицирају конзумацијом хране и воде контаминираним ооцистама или ингестијом ткивних циста, присутних у ткивима инфицираних животиња. Токсоплазма је проглашена једним од најзначајнијих зоонотских алиментарних патогена (FAO/WHO, 2014); у САД-у се сматра другим најважнијим узроком смрти и четвртим најважнијим узроком хоспитализација изазваних алиментарним болестима (Scallan и сар., 2011), док је у Грчкој и Холандији *T. gondii* сврстана међу пет алиментарних узрочника са најтежим последицама по људско здравље (Gkogka и сар., 2011; Havelaar и сар., 2012). У другим европским земљама токсоплазма је такође рангирана високо са аспекта тежине последица, одмах иза главних узрочника дијареја, као што су нетифоидна *S. enterica* и врсте из рода *Campylobacter* (Havelaar и сар., 2015).

Доказано је да домаће свиње (*Sus scrofa domesticus*) представљају важан извор хумане инфекције са *T. gondii* (Dubey, 1986; Klun и сар., 2006; Cademartori и сар., 2014). Антитела против *T. gondii* су пронађена код свиња из свих система производње, а извештаји о њеној изолацији из ткива свиња долазе из целог света (De Sousa и сар., 2006; Dubey и сар. 2012; Turčeková и сар., 2013). Након што се једном инфицирају, свиње могу бити носиоци инфективних циста током читавог живота (Hill и Dubey, 2002). Међутим, услед генералног одсуства клиничке слике и немогућности постојећих метода инспекције да детектују микроскопске цисте *T. gondii* у месоу (Blagojević и Antić, 2014), инфициране свиње остају непрепознате и њихово месо постаје извор потенцијалне инфекције потрошача.

У Србији је конзумација термички недовољно обрађеног меса идентификована као један од главних фактора ризика од настанка хумане токсоплазмозе (Bobić и сар., 1998; Bobić и сар., 2007). Како је свињетина најчешће конзумирана врста меса у Србији, значајан је податак да су антитела против *T. gondii* пронађена код 28,9% од 605 свиња из

различитих региона Србије (Klun и сар., 2006), као и код 26% (Šibalić, 1966) и 9,2% (Klun и сар., 2011) испитаних свиња из околине Београда, и 4,5% од 134 тестиране свиње из Бачке (Kuruca и сар., 2014). Инфективни паразити су изоловани из мозга и срца свиња непознатог серолошког статуса (Simitch и сар., 1967), као и из крви серопозитивних свиња (Klun и сар., 2011). Када је реч о популационој структури *T. gondii* код животињских врста у Србији, подаци за сада постоје за овце (тип II), коње (два изолата типа III), и голубове (два изолата типа II и један типа III) (Marković и сар., 2014; Klun и сар., 2017), али не и за свиње.

Циљ ове студије је био да се свиње заклане за потребе људске исхране испитају на истовремено присуство антитела против *T. gondii* у серуму и вијабилних циста у јестивим ткивима. У случају детекције паразита, планирано је да се изврши њихова генотипизација.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Историјат открића *T. gondii*

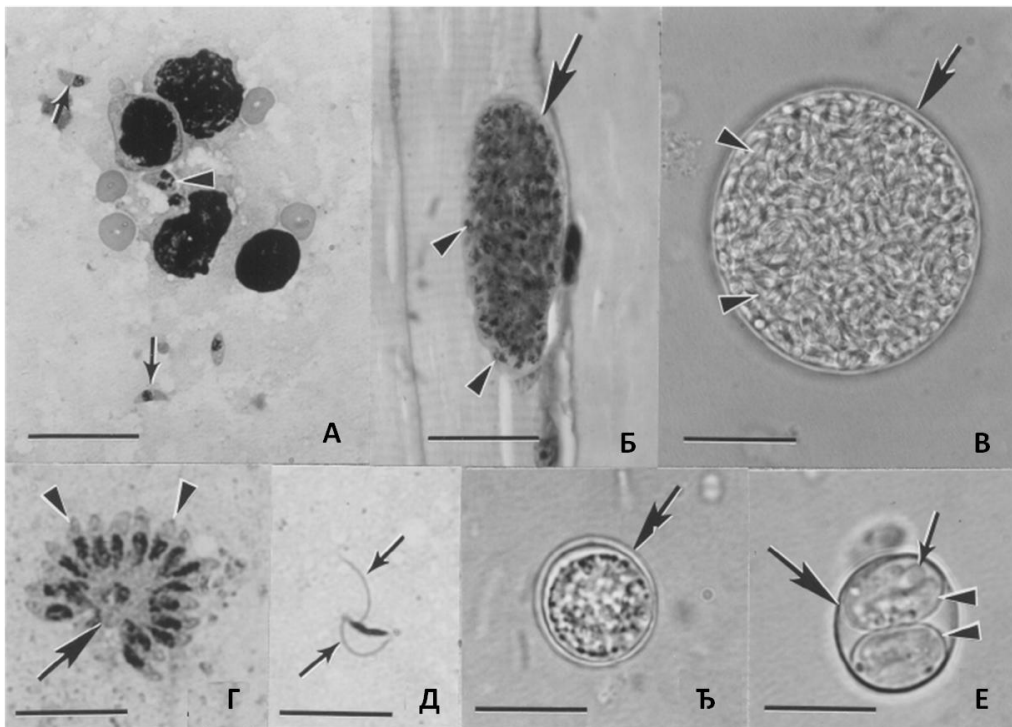
Први истраживач који је под својим микроскопом угледао протозое, а међу њима могуће и оне из кола *Apicomplexa*, био је творац првог микроскопа, “отац микробиологије”, Anton van Leeuwenhoek (1632-1723). Више од две стотине година касније (1908) две групе научника: Французи Charles Jules Henry Nicolle (1866-1936) и Louis Herbert Manceaux (1865-1934), из Пастеровог Института у Тунису, и Италијан Alfonso Splendore (1871-1953), у Бразилу, независним радом откривају до тада непознату протозоу (Morrisette и Аџока, 2009). Nicolle и Manceaux су паразит пронашли у ткивима гундија (*Stenodactylus gundi*) - северноафричког глодара кога су у Институту користили за изолацију лишманије (Nicolle и Manceaux, 1908), док га је Splendore, отприлике у исто време, открио код питомог кунића (Splendore, 1908). Након што су утврдили да морфологија новооткривене протозое не одговара ни пироплазми (*Piroplasma quadrigeminum*), коју су често налазили код ових глодара, ни лишманији (*Leishmania*), Nicolle и Manceaux предлажу да би новог паразита, у филогенетском смислу, требало сместити управо негде између ова два рода и привремено му дају име *Leishmania gondi* (Nicolle и Manceaux, 1908). Даља истраживања доводе ове научнике до закључка да протозоа коју су открили несумњиво припада новој врсти, тако да јој 1909. године, на основу морфолошких карактеристика (грчки: toxon = лук, plasma = живот) и домаћина у коме је пронађена (*Stenodactylus gundi*, кога су у својим радовима погрешно класификовали као *Stenodactylus gondi*), дају име *Toxoplasma gondii* (Nicolle и Manceaux, 1909). У својим запажањима, Splendore такође закључује да протозоа коју је пронашао није лишманија (Splendore, 1908) и, сложивши се да је морфолошки идентична са

паразитом кога су откриле његове колеге у Бразилу, даје јој име *Toxoplasma cuniculi* (цитирано по Morrissette и Ајиока, 2009).

Након овога, уследили су бројни налази токсоплазми сличних паразита код различитих животињских врста, укључујући и човека (Wolf и сар., 1939; Sabin, 1941; Pinkerton и Henderson, 1941; Beverley и Beattie, 1958), а имунолошким и биолошким поређењем изолата пореклом од људи и животиња дошло се до закључка да сви припадају једној врсти - *T. gondii* (Sabin, 1939). Коначна класификација ове протозое је извршена тек 60 година након њеног открића, као резултат упознавања њене ултраструктуре и открића ооцисте и сексуалног циклуса (стадијума шизогоније и гаметогоније) у цревима мачке (Hutchison и сар., 1969; Work и Hutchison, 1969; Dubey и сар., 1970; Sheffield и Melton, 1970; Frenkel и сар., 1970; Hutchison и сар., 1970; Hutchison и сар., 1971) који су дали коначне доказе за њено сврставање у ред *Eimeriorina*.

2.2. Грађа и животни облици *T. gondii*

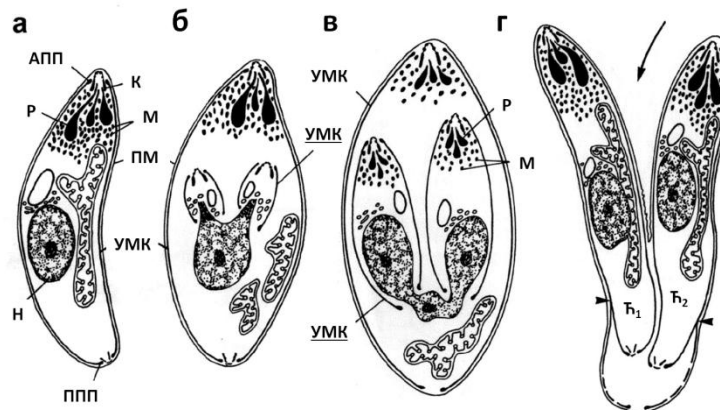
У току свог животног циклуса, *T. gondii* пролази кроз стадијум тахизоита, брадизоита (ткивне цисте), стадијум ентероепителијалних форми и стадијум спорозоице (ооцисте) (Слика 1).



Слика 1. Развојни стадијуми *T. gondii*. За слике (А)–(Г) величина скале износи 20 μm , а за слике (Д)–(Е) 10 μm . (А) Тахизоити у отиску плућа, обојеном по Гимзи. Стрелице показују појединачне тахизоите, док главе стрелица показују тахизоите у фази деобе (Б) Ткивна циста у мишићној ћелији. Стрелица показује танак зид цисте који обавија многобројне брадизоите (глава стрелица). Обојено хематоксилином и еозином. (В) Ткивна циста у хомогенату мозга миша. Видљив је зид цисте (стрелица) који обавија брадизоите (глава стрелица). Нативни препарат. (Г) Шизонт (стрелица) са мерозоитима (глава стрелица). Отисак црева мачке, обојен по Гимзи (Д) Микрогамет са две флагеле (стрелице). Отисак црева мачке, Гимза (Ђ) Неспорулисана ооциста у флотираним мачијем фецесу. Стрелица показује двослојни зид ооцисте који окружује зигот. Нативни препарат. (Е) Спорулисана ооциста. Танак зид ооцисте (велика стрелица) обавија две спороцисте (глава стрелица) са по четири спорозоиота (мала стрелица). Нативни препарат (Hill и сар., 2005).

2.2.1 Тахизоити

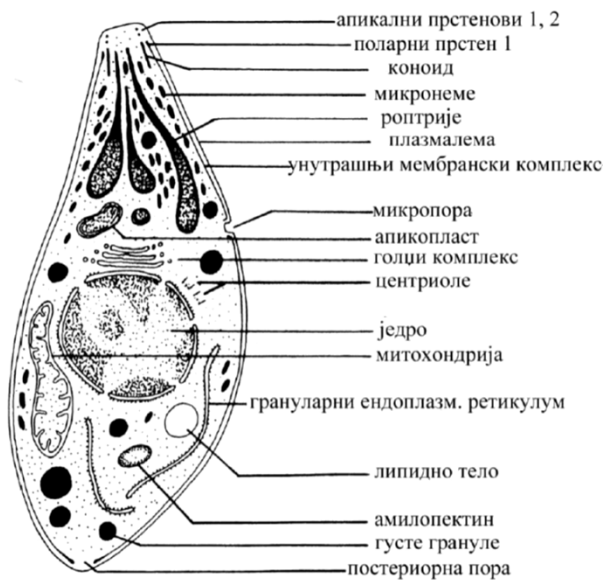
Тахизоити (грчки, *tachos* - брзина; *sin.* трофозоит, пролиферативна форма, ендозоит) представљају стадијум који су у гундију открили Nicolle и Мансеаух. То су облици који карактеришу акутну фазу инфекције, као и реактивацију хроничне инфекције. Нападају све врсте ћелија са једром (Dubey и сар., 1998) и, по продирању у ћелију, пролазе кроз низ брзих деоба које се одвијају по типу ендодиогеније (Hu и сар., 2004)(Слика 2).



Слика 2. Ендодиогенија код *T. gondii*. У средишњем делу мајке ћелије се формирају зачеци два коноида, унутрашњих мембранозних комплекса и микротубула будућих ћерки ћелија (б). У апикалној регији се формирају микронеме и роптрије (в), а унутрашњи мембранозни комплекси настављају са растом ка постериорном поларном крају. Омотач једра задржава континуитет док се једро дели између ћерки ћелија (в). Сазревање ћерки ћелија се наставља кроз поделу цитоплазме и преосталих органела (г). Када су ћерке сасвим сазреле, апикални комплекс мајке се распада и ћерке ћелије пупљењем излазе из мајке преузимајући њену плазма мембрану (д). АПП-апикални поларни прстен, ППП-постериорни поларни прстен, К-коноид, М-микронеме, Р-роптрије, Н-

нуклеус, ПМ-плазмина мембрана, УМК-унутрашњи мембранозни комплекс мајке ћелије, УМК-унутрашњи мембранозни комплекс ћерке ћелије, H_1 , H_2 - ћерке ћелије. (Delbac и сар., 2001; Black и Boothroyd, 2000).

Тахизоити су полумесечастог облика, просечних димензија $2\mu\text{m} \times 7\mu\text{m}$, при чему је задњи крај паразита увек заобљенији у односу на предњи. Грађени су од цитоскелета (кога чине апикални комплекс (Слика 3), субпеликуларне микротубуле и базални комплекс), секреторних органела (роптрије, микронеме, густе грануле), апикопласта, митохондрија, ендоплазматичног ретикулума, Голџијевог апарата, рибозома и нуклеуса, које све заједно обухвата пеликула (Dubey и сар., 1998; Anderson-White и сар., 2012)(Слика 4).

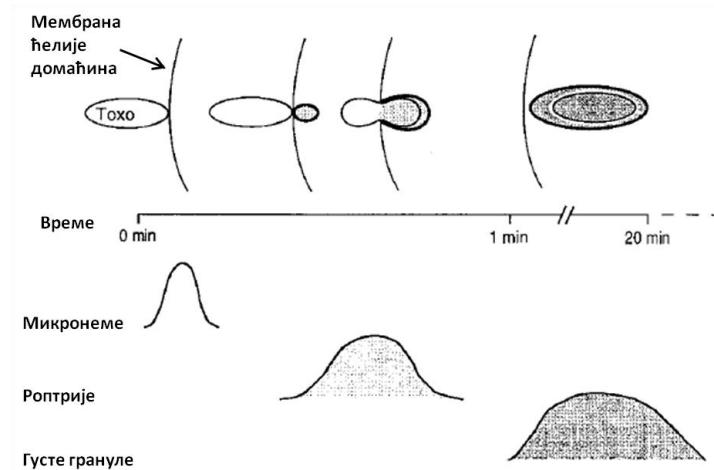


Слика 3. Шематски приказ грађе тахизоита *T. gondii* (Dubey и сар., 1998)



Слика 4. Грађа апикалног комплекса *T. gondii* (Nichols и Chiappino, 1987)

Цитоскелет тахизоиту даје карактеристичан облик и омогућава његово кретање, које се описује као ротирање, клизање, таласање и сврдлање (Dubey и сар., 1998; Nichols и Chiappino, 1987). Цитоскелет, тачније његове апикалне структуре, као што је коноид, такође омогућава инвазију домаћинске ћелије. Осим што обезбеђује неопходну механичку силу, коноид учествује у усмеравању продуката секреторних органела, са којима суделује у пробијању ћелијске мембране (Слика 5) (Nichols и Chiappino, 1987; Morrissette и Sibley, 2002; Dubey и сар., 1998).



Слика 5. Динамика ослобађања протеина из секреторних органела *T. gondii* у процесу инвазије домаћинске ћелије. За формирање чврсте везе између паразита и домаћинске ћелије задужени су протеини микронеме, који се у процесу инвазије излучују први. Затим следи секреција протеина роптрија, чиме започиње формирање паразитофорне мембране. По завршетку овог процеса, густе грануле започињу секрецију протеина за које се сматра да доприносе модификацијама паразитофорне вакуоле које омогућавају интрацелуларном преживљавању токсоплазме (Carruthers и Sibley 1977).

Још једна важна органела тахизоита *T. gondii* јесте апикопласт - закржљали пластид, који не врши фотосинтезу, настао највероватније у процесу секундарне ендосимбиозе, након ингестије алги које су га на исти начин “наследиле” од цијанобактеријама-сличних прокариотских организама (Wilson и сар., 1993). Осим што представља поприште важних анаболичких процеса, као што су синтеза масних киселина, изопреноида, хема, скроба, ароматичних аминокиселина итд, апикопласт је значајан и са аспекта терапије токсоплазмозе, зато што представља одлично циљно место за деловање лекова (Fichera и Roos, 1997).

2.2.2 Брадизоити

Брадизоити представљају спороделећи облик (грчки, *bradys* - споро, *sin.* цистозоити) у којем *T. gondii* перзистира у организму домаћина за време хроничне инфекције. Описани су двадесет година након открића тахизоита (Dubey, 2008), а назив је, као и у случају тахизоита, предложио Frenkel (1973).

Брадизоити настају трансформацијом тахизоита унутар паразитофорне вакуоле, од које се формира зид ткивне цисте. У почетку су цисте називане “псеудоцистама”, јер се сматрало да зид, као такав, не постоји већ да брадизоити просто остају обавијени плазмалемом ћелије унутар које се умножавају (Lainson, 1958). Морфолошки и структурно, брадизоити су слични тахизоитима, од којих су нешто тањи (7 X 1,5 μm) (Табела 2) (Ferguson и Dubremetz, 2014). Значајна разлика је примећена у односу на пепсинску дигестију, на коју су брадизоити, у односу на тахизоите, далеко отпорнији (Jacobs и сар., 1960). Такође, препатентни период је краћи након пероралне инфекције мачке брадизоитима него након инфекције тахизоитима (Dubey и Frenkel, 1976; Freyre и сар., 1989).

Табела 2. Морфолошке разлике између развојних стадијума *T. gondii* (Ferguson и Dubremetz, 2014)

Животни стадијум	Положај једра	Микронеме	Роптрије		Густе грануле	Полисахаридне грануле
			број	изглед		
Тахизоит	централно	неколико	5-12	издужен	бројне	неколико
Брадизоит	базално	бројне	5-10	лоптаст	бројне	бројне
Мерозоит	централно	неколико	3-5	лоптаст	неколико	одсутне
Спорозоит	базално	бројне	5-10	издужен	бројне	бројне

Конверзија тахизоита у брадизоите је примећена већ 3 - 4 дана након инфекције (Dubey и Frenkel, 1976), па и раније, док се цисте могу детектовати већ 7 - 10 дана након инфекције (Sullivan и Jeffers, 2012). Зид ткивне цисте је еластичан и танак (<0,5 μm) и омогућава раст цисте заједно са повећањем броја брадизоита. Брадизоити се, као и тахизоити, деле ендодиогенијом. Величина цисте зависи од њене старости, али и од врсте домаћинске ћелије и соја самог паразита. Младе цисте могу имати пречник свега 5 μm и садржати само два брадизоита, док старије могу порастати и до 100 μm у пречнику и садржати стотине спорозоитних облика (Dubey, 2009б). Ткивне цисте испољавају изражен тропизам према нервном и мишићном ткиву, укључујући мозак, очи, скелетну и срчану мускулатуру, али се могу развити и у висцералним органима, као што су плућа, јетра и бубрези (Dubey и сар., 1998). Да ли се ово дешава као последица израженије трансформације тахизоита у брадизоите у овим ткивима или као последица појачане елиминације циста из других ткива, није у потпуности разјашњено (Schlüter и сар., 2014). Брадизоити унутар ткивне цисте могу перзистирати годинама, па и до краја живота

домаћина, али је примећено и да многи брадизоити временом дегенеришу (неки већ 4 недеље након инфекције) (Pavesio и сар., 1992).

2.2.3 Тахизоити и брадизоити: прелаз између стадијума

Код животиња инфицираних токсоплазмом, трансформација тахизоита у брадизоите означава почетак хроничне фазе инфекције која представља кључ дуготрајног преживљавања *T. gondii* у домаћину. Овај процес се, у далеко мањем проценту, одвија и у супротном смеру, када се услед слабљења имунског одговора домаћина брадизоити трансформишу у тахизоите, доводећи до реактивације болести. У оба случаја, развојни стадијуми пролазе кроз низ морфолошких и молекуларних промена, укључујући експресију специфичних површинских антигена и промене у метаболизму (Lyons et al., 2002).

Доказано је да, у *in vitro* условима, низ спољашњих и унутрашњих стресогених фактора делује инхибиторно на репликацију тахизоита и подстиче њихову трансформацију у брадизоите. Излагање тахизоита или домаћинске ћелије алкалној средини (pH 8 - 8,2) пре почетка инвазије, а посебно третирање већ инвадиране ћелије, показало се као метода којом је могуће подстаћи диференцијацију тахизоита у брадизоите (Soete и сар., 1994; Weiss и сар., 1998; Skariah и сар., 2012). Осим тога, доказано је да диференцијацију подстичу и високе температуре (43°C) (Soete и сар., 1994), азот моноксид (NO), различити хемиотерапеутици (нпр. атоваквон) (Djurković-Djaković и сар., 2005), инхибитори активности паразитских митохондрија (олигомицин, ротенон итд.), одсуство кисеоника (Bohne и сар., 1994; Da Silva и сар., 2008), као и ускраћивање нутријената (холестерол, аргинин, пиримидин) (Sullivan и Jeffers 2012; Ihara и Nishikawa, 2014).

Главни ефектор имунског одговора домаћина на инфекцију токсоплазмом јесте интерферон гама (IFN- γ) (Suzuki и сар., 1988). Осим што поспешује конверзију тахизоита у брадизоите, он спречава и реактивацију дормантних брадизоита. У мањој мери, трансформацију тахизоита у брадизоите подстичу и други проинфламаторни цитокини, као што су интерлеукин 6 (IL-6) и фактор некрозе тумора α (*tumour necrosis factor*, TNF α) (Sullivan и Jeffers 2012).

Поједини аутори сугеришу да би одређене субпопулације тахизоита могле бити генетски програмиране да приликом доспећа у одговарајућу микросредину ћелије

(Ferguson и Dubremetz, 2014) или након одређеног броја деоба (Schlüter и сар., 2014) започну развој ткивне цисте.

2.2.4 Ооцисте

Ооцисте представљају стадијум *T. gondii* који настаје као резултат сексуалног размножавања, које се одвија искључиво у танким цревима животиња из породице мачака (*Felidae*).

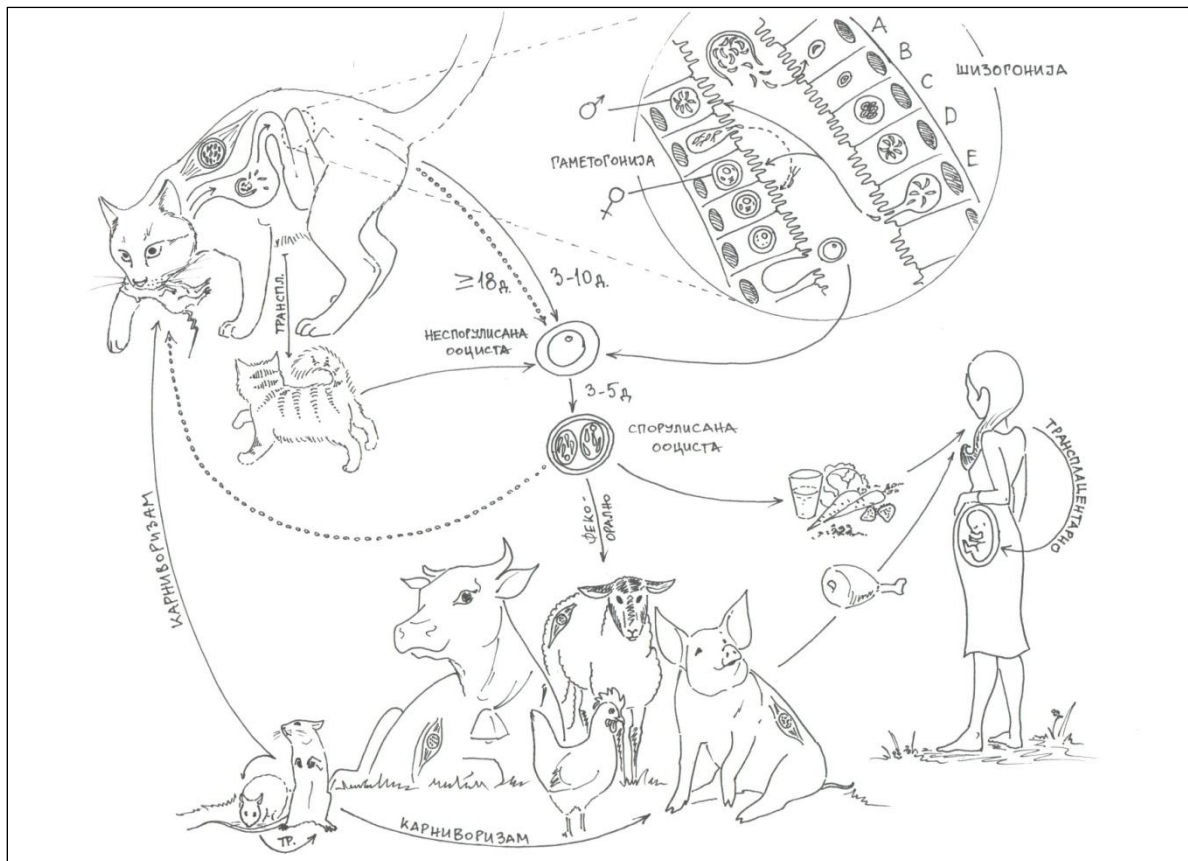
У тренутку избацивања у спољашњу средину, ооцисте су неспорулисане и, као такве, неинфективне. Овалног су облика, просечних димензија 10 x 12 μm и обавијене двослојним зидом (Слика 1Г) чији спољашњи слој им обезбеђује чврстину и отпорност на физичке стимулусе, док их унутрашњи слој штити од хемијских утицаја спољашње средине (Ferguson, 2009).

Након спорулације, ооцисте постају инфективне, а облик и димензије им се незнатно мењају: постају мало више елипсоидне и пречник им се незнатно повећава (11 x 13 μm). Свака спорулисана ооциста садржи две елипсоидне спороцисте димензија 6 x 8 μm , унутар чије двослојне опне се налазе по четири полумесечаста спорозоиота, димензија 2 x 6-8 μm (Слика 1Е) (Frenkel и сар., 1970; Sheffield & Melton 1970; Dubey et al. 1998). Структура спорозоиота је веома слична структури тахизоита, осим што му је једро смештено субтерминално и садржи већу количину микронема, роптрија и амилопектинских гранула (Табела 2).

Спорулацијом ооцисте постају далеко отпорније на услове спољашње средине. Док неспорулисане ооцисте на 37°C угињавају за 24h, спорулисане ооцисте могу да преживе и до 306 дана на истој температури, односно 9 дана на 40°C (Yilmaz и Hopkins, 1972; Lindsay и сар., 2002). Слично томе, у студији коју су спровели Frenkel и Dubey (1973), температура од -21°C је убијала неспорулисане ооцисте за 1-7 дана, док су спорулисане ооцисте успешно преживљавале свих 28 дана експеримента. У оптималним условима спољашње средине (висока влага и умерена температура) спорулисане ооцисте у земљишту могу преживети најмање 18 месеци (Frenkel и сар., 1975), док исушивање и високе температуре вишеструко скраћују период њихове вијабилности (Yilmaz и Hopkins, 1972; Dubey, 1998b).

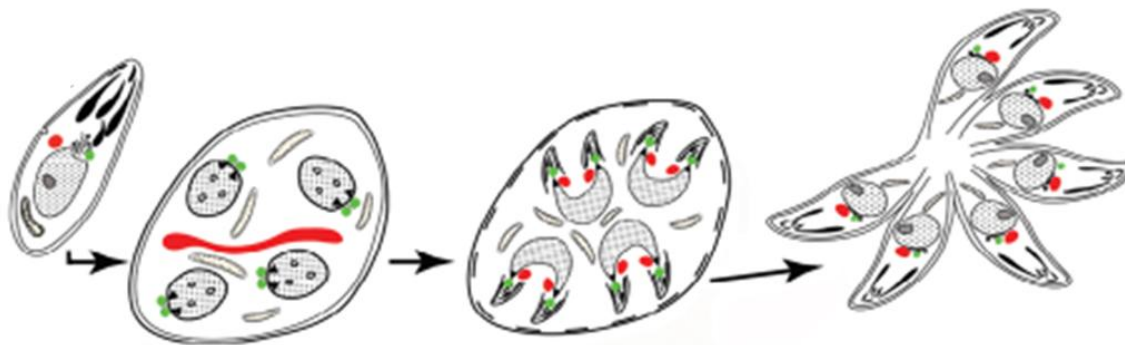
2.3. Животни циклус *T. gondii*

Специфичност животног циклуса *T. gondii* огледа се у томе што се у различитим биотиповима одвијају различити циклуси размножавања (Ђурковић-Ђаковић, 1998). Асексуално размножавање се одвија и у прелазним и у дефинитивним домаћинима, док се сексуални, ентероепителијални циклус, одвија искључиво у танким цревима дефинитивног домаћина и резултира формирањем ооциста (Слика 6). Врсте из породице мачака (*Felidae*) су једини дефинитивни домаћин *T. gondii*, док су бројне топлокрвне животиње, укључујући човека, као и неке хладнокрвне врсте (Dubey, 2008; Nasiri и сар., 2016), идентификоване као прелазни домаћини. Овако велики број прелазних домаћина између којих *T. gondii* може циркулисати и без неопходности присуства дефинитивног домаћина (тј. без одвијања сексуалног циклуса), представља један од разлога широке распрострањености овог паразита у природи (Gilot-Fromont и сар., 2012).



Слика 6. Животни циклус и трансмисија *T. gondii*

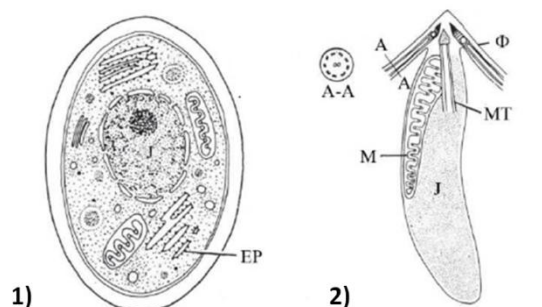
Када мачка поједе зараженог домаћина, у њеном желуцу и цревима се, под дејством протеолитичких ензима, из унетих ткива ослобађају цисте *T. gondii*. Ензими затим разлажу зид цисте и из ње се ослобађају брадизоити који пенетрирају у епителијалне ћелије танког црева, најчешће илеума (Hutchison и сар., 1971). Део брадизоита се у ламини проприји (*lamina propria*) трансформише у тахизоите, умножава и лимфохематогеним путем доспева у екстра-интестинална ткива (укључујући и гравидни утерус), као што се то дешава у прелазним домаћинима. Преостали брадизоити ће у ентероцитима дати асексуалне стадијуме (шизонте који садрже мерозоите), који су, у случају токсоплазме, обележени као типови А-Е уместо као генерације, зато што постоји неколико генерација унутар сваког типа (Dubey и Frenkel, 1972). Паразити се унутар ентероцита умножавају ендополигенијом (Слика 7), а као резултат сваке деобе формира се између 8 и 30 нових мерозоита, способних да уђу у нове ентероците и прођу кроз нови циклус асексуалног размножавања или да се диференцирају у микро- и макрогаметоците (Ferguson, 2009).



Слика 7. Шематски приказ процеса ендополигеније код *T. gondii* (Ferguson, 2009). Ендополигенија *T. gondii* се од класичне шизогоније разликује по томе што састављање компоненти ћерки ћелија претходи деоби једра (Hu и сар., 2002) а мерозоити се формирају у унутрашњости шизонта, уместо да, незрели, проминарају са његове површине (Dubey и сар., 1998).

Ендодиогенијом ће се унутар сваког микрогаметоцита (мушки гаметоцит) развити 16-30 микрогамета, који по изласку из мајке ћелије имају издужен облик и две флагеле (Слика 8). Насупрот томе, један макрогаметоцит ће дати само један макрогамет. Након сазревања, микрогамети помоћу флагела стижу до макрогамета, улазе у њега и оплоде га. Од оплођеног макрогамета настаје зигот, око кога се формира зид, дајући (неспорулсану) ооцисту. Ооцисте у лумен црева доспевају прскањем зараженог ентероцита и одатле се, заједно са фецесом, избацују у спољашњу средину где спорулишу. У једној студији,

експериментално инфициране мачке су, у само једном дану, фецесом излучивале и до 360 милиона ооциста (Dubey, 2002).



Слика 8. Шематски приказ грађе 1) макрогамета и 2) микрогамета.

А-А - попречни пресек флагелума; Ф - флагелум; МТ - микротубуле; М - митохондрија; Ј - једро; ЕР - ендоплазматични ретикулум (Dubey, 2002)

Спорулација истовремено избачених ооциста одвија се асинхроно. У просеку траје 1-5 дана, али је неповољни услови у погледу кисеоника, топлоте и влаге могу значајно продужити, док је температуре испод 4°C и изнад 37°C потпуно заустављају (Dubey и сар., 1970; Lindsay и сар., 2002). У току спорулације, једро зигота се подели два пута, дајући четири нова једра, која ће се распоредити у по два споробласта. Издуживањем споробласта формирају се спороцисте, унутар којих ће се затим, ендодиогенијом формирати четири спорозои (Ferguson и сар., 1979; Dubey, 2009б).

Препатентни период се разликује у зависности од унетог инфективног облика и износи 3 до 10 дана након ингестије ткивне цисте, односно 18 и више дана након ингестије ооцисте и тахизоита (Dubey и Frenkel, 1976; Dubey, 1996). На дужину препатентног периода и број излучених ооциста могу утицати и сој *T. gondii* којом је мачка инфицирана, као и узраст саме животиње (Van Wormer и сар., 2013). Излучивање ооциста траје око две недеље, након чега јак имунски одговор, који се у међувремену развио, зауставља развој гаметоцита и продукцију ооциста (Dubey и Frenkel, 1976). Овај имунитет, међутим, није доживотан и могуће је да ће, услед поновљене инфекције, имunosупресије изазване кортикостероидном терапијом или коинфекције са *Isospora felis*, мачка поново излучивати ооцисте (Dubey и сар., 1970; Dubey, 1995; Van Wormer и сар., 2013). Према неким проценама, у сваком тренутку око 1% укупне популације мачака излучује ооцисте (Hill и Dubey, 2002).

Циклус који у организму мачке покрећу тахизоити и ооцисте нису потпуно разјашњени. Разлика у дужини препатентног периода, навела је научнике на закључак да тахизоити и ооцисте, за разлику од брадизоита, немају способност да директно покрену ентероепителијалну фазу циклуса (Dubey и Frenkel, 1976). Стога се претпоставља да, након ингестије ооциста и тахизоита, прво долази до трансформације у тахизоите, који затим одлазе у различита ткива мачке где се током друге недеље од инфекције формирају брадизоити и ткивне цисте. Брадизоити се након одређеног временског периода ослобађају из ткивне цисте, изазивају паразитемију и враћају у танко црево где започињу ентероепителијалну фазу циклуса (Dubey и Frenkel, 1976; Freyre и сар., 1989; Dubey, 2002).

У поређењу са мачкама, прелазни домаћини су далеко осетљивији на инфекцију ооцистама. Када прелазни домаћин у свој дигестивни тракт унесе спорулисане ооцисте *T. gondii*, долази до ексцистације спороциста које, под дејством жучних соли и трипсина нагло пуцају ослобађајући спорозоите. Спорозоити се, затим, у ћелијама ламине проприје трансформишу у тахизоите, који инвадирају ентероците из којих, путем лимфе и крви, даље бивају дисеминовани по читавом организму. У случајевима експериментално инфицираних мишева, тахизоити су се већ трећег дана од инфекције могли детектовати у различитим екстраинтестиналним органима, у којима су се затим трансформисали у брадизоите и формирали ткивне цисте (Dubey, 1998a).

Циклус који у прелазном домаћину покрећу брадизоити сличан је оном изазваном ооцистама (Dubey, 1998a).

2.4. Трансмисија

Упркос разноврсности прелазних домаћина у којима *T. gondii* данас паразитира, и њеном комплексном животном циклусу, сматра се да је ова кокцидија првобитно имала класичан феко-орални циклус развоја, који је почињао и завршавао се у мачки, а да се временом адаптирала на нове домаћине и видове трансмисије (Frenkel и сар., 1970; Dubey и Su, 2009).

Данас су позната три главна пута трансмисије токсоплазме међу домаћинима: трансплацентни пут (тахизоити), конзумација сировог или термички недовољно обрађеног (ТНО) меса инфицираних животиња (ткивне цисте) и феко-орални пут (ооцисте).

Током трансплацентног преноса, тахизоити најпре инвадирају плаценту, у којој изазивају запаљенске и некротичне процесе, након чега инфицирају и сам фетус (Buxton,

1990; Hill и Dubey, 2002). Овај вид трансмисије се најчешће јавља као последица примарне инфекције мајке у току гравидитета (Remington и сар., 2011). Код мачака, посебан значај конгениталне инфекције лежи у способности овако инфицираних мачића да излучују ооците (Hill и Dubey, 2002) које, затим, постају потенцијални извор инфекције за друге домаћине.

Након избацавања у спољашњу средину, ооците у фецесу/земљишту могу остати инфективне ≥ 18 месеци (Frenkel и сар., 1975), док је у сланој и слаткој води, на температури фрижидера, доказано њихово преживљавање и до две, односно четири и по године (Dubey, 1998б; Lindsay и Dubey, 2009). Са примарног места контаминације, ооците се лако преносе на веће удаљености посредством механичких вектора као што су инсекти (муве, бубашвабе, балегари) (Wallace, 1971; Wallace, 1972; Graczyk и сар., 2005) пужеви, глисте (Frenkel и сар., 1975) или пси (Lindsay и сар., 1997; Frenkel и Parker, 1996; Etheredge и сар., 2004), али и обућом, ветром, аеросолом (Sacks и сар., 1982; Hill и Dubey, 2002) и атмосферским водама (Simon и сар., 2013). У воденим срединама, љускари играју значајну улогу у акумулацији и транспорту ооциста (Arkush и сар., 2003; Lindsay и сар., 2004; Miller и сар., 2008; Jones и Dubey, 2010). Транспортни домаћини истовремено могу бити извор инфекције (ооцистама) домаћина који се њима хране (Wallace, 1972; Teutsch и сар., 1979; Jones и Dubey, 2010).

Уз ингестију ооциста, конзумација сировог и термички недовољно обрађеног меса данас се сматра доминантним путем трансмисије *T. gondii* у природи. Кључ ефикасности овог вида трансмисије лежи у способности токсоплазме да: а) инфицира широку палету домаћина, б) у инфицираном домаћину остане вијабилна годинама и в) након ингестије преживи излагање дигестивним ензимима и настави свој циклус у новом домаћину (Weinman и Chandler, 1954; Jacobs и сар., 1960).

Поред главних, трансмисија је могућа и путем трансфузије и трансплантације (Hill и Dubey, 2002; Derouin и Pelloux, 2008; Foroutan-Rad и сар., 2016), а описана је и инфекција конзумацијом непастеризованог козијег млека (Riemann и сар., 1975; Sacks и сар., 1982; Walsh и сар., 1999), као и акциденталне инфекције (Dias и сар., 2005; Tenter, 2009). Такође, резултати експерименталних студија изведених на псима, овцама и козама, сугеришу да је код ових врста пренос токсоплазме могућ и сексуалним путем (Santana и сар., 2013; Arantes и сар., 2009; Lopes и сар., 2013). Међутим, како се ефикасност ових

путева трансмисије сматра ограниченом, а услови за њихову реализацију стичу само повремено, они нису значајни са епидемиолошког становишта (Tenter, 2009).

2.5. Иmunски одговор домаћина

Главну улогу у одбрани домаћина од *T. gondii* имају целуларни имунски одговор, и то Th1 типа, а главни ефекторни молекул је IFN- γ (Suzuki и сар., 1988).

На самом почетку инфекције, за продукцију IFN- γ су задужене тзв. ћелије природне убице (*natural killer*, NK), да би након презентације антигена Т-лимфоцитима и стварања антиген-специфичних CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита, они постали главни извор IFN- γ . IFN- γ , заједно са TNF α , који луче макрофази, доводи до класичне активације макрофага, уз појачану експресију MHC II молекула. Активирани макрофази затим фагоцитију паразите са којима дођу у контакт (Dupont и сар., 2012) и, истовремено, излучују цитокине (IL-12 и IL-18) којима стимулишу даљу продукцију IFN- γ (Maenz и сар., 2014). IFN- γ контролише још низ ефекторских механизма, као што су ускраћивање гвожђа и триптофана паразиту и активација GTP-аза, за које се сматра да посредују у оштећењу паразитофорусне вакуоле (Miller и сар., 2009).

Важну заштитну улогу у току токсоплазматске инфекције имају и интраепителијални цитотоксични лимфоцити који, поред тога што убијају ентероците заражене токсоплазмом, штите домаћина од колатералног оштећења ткива које настаје као последица прејакe инфламаторне реакције, а које представља основу патогенезе код очне токсоплазмозе и токсоплазматских енцефалитиса (Tait и Hunter, 2009; Maenz и сар., 2014).

У одбрани од токсоплазматске инфекције учествује и хуморални имунитет, с тим да је његова улога најизраженија у акутној фази инфекције и након реактивације хроничне болести, када се паразити могу наћи ван ћелија (Schlüter и сар., 2014).

У организму домаћина се по акутној фази инфекције, успоставља фина равнотежа између имунског одговора, који покушава да елиминише паразит, и стратегије избегавања и модулације тог одговора од стране паразита, која резултира асимптоматским, хроничним, перзистирањем паразита у инфицираном домаћину. Ако се ова равнотежа поремети услед нарушавања имунске компетентности домаћина, може доћи до реактивације инфекције, која у одсуству терапије, брзо доводи до озбиљне болести (Pereira и сар., 2010; Moncada и Montoya, 2012).

2.6. Генетска разноврсност популације *T. gondii*

У Европи и Северној Америци, популациона структура *T. gondii* је претежно клонска, са израженом доминацијом типова I, II и III (Howe и Sibley, 1995), с тим да је у Северној Америци, углавном код дивљих животиња, недавно описан и четврти клонски тип (назван још и тип 12) (Khan и сар., 2011). У досадашњим студијама, код људи је у већини случајева изолован тип II, док је у животињском материјалу, поред типа II, уобичајена и изолација типа III. Разлози ових разилажења нису сасвим јасни, али би се могли односити на разлике у пријемчивости људи и животиња према различитим генотиповима паразита. С друге стране, с обзиром на то да је већина испитаних хуманих изолата потицала од оболелих особа, а већина животињских изолата из асимптоматских јединки, разлике у заступљености генотипова могу бити последица и разлика у њиховом потенцијалу да изазову болест код људи (Sibley и сар., 2009).

Ограничени подаци о генотиповима *T. gondii* који циркулишу у Југоисточној Европи, укључујући и Србију, говоре о доминацији типа II (Štajner и сар., 2013). Са изузетком једног изолата који је идентификован као могући тип I, и једног атипичног соја, сви хумани изолати, добијени на територији Србије, припадали су генотипу II (Djurković-Djaković и сар., 2006; Вујанић, 2012; Štajner и сар., 2013). Када су у питању животиње, генотипизација је успешно урађена за изолате из голубова, оваца и коња; од три голубија изолата, два су идентификована као тип II а један као тип III (Marković и сар., 2014), овчији је идентификован као тип II, док су оба изолата добијена из коња била тип III (Klun и сар., 2017).

С друге стране, у Африци, Азији и Јужној Америци је уочен знатно богатији генетски диверзитет изолованих сојева, који се због одступања од три основна типа често називају „егзотичним“, „атипичним“, а могу бити и рекомбинантни (Dardé, 2008). Већа заступљеност рекомбинантних и атипичних сојева примећена је у дивљини која се карактерише већим биодиверзитетом, укључујући и врста из породице мачака, чиме се стичу услови за чешће сексуално размножавање *T. gondii*, а тиме и чешће и разноврсније рекомбинације (Ajzenberg и сар., 2004; Dardé и сар., 2014).

Практичан значај клонске популационе структуре јесте могућност повезивања генетских карактеристика паразита са његовим биолошким особинама, као што је нпр. вируленција. Тако се, у случају *T. gondii*, генотип I показао високо вирулентним за мишеве

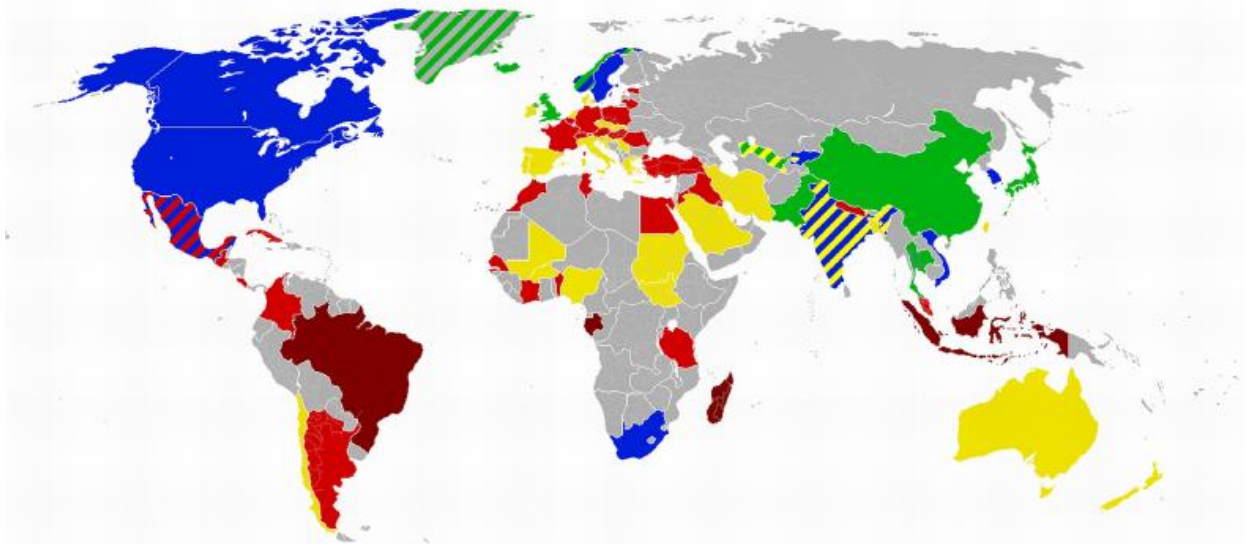
(брзо угинуће мишева након инокулације малих доза; $LD_{100} \sim 1$ паразит) док су тип II ($LD_{50} \sim 10^3$ паразита) и тип III ($LD_{50} \sim 10^4$ паразита) далеко мање вирулентни (Dardé, 2008; Blader и Saeij, 2009; Sullivan и Jeffers, 2012). Висока вируленција се у овом случају везује за способност брже миграције и проласка кроз ћелијске баријере, већу брзину раста и мањи степен конверзије из тахизоита у брадизоите, у односу на ниско вирулентне тј. авирулентне сојеве (Barragan и Sibley, 2003; Blader и Saeij, 2009; Dardé и сар., 2014). Испитивање везе између генотипа *T. gondii* и појединих клиничких ентитета хумане токсоплазмозе у фокусу је текућих истраживања из ове области.

2.7. Токсоплазмоза човека

Још је 1923. године чехословачки офталмолог Josef Janku (1886-1963) патохистолошким прегледом очију једанаестомесечног дечака утврдио присуство токсоплазми сличних паразитских форми, које је описао као спорозоите (Morissette и Ајиока, 2009). Међутим, Abner Wolf и сар. (Wolf и Cowen, 1937; Wolf и сар., 1939) били су први који су токсоплазму успешно изоловали из узорка хуманог порекла (патолошки промењеног нервног ткива једномесечне девојчице преминуле од енцефаломијелитиса), чиме су указали на значај токсоплазме као хуманог патогена, као и на могућност њене конгениталне трансмисије. Након овог открића, уследиле су бројне студије које су токсоплазму повезале са запаљенским обољењима ока, лимфоидног и других ткива одраслих особа (Pinkerton и Henderson, 1941; Beverley и Beattie, 1958; Juurikkala, 1961; Benenson и сар., 1982).

2.7.1 Епидемиологија

Данас се сматра да је токсоплазмом инфицирана најмање трећина светске хумане популације (McLeod и сар., 2013), при чему постојећи подаци о серопреваленци значајно варирају између континената, држава (Слика 9), па и унутар саме државе и између појединих заједница. Наведене варијације су последица разлика у климатским, економским, културолошким и социолошким факторима којима су поједине популације изложене, при чему је део ових фактора истовремено тесно повезан са избором и начином припреме хране (Robert-Gangneux и Darde, 2012).



Слика 9. Серопреваленца *T. gondii* у хуманој популацији, приказана на глобалном нивоу. Тамно црвена боја указује на серопреваленцу преко 60%, светло црвена 40–60%, жута 20–40%, плава 10–20%, док су зеленом бојом означене државе са серопреваленцом нижом од 10%. Земље за које нема објављених података обележене су сивим пољима. Пругаста поља указују на изражене регионалне разлике у преваленци. (Maenz и сар., 2014).

У развијеним државама широм света, укључујући и Европу, последњих деценија је примећен генерални пад преваленце токсоплазма-специфичних антитела у хуманој популацији (Diza и сар., 2005; Jones и сар., 2007; Robert-Gangneux и Darde, 2012; Mosti и сар., 2013) и Србија у том погледу не представља изузетак. Са 86% колико је утврђено 1988. године (Bobić и сар., 1998), серопреваленца *T.gondii* код људи у Србији спустила се на 39% у 1997. години (Бобић и сар., 2003) и стабилизовала се на око 33% (27%-38%) током последњих 15 година (Bobić и сар., 2007; Бркић и сар., 2010; Jerant Patiћ и сар., 2013; Jovanović-Galović и сар., 2014).

2.7.2 Клиничке карактеристике хумане инфекције са *T. gondii*

У поређењу са учесталошћу инфекције, клинички видљиви случајеви токсоплазмозе су релативно ретки и најчешће се срећу код имунокомпромитованих или конгенитално инфицираних индивидуа. Међутим, упркос ниској инциденци клиничке болести, токсоплазма је због озбиљности последица сврстана у сам врх најзначајнијих алиментарних патогена (Djurković-Djaković и сар., 2013).

У зависности од тога да ли је до инфекције дошло интраутерусно или након рођења, токсоплазмоза може бити конгенитална и стечена.

2.7.2.1 Конгенитална токсоплазмоза

Вероватноћа преношења *T. gondii* са мајке на плод и озбиљност пратећих последица зависи од величине инфективне дозе, имунског статуса мајке и фетуса, и периода гравидитета у ком је до инфекције дошло, а данас је овом низу фактора додат и генотип соја узрочника (Pereira и сар., 2010; Moncada и Montoya, 2012). Учесталост трансмисије расте пропорционално са гестацијском старости, као последица повећања пермеабилности плаценте, док је тежина последица по инфицирани плод обрнуто пропорционална овим параметрима. Тако су последице ране конгениталне инфекције (до 26-те недеље трудноће), готово без изузетка, веома озбиљне и могу се манифестовати у виду абортуса, мртворођености или рођења живог детета, али са тешким оштећењима. Класични тријас чине хориоретинитис, хидроцефалус и развој калцификата у можданом ткиву (Sabin, 1941), али се они данас ретко срећу. С друге стране, конгенитална инфекција настала током последњег триместра трудноће обично је праћена благом клиничком сликом, често чак асимптоматска, при чему се видљиви симптоми могу јавити касније у животу детета, најчешће у виду хориоретинитиса, али и различитих нервних сметњи (Saari и Raisanen, 1974; Remington и сар., 2011; Moncada и Montoya, 2012).

Конгенитална токсоплазмоза је клинички најзначајнија последица хумане инфекције са *T. gondii* (Djurković-Djaković, 2010), због које је ова протозоа на глобалном нивоу и сврстана на високо четврто место (а у Европи чак на друго) међу свим паразитима који се преносе храном (FAO/WHO, 2014).

2.7.2.2 Стечена токсоплазмоза

Инфекција код имунокомпетентних особа најчешће пролази асимптоматски, док се болест манифестује у свега 10% до 20% случајева (Weiss и Dubey, 2009), и то у виду благих симптома (лимфаденопатија, мијалгија, главобоља, грозница), повремено праћених кожним осипом, хепато– и спленомегалијом (Weiss и Dubey, 2009; Pereira и сар., 2010), који пролазе спонтано и без компликација. Међутим, код мањег броја индивидуа, инфекција се може искомпликовати у виду хориоретинитиса (Choi и сар., 1997), полимиозитиса (Lindsay и сар., 1995), миокардитиса (Bousquet и сар., 2016), хепатитиса, енцефалитиса (Ramachandran и сар., 2014), пнеумонитиса (Pinkerton и Henderson, 1941), па чак и потенцијално фаталне дисеминоване форме болести (атипични сојеви) (Demar и

сар., 2007; Darde и сар., 2014). Посебно значајна последица стечене (и конгениталне) инфекције је очна токсоплазмоза, која је дуги низ година готово искључиво везивана за случајеве конгениталне инфекције, а коју новија истраживања у до 50% случајева препознају управо као последицу постнаталне инфекције (Gilbert и Stanford, 2000; Su и сар., 2014). Очна токсоплазмоза је најчешћи инфективни узрок задњег увеитиса (Maenz и сар., 2014), што је показано и истраживањима спроведеним у Србији (Djurković-Djaković и сар., 2010; Kovačević-Pavićević и сар., 2012). Посебно тешки облици и висока учесталост очне токсоплазмозе забележени су тропским подручјима (Јужна Америка и Африка), у поређењу са подручјима умереног климата (Европа и Северна Америка), што би се првенствено могло објаснити високом вируленцијом „тропских“ сојева (Boyer и сар., 2011).

Осим тога, последњих година је дошло до експанзије студија које сугеришу повезаност латентне токсоплазмозе са аутоимуни болестима (Fischer и сар., 2013), као и са низом неуролошких и психијатријских поремећаја (Zhu, 2009), као што су шизофренија (Torrey и сар., 2012; Flegr, 2013), депресија и склоност ка самоповређивању (Grog и сар., 2011; Pedersen и сар., 2012), опсесивно-компулзивно понашање (Miman и сар., 2010) и различити поремећаји психомоторног развоја (Ferreira и сар., 2013).

Код имунокомпромитованих особа [особа инфицираних вирусом хумане имунодефицијенције (HIV), трансплантираних и других пацијената третираних лековима са имуносупресивним дејством] токсоплазмоза се најчешће јавља као последица реактивације латентне инфекције и манифестује се у виду енцефалитиса, пнеумонитиса и миокардитиса, са потенцијално смртним исходом (Djurković-Djaković и сар., 1997; Weiss и Dubey, 2009). Другу критичну групу, са аспекта стечене токсоплазмозе, представљају труднице, код којих инфекција најчешће пролази асимптоматски али представља озбиљан ризик за инфекцију плода.

На исход стечене токсоплазмозе, као и у случају конгениталне инфекције, значајно утиче сој паразита, па су посебно тешке форме болести описане код инфекције изазване атипичним или рекомбинантним сојевима (Dardé, 2008), како код имунокомпетентних (Carne и сар., 2002; Demar и сар., 2007; Sobanski и сар., 2013), тако и код имунокомпромитованих особа (Štajner и сар., 2013). Други фактор, који у значајној мери

одређује клинички ток болести јесте пут инфекције, односно врста унетог инфективног облика *T. gondii*.

2.7.3 Пuteви хумане инфекције са *T. gondii*

Са епидемиолошког становишта, хоризонтални путеви ширења инфекције се сматрају значајнијим од вертикалног, а доминантни су ингестија спорулисаних ооциста и конзумација (ТНО) меса инфицираних животиња.

2.7.3.1 Инфекција људи ооцистама *T. gondii*

У организам човека ооцисте могу да доспеју ингестијом, најчешће преко контаминираних хране и воде, али и услед неадекватне хигијене руку након контакта са контаминираним земљом, или чак инхалацијом контаминираних прашина (Akstein и сар., 1982; Tenter и сар., 2000).

У односу на инфекције изазване ткивним цистама, инфекција ооцистама се код људи клинички чешће манифестује (већи број оболелих у епидемијама) (Van Wormer и сар., 2013), и генерално изазива тежу форму болести (Hill и Dubey, 2002). Уз то, новије сероепидемиолошке студије, засноване на детекцији антитела специфичних за антиген спорозита *T. gondii*, указују да је инфекција ооцистама далеко чешћа него што се до сада мислило (Munoz-Zanzi и сар., 2010). У популацијама са ниским животним стандардом, лошим социо-економским и хигијенским условима и великом густини популације мачака, ингестија ооциста чак може представљати доминантан пут инфекције људи (Hill и Dubey, 2002; Woуer и сар., 2011).

Неке од највећих забележених епидемија токсоплазмозе се повезују са конзумацијом градске (Pereira и сар., 2010; Baldursson и Karanis, 2011) и текуће воде (Benenson и сар., 1982) контаминираних ооцистама, а у САД је недавно и конзумирање сирових острига, ракова и шкољки идентификовано као фактор ризика од инфекције токсоплазмом (Simon и сар., 2013). У литератури су описани и случајеви инфекције услед конзумације лиснатог поврћа, контаминираних ооцистама (Ekman и сар., 2012), као и велики број случајева код којих тачан извор инфекције није могао бити утврђен (Doganci и сар., 2006; Demar и сар., 2007).

2.7.3.2 Инфекција људи ткивним цистама *T. gondii*

Значај ТНО меса као извора инфекције са *T. gondii*, варира између различитих популација у зависности од културелних карактеристика популације и социо-економске ситуације којој је изложена, као и узраста и разлика у животном стилу појединаца унутар те популације.

У једној мултицентричној европској студији показано је да је месо вероватан извор инфекције у 30% до 60% случајева акутно инфицираних трудница (Cook и сар., 2000). До сличних података су дошле и неке друге европске студије (Buffolano и сар., 1996; Каррегуд и сар., 1996), укључујући и оне спроведене на територији Србије (Бобић и сар., 2003; Вобић и сар., 2007), као и студије спроведене у САД (Jones и сар., 2009).

Случајеви хумане токсоплазмозе су описани након конзумације ТНО јагњетине и овчетине (Kean и сар., 1969; Fertig и сар., 1977; Masur и сар., 1978; Pereira и сар., 2010), сирове свињетине, свињских изнутрица и сухомеснатих производа од свињског меса (Choi и сар., 1997; Pereira и сар., 2010), говеђег ТНО меса (Kean и сар., 1969), сировог коњског меса (Kean и сар., 1969; Pomares и сар., 2011), меса јелена (Sacks и сар., 1983), меса кенгура (Pereira и сар., 2010), сушеног меса и јетре фоке, као и сировог меса карибуа (Mcdonald и сар., 1990).

Вијабилна *T. gondii* је изолована како из свежег меса, тако и из сушених и ферментисаних месних производа, готових јела од меса (Warnekuksuriya и сар., 1998; Abd El-Razik и сар., 2014), па чак и меса које је било декларисано као „смрзнуто“ (Gensaу и сар., 2013).

2.7.4 Дијагноза

Због неспецифичности клиничке слике, дијагностика хумане токсоплазмозе се у највећој мери ослања на резултате лабораторијских испитивања. Инфекцију је могуће доказати индиректно, помоћу серолошких тестова којима се процењује ниво хуморалног имунског одговора (специфичних антитела) и директно, доказивањем присуства паразита у болесничком материјалу помоћу молекуларних метода, биолошког огледа и, ређе, хистолошких и цитолошких метода (Pereira и сар., 2010; Moncada и Montoya, 2012).

Директне методе су посебно корисне у дијагностици акутне инфекције, када су у телесним течностима присутни тахизоити, и значајне су првенствено у дијагностици

феталне инфекције. У већини других случајева, серолошки тестови представљају примарну методу дијагностике, а значајним за дијагностику се сматра налаз специфичних IgG, IgM и, донекле, IgA антитела (Ђурковић-Ђакović, 2004; Sepúlveda-Arias и сар., 2014).

Код имунокомпетентних особа, дијагноза се поставља налазом сероконверзије или четвороструким порастом нивоа специфичних IgG антитела у парном узорку крви. Ближе време настанка инфекције могуће је одредити тестовима за утврђивање авидитета специфичних IgG антитела, јер висок авидитет искључује инфекцију у претходна четири месеца (Hedman и сар., 1989; Bobić и сар., 2009). Налаз специфичних IgM антитела, без присуства IgG антитела, може да значи сам почетак акутне инфекције, уз напомену да овакав налаз може да означава и тзв. „природна“ антитела. Такође, анализу налаза специфичних IgM антитела компликује и чињеница да код неких особа низак титар IgM антитела може перзистирати и дуже од годину дана (Bobić и сар., 1991), као и да данашње генерације осетљивих тестова детектују и тзв. резидуална IgM антитела.

Код имунокомпромитованих пацијената, серолошки тестови су од малог значаја, а директно доказивање паразита често није могуће због недостатка репрезентативног узорка, односно велике инвазивности метода за његово добијање (Ђурковић-Ђакović, 2004). Због тога се, на пример, приликом сумње на токсоплазматски енцефалитис код HIV позитивних болесника, дијагноза често поставља и само на основу клиничких критеријума, тј. на основу клиничке слике фокусне церебралне лезије, уз карактеристичан неурорадиографски налаз и добар терапијски одговор (Ђурковић-Ђакović, 1998).

Код трудница је правилно датирање примарне инфекције од кључног значаја због процене ризика за плод.. У случају доказане акутне инфекције труднице неопходно је одмах започети са терапијом и, истовремено, покушати са дијагностиком инфекције код плода. Данас је метода избора за пренаталну дијагностику детекција паразитске ДНК неком од метода заснованим на ланчаној реакцији полимеразе у узорку плодове воде добијеном између 16. и 18. недеље трудноће. У дијагностици инфекције код новорођенчади, налаз специфичних IgM и IgA антитела у првим месецима живота представља маркер интраутерусне инфекције, док налаз IgG антитела углавном нема дијагностички значај, јер се пасивно трансмитована мајчина IgG антитела не могу разлучити од сопствених, насталих у одговор на антигени стимулус (Ђурковић-Ђакović, 2004).

2.7.5 Терапија

У случају асимптоматске форме болести или благе клиничке слике код имунокомпетентних пацијената, терапија се генерално не препоручује. Међутим, у случају тешке клиничке слике код имунокомпетентних особа, активне инфекције код имунокомпромитованих пацијената, као и код конгенитално инфициране новорођенчади и токсоплазмом изазваног хориоретинитиса, терапија је неопходна. Већ деценијама су главни лекови у терапији различитих клиничких ентитета изазваних *T. gondii*, комбинација пириметаминa и сулфадиазина, уз додатак фолинске киселине као протектанта коштане сржи (McCabe и Oster, 1989; Liesenfeld и Remington, 2001) од штетног, супресивног, дејства пириметаминa. Код трудница се у случају потврђене или високо суспектне акутне инфекције (тј. настале током или непосредно пре трудноће) ординира спирамицин у циљу спречавања преноса инфекције на плод. Ако се затим, применом пренаталне дијагностике, инфекција потврди и код плода, прелази се на специфичну антитоксоплазматску терапију пириметамином и сулфадиазином. У супротном, терапија спирамицином се наставља до краја трудноће. (Hill and Dubey, 2002; McLeod et al., 2013; Pereira et al., 2010).

У случају очне токсоплазмозе, уз комбинацију пириметаминa и сулфадиазина, ефикасном се показала и примена клиндамицина, који се може локална, интравитреална апликовати и интравитреално (Maenz и сар., 2014).

Међутим, сви тренутно расположиви терапеутици, уз изузетак атоваквона, деле исто ограничење – ефикасни су само против тахизоита, тј. активне токсоплазмозе, и не пружају могућност елиминације паразита из организма домаћина (Hill и Dubey, 2002; McLeod и сар., 2013). Ово представља посебан проблем за имунокомпромитоване пацијенте код којих би, због опасности од реактивације циста, за ефикасну контролу инфекције била неопходна доживотна примена терапије што, због бројних нежељених ефеката расположивих терапеутика често није могуће (Ђурковић-Ђаковић, 2004). Проблем би у будућности потенцијално могао бити решен увођењем нових терапеутика или комбинацијом постојећих, међу којима се тренутно издваја комбинација атоваквона и клиндамицина (Ђурковић-Ђаковић и сар., 2003).

2.7.6 Превенција хумане инфекције са *T. gondii*

Едукација људи у погледу могућих путева инфекције са *T. gondii* и мера њене превенције, најважнији је корак у правцу спречавања настанка хумане токсоплазмозе (Jones и Dubey, 2012). У ланцу меса, на нивоу потрошача, препоруке првенствено подразумевају адекватну термичку обраду меса ($\geq 67^{\circ}\text{C}$ у средини меса) пре конзумације, при чему припрему у микроталасним пећницама треба избегавати (Lunden и Uggla, 1992). Такође се не препоручује конзумација термички необрађеног: козијег млека, шкољки, острига и ракова, као ни пиће нетретиране воде из слободних водотокова (Jones и Dubey, 2012). Трудницама и имунокомпромитованим особама се не препоручује конзумација сухомеснатих производа (Buffolano и сар., 1996; Bobić и сар., 1998; Warnekulasuriya и сар., 1998). Смрзавање ($\leq -12^{\circ}\text{C}$) се препоручује искључиво у комбинацији са другим третманима меса, као што су кување и сољење (EFSA, 2007; Petersen и сар., 2010). Усвајање праксе добре хигијене, као што је прање руку и посуђа топлом водом и сапуницом након контакта са сировим месом и поврћем, употреба рукавица при раду са земљом и темељно прање или љуштење поврћа и воћа, од кључног су значаја, када је превенција ингестије ооциста у питању (Jones и Dubey, 2012). Потапање сировог воћа и поврћа у воду загрејану на 65°C или у раствор винског сирћета загрејаног на 45°C , 1 min пре конзумације, такође ефикасно инактивишу ооцисте *T. gondii* (El-Tras и сар., 2012). Власницима мачака се препоручује свакодневно мењање посипа, уз обавезну употребу заштитних рукавица (труднице и имунокомпромитоване особе би требале потпуно да избегавају ове послове), а храњењем мачака искључиво термички обрађеном храном, смањује се вероватноћа од инфекције мачке токсоплазмом, а тиме и вероватноћа излучивања ооциста (Jones и Dubey, 2012). Покривањем пескарника, у периодима када их деца не користе за игру, може се смањити њихова контаминација ооцистама (Lass и сар., 2009; Torrey и Yolken, 2013).

Уколико је до инфекције труднице ипак дошло, правовремена дијагноза представља најважнију меру превенције инфекције плода. Међутим, програми систематског пренаталног скрининга трудница на инфекцију *T. gondii* постоје само у малом броју европских земаља, као што су Француска, Аустрија, Белгија, Норвешка и део Италије (Štajner и сар., 2016).

2.8. Токсоплазмоза животиња

Код већине животиња, инфекција одраслих јединки са *T. gondii* најчешће пролази без видљиве клиничке слике, уз изузетак појединих врста, као што су неки примати и аустралијски торбари, арктичка лисица, европски смеђи зец и евроазијска црвена веверица, код којих болест често поприма озбиљну форму, праћену угинућем (Hill и сар., 2005; Jokelainen, 2012; Hillman и сар., 2016)

Када су производне животиње у питању, значајнији губици су присутни само код оваца и коза, код којих се токсоплазма сматра једним од најчешћих узрока побачаја и конгениталних малформација. Код других врста, као што су говеда, коњи, свиње и живина, инфекција углавном пролази асимптоматски, али цисте које се формирају у њиховим ткивима зато представљају потенцијални извор инфекције за људе који буду конзумирали месо ових животиња.

2.8.1 Токсоплазмоза свиња

2.8.1.1 Епизоотиологија

Иако је од првог забележеног случаја токсоплазмозе свиња прошло више од шездесет година (Work, 1967), о њеној епизоотиологији се још увек релативно мало зна. Претпоставља се да се већина свиња инфицира постнатално и да ингестија ооциста представља главни пут инфекције (Dubey, 1986). Други извори инфекције свиња могу бити латентно инфицирани глодари (Damriyasa и сар., 2004; Dubey, 1986; Lubroth и сар., 1983; Smith и сар., 1992; Weigel и сар., 1995), ТНО остатаци људских obroка (Dubey и сар., 2002), као и друге свиње, у случајевима канибализма и грижења репова (Dubey, 1986). Осим тога, код свиња је доказана и трансплацентална инфекција са *T. gondii* (Work и сар., 1970; Venturini и сар., 1999), али се сматра да је она присутна у релативно малом броју случајева.

Токсоплазмоза је детектована код свиња широм света, са распоном серопреваленце од 0% до преко 90% (Dubey, 2009a). На територији Европе, серопреваленце забележене у последњих 30 година разликују се између и унутар држава и крећу се од 0% у Холандији (Kijlstra, Eissen и сар., 2004), 0,4 % у Чешкој (Vostalová и сар., 2000) и 0,9% у Аустрији (Edelhofer, 1994) до 28,9 у Србији, 36,4% у Пољској (Bartoszcze и сар., 1991) и 64,4% у Италији (Genchi и сар., 1991). Највеће вредности серопреваленце су детектоване код

одраслих јединки (Edelhofer, 1994; Klun и сар., 2006; Berger-Schoch, Bernet и сар., 2011), достижући, у појединим студијама, чак 100% испитаних животиња (Venturini и сар., 2004). У појединим државама, као што су САД, Бразил, Аустрија и Шведска забележен је током протеклих година котинуирани пад серопреваленце код фармских свиња. Ово се објашњава увођењем интензивних система узгоја и пратећих биосигурносних мера, којима се смањује контакт свиња са потенцијалним изворима инфекције (Edelhofer, 1994; Dubey, Thulliez, Weigel и сар., 1995; Da Silva и сар., 2005; Wallander и сар., 2016). Са друге стране, приступ животиња паши (Wallander и сар., 2016) тј. повећан контакт животиња са околином (у отвореним, полуотвореним и слободним системима држања), лоша зоохигијенска пракса на фарми и присуство глодара и мачака (Weigel и сар., 1995; Venturini и сар., 2004; García-Bocanegra, Simon-Grifé и сар., 2010; Hill и сар., 2010; Ortega-Pacheco и сар., 2011; Schlüter и сар., 2014; Herrero и сар., 2016) се сматрају факторима који доприносе инфицирању свиња са *T. gondii*. Факторима ризика се сматрају и искључиво товни карактер фарми (на супрот оном са заокруженим системом производње, од прасета до товљеника – енгл. “*farrow-to-finish*”) (Klun и сар., 2006; 2011), мали број животиња на фарми (Gamble и сар., 1999; Villari и сар., 2009; Herrero и сар., 2016) контакт са угинулим свињама (Hill и сар., 2010), напајање из бунара (Villari и сар., 2009) и употреба козије сурутке у исхрани (Meerburg и сар., 2006).

2.8.1.2 Клиничка слика

Код одраслих свиња, инфекција са *T. gondii* најчешће протиче субклинички или је праћена благом клиничком сликом, у виду повишене телесне температуре, губитка апетита, апатије и тахипнее (Dubey, 1986). Иако се тешки, чак и смртни, случајеви токсоплазмозе повремено детектују и код одраслих јединки (Sasaki и сар., 1976; Li и сар., 2010; Olinda и сар., 2016), угинућа су, ипак, далеко чешћа код прасади, инфициране интарутерино или након рођења. Код ове категорије, инфекција чешће поприма акутни ток, са симптомима попут диспнеје, цијанозе, грознице, анорексије, опште слабости, поремећаја вида, атаксије, конвулзија, тешке дијареје и/или пнеумоније (Work и сар., 1970; Dubey и сар., 1990; Jungersen и сар., 1999; Thiptara и сар., 2006). Инфекција gravidних крмача, осим рођења инфициране прасади, за последицу може имати и абортус, а у тежим случајевима и смрт саме крмаче (Work и сар., 1970; Kim и сар., 2009; Basso и сар., 2015). Ипак, у поређењу са овцама и козама, абортус се код крмача далеко ређе јавља и већина

интраутерусно инфициране прасади бива ресорбована или мртворођена (Dubey и сар., 1990).

2.8.1.3 Свињско месо као извор инфекције за људе

Свињетина се у многим земљама, укључујући и Србију, сматра врстом меса чија конзумација носи значајан ризик од инфекције људи са *T. gondii* (Dubey, 1986; Klun и сар., 2006; EFSA, 2011; Cademartori и сар., 2014). У Италији (Напуљ) је конзумација сировог свињског меса и сухомеснатих производа идентификована као главни фактор ризика од инфекције трудница токсоплазмом (Buffolano и сар., 1996), док се у Норвешкој свињетина нашла на другом месту, одмах иза овчегине (Karperud и сар., 1996). Студије спроведене у САД су токсоплазму класификовале као трећи најчешћи узрок фаталне алиментарне инфекције људи повезане са ингестијом свињског меса (Hoffmann и сар., 2007). Иако су код свиња у Србији антитела против *T. gondii* пронађена у мањем проценту него код оваца и говеда, свињетина, са друге стране, чини више од 50% укупно конзумираног меса на овим пределима (Klun и сар., 2006).

Међутим, значај појединих производних врста, као резервоара *T. gondii* не зависи само од преваленце инфекције код дате врсте и регионалне склоности људи ка конзумацији њеног меса, већ и од потенцијала токсоплазме да формира цисте у ткивима те врсте, као и концентрације цисти у ткивима. Свиње се, заједно са овцама и козама, сматрају врстом у чијим ткивима су вијабилне цисте најприсутније (Tenter и сар., 2000). Цисте се могу пронаћи у практично свим јестивим органима инфициране свиње и имају тенденцију доживотног перзистирања (Hill и Dubey, 2002). Иако се цисте чешће и у већем броју налазе у нервном и мишићном ткиву (Dubey, 1986), барем две епидемије акутне хумане токсоплазмозе су повезане са конзумацијом слезине и јетре инфицираних свиња (Choi и сар., 1997). У студији коју су спровели Juránková и сар. (2014), плућа су, после мозга и срца, представљала најчешће место налаза *T. gondii*.

Вијабилна токсоплазма је изолована из свежег свињског меса узоркованог у малопродајним објектима (Katsube и сар., 1981; Wang и сар., 2012), свежих кобасица (Dias и сар., 2005; Abdulmawjood и сар., 2014), као и комерцијално припремљених сушених шунки (Gomez-Sambles и сар., 2015).

2.8.1.4 Методе дијагностике

Као и код људи, у дијагностици токсоплазмозе код животиња могу се користити директне методе, које су засноване на доказивању самог паразита, и индиректне методе, којима се доказује присуство специфичних антитела.

2.8.1.4.1 Индиректне – серолошке методе

У односу на директне методе, серолошке методе се сматрају осетљивијим, једноставнијим и економичнијим средством дијагностике токсоплазмозе код животиња. На жалост, ни један од тренутно расположивих тестова није у стању да, на нивоу индивидуалне животиње, потврди или искључи присуство инфективних циста у њеним ткивима. Због тога се примена серолошких метода препоручује искључиво за потребе епидемиолошких истраживања (Gamble и сар., 2005; EFSA, 2007).

Серуми свиња се најчешће испитују на присуство IgG, а уколико тест то дозвољава и IgM антитела против *T. gondii*. Истраживања сугеришу да се код свиња IgM антитела синтетишу само током кратке, иницијалне фазе инфекције, док се у случају IgG антитела, достигнути плато одржава месецима. У зависности од врсте коришћеног серолошког теста, IgM антитела је могуће детектовати већ око седмог дана након инфекције, док се IgG антитела могу детектовати најраније око 10-14. дана након инфекције (Lind и сар., 1997; Garcia, Navarro и сар., 2006; Forbes и сар., 2012). Треба, међутим, имати у виду да на брзину формирања специфичних антитела утичу и пут инфекције, развојни стадијум који је до инфекције довео, као и вируленција паразита (Dubey и Frenkel, 1973; Omata и сар., 1994).

Као алтернатива серуму, за потребе серолошког скрининга свиња на линији клања може се користити и месни соко. Иако су се показали мање осетљивим у односу на серуме (Forbes и сар., 2012; Ranucci и сар., 2012), месне сокове карактерише низ предности као што су: а) једноставан поступак добијања (цеђењем мишића), који је могуће аутоматизовати (погодно за преглед великог броја узорака), б) доступност (понекад је месо једини доступан узорак, нпр. у случају увоза), в) могућност употребе истог узорака из којег је издвојен месни сок за паразитолошки преглед.

Тестови који су најчешће коришћени за детекцију антитела против *T. gondii* код свиња су:

- **Сабин-Фелдманов (Sabin-Feldman) „dye test“ (SFDT, DT)** - значајан пре свега са историјског аспекта, јер је његово откриће 1948. (Sabin и Feldman, 1948) године означило почетак озбиљнијих епидемиолошких студија широм света (Innes, 2009), укључујући и Србију (Djurkovic-Djakovic и сар., 2010). Иако се и данас сматра „златним стандардом“ за дијагностику хумане токсоплазмозе, у пракси се ретко користи, првенствено због употребе живих тахизоита (Dubey, 1997);
- **Рекција везивања комплемента (*Complement-fixation test*)** – први тест који је коришћен у дијагностици токсоплазмозе (Fulton и Fulton, 1965; Hejlicek и Literak, 1993);
- **Тест индиректне хемаглутинације (ИНА) и тест латекс аглутинације (LAT)** – нису се показали довољно осетљивим за примену на свињским серумима (Dubey и сар., 1997);
- **Имуноблотинг (IB)** – изузетно осетљив, квалитативан тест. Користи се за потврду резултата других тестова. Супериоран у односу на остале у детекцији очне и конгениталне токсоплазмозе (Garcia и сар., 2008; Pardini и сар., 2012);
- **Тест индиректне имунофлуоресценције (IFAT)** – Многи га сматрају референтним тестом за серолошку дијагностику токсоплазмозе код свиња (Garcia, Navarro и сар., 2006; Veronesi и сар., 2012). Омогућава рану детекцију антитела (Garcia, Navarro и сар., 2006), не даје унакрсну реактивност са другим кокцидијама (Björkman и Uggla, 1999), али је релативно субјективан (EFSA, 2007) и недостаје му стандардизација у погледу граничних вредности (Dubey, 2008). Може да детектује и IgM и IgG антитела (Garcia и сар., 2008);
- **Имуноензимски тест (ELISA)** – по осетљивости и специфичности налази се у самом врху, заједно са IFAT и MAT. Очитавање резултата је објективно, може бити полу-аутоматизован и погодан је за преглед великог броја узорака (Garcia, Navarro и сар., 2006). Индиректне методе, које су користиле растворљиве антигене *T. gondii*, показале су склоност ка унакрсним реакцијама са *Sarcocystis cruzi* (Björkman и Uggla, 1999). Може да детектује и IgM и IgG антитела (Garcia и сар., 2008)
- **Високо осетљиви тест директне аглутинације (HSDA)** – модификација теста директне аглутинације коју су увели Desmonts и Remington (1980), а која се огледала у новом начину добијања антигена и увођењу 2-меркаптоетанола (2ME),

чиме су побољшане осетљивост и специфичност до тада коришћеног теста (Fulton, 1965; Fulton и Turk, 1959; Ardoin и сар., 1967). Пошто му резултати корелирају са резултатима DT, препоручује се као скрининг тест у клиничким лабораторијама (Ђурковић-Ђакović, 2004).

- **Тест модификоване аглутинације (MAT)** – од HSDA се разликује само по времену додавања 2ME (на крају теста, уместо на почетку) (Dubey и Desmonts, 1987). Иако су резултати компаративних студија показали да је MAT нешто мање осетљив у односу на ELISA методу (Gamble и сар., 2005; Garcia, Navarro и сар., 2006; Hill, Chirukandoth и сар., 2006), он се сматра најосетљивијим и најспецифичнијим тестом за откривање инфекције код природно инфицираних свиња (Dubey, Thulliez и Powell, 1995; Dubey и сар., 2002; Gamble и сар., 2005). Осим тога, у извођењу MAT-а се не користе коњугати специфични за врсту домаћина, па се истим тестом, уз корекцију разређења могу прегледати серуми различитих врста животиња. Такође, MAT је јефтинији и једноставнији за извођење у односу на IFAT и ELISA и не захтева посебну опрему за читавање резултата. Добра страна MAT-а је и та што нису примећене лажно позитивне реакције са *Sarcocystis misheriana* (Garcia и сар., 2008). Ману теста представља дужина његовог извођења (инкубација “преко ноћи“) због чега MAT, у тренутном облику, није погодан за употребу у кланици и на терену (Gamble и сар., 2005). Као и код IFAT методе, присутна је субјективност током читавања резултата (Hill, Chirukandoth и сар., 2006). Приликом тестирања месних сокова, MAT је показао бољу осетљивост у односу на комерцијални ELISA кит (Forbes и сар., 2012; Villena и сар., 2012).

2.8.1.4.2 Директне методе дијагностике токсоплазмозе код свиња

Директно доказивање токсоплазме у ткивима свиња може се вршити хистолошким и имунохистохемијским методама, на култури ћелија, билошким огледом на животињама и молекуларним методама, које су у највећем броју случајева базиране на ланчаној реакцији полимеразе (*Polymerase Chain Reaction, PCR*).

Хистолошке и имунохистохемијске методе заснивају се на визуелизацији тахизоита и циста *T. gondii* у ткивима животиња помоћу боја, али због ниске осетљивости данас

имају углавном историјски значај (Esteban-Redondo и Innes, 1998; Da Silva и Langoni, 2001; Garcia, Gennari и сар., 2006).

Изолација *T. gondii* на култури ћелија је етички прихватљивија у односу на биолошки оглед, а време до издавања резултата је краће. Међутим, због велике осетљивости ћелијских култура на токсичне компоненте узорака, комплексности методологије и ниже осетљивости у односу на биолошки оглед и PCR, ова метода изолације није погодна за рутинску дијагностику *T. gondii* (James и сар., 1996; EFSA, 2007).

2.8.1.4.2.1 Биолошки оглед

Биолошки оглед (БО) представља најстарији вид изолације *T. gondii*. Истовремено, због високе осетљивости и специфичности, БО се и данас сматра референтном методом за детекцију и испитивање вијабилности *T. gondii* у месу производних животиња (Dubey и сар., 1996; Нoman и сар., 2000; Gomez-Sambblas и сар., 2015). Студије су показале да је БО способан да детектује 1 цисту у 100 g ткива (Dubey, Thulliez и Powell, 1995).

Биолошки оглед се изводи на мачкама или мишевима, при чему се БО на мачкама сматра “златним стандардом” (Gamble и сар., 2005) и показао се двоструко осетљивијим у односу на БО на мишевима (Dubey, Thulliez и Powell, 1995). Разлог томе лежи у већој осетљивости мачака на инфекцију бразидзоитима, као и могућности стављања у оглед велике количине узорка (500g и више) (Dubey, 2009a). Малу количину узорка која улази у БО на мишевима, могуће је у одређеној мери превазићи концентровањем ткивних циста путем пепсинске или трипсинске дигестије (Dubey и сар., 1996). Талог добијен дигестијом меса инокулише се мишевима интраперитонеално, субкутано или перорално. Након периода инкубације од шест недеља, мишеви се жртвују, а њихова крв и мозак испитују серолошким односно паразитолошким методама на присуство паразита. Мачке се, за потребе БО, хране мускулатуром испитиване животиње и после три дана фецес им се контролише на присуство ооциста (Dubey, 2009б).

Осетљивост биолошког огледа на мишу зависи од стадијума инфекције и броја инфективних облика. Сматра се да однос инокулисаних и успешно инфицираних мишева одговара концентрацији паразита у инокулуму (Dubey, 1986; Dubey, Thulliez и Powell, 1995)

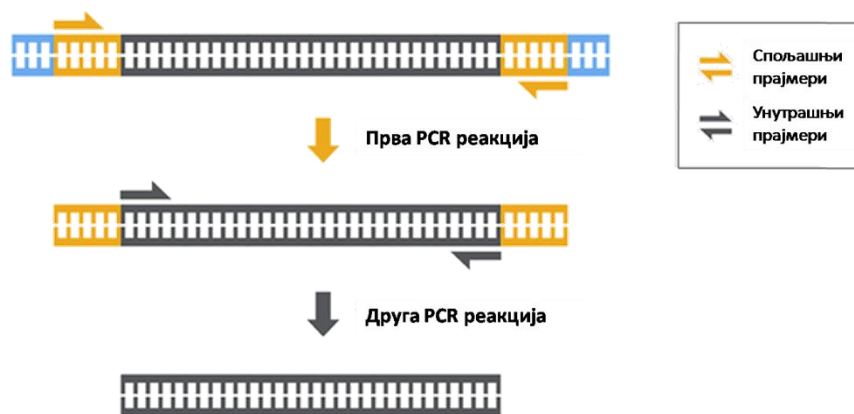
Мане биолошког огледа су компликованост извођења, дужина чекања на резултате као и жртвовање великог броја животиња (Gomez-Sambles и сар., 2015). Такође, уколико се дигестија врши употребом пепсина, изолација ће вероватно изостати у великом броју случајева акутно инфицираних свиња (Gajadhar и сар., 1998), с обзиром на то да пепсин унишава тахизоите *T. gondii* (Jacobs и сар., 1960).

2.8.1.4.2.2 Молекуларне методе базиране на PCR-у

PCR методе се заснивају на доказивању генетског материјала паразита у испитиваном узорку. Током PCR реакције долази до умножавања специфичног дела генома, а добијени продукт се може учинити видљивим електрофорезом на гелу, ласерском детекцијом (на аутоматском секвенцеру) или директно, у случају PCR-а у реалном времену (*Real-time Polymerase Chain Reaction*) који се још назива и квантитативни PCR (qPCR).

Први протокол за молекуларну детекцију *T. gondii* развијен је 1989. године, за конвенционални PCR и ослањао се на умножавање B1 гена, који се у геному понавља 35 пута (Burg и сар., 1989). Већ наредне године, метода је нашла употребу у дијагностици токсоплазмозе код животиња (Bastien, 2002). У годинама које су уследиле првобитни протокол је доживео бројне модификације, углавном по питању одабира гена тј. секвенци које су умножаване (Holliman, 1994). Што се секвенца чешће понавља у геному, то је, по правилу, PCR осетљивији. Тако је увођење нове циљне секвенце – некодирајућег 529-бр фрагмента, који је и данас у употреби, а који се у геному токсоплазме понавља 200-300 пута - повећао осетљивост методе 10-100 пута у односу на ону која се базирала на умножавању B1 гена (Homan и сар., 2000; Edvinsson и сар., 2006; Dubey, 2009b).

Молекуларне методе се могу поделити у две групе, при чему прва група обухвата технике којима се детектује ДНК *T. gondii* у биолошким узорцима и ту спадају конвенционални PCR, “nested” PCR (n-PCR) и qPCR. n-PCR подразумева употребу два пара прајмера (екстерних и интерних) током два узастопна PCR-а. При томе, други пар прајмера циља секвенцу унутар продукта који је добијен на крају прве PCR-реакције (Слика 10).



Слика 10. Шематски приказ nPCR методе ("PCR Methods—Top Ten Strategies | Thermo Fisher Scientific")

Метода која омогућава истовремено (у једној PCR реакцији) умножавање неколико различитих секвенци, назива се мултиплекс PCR (MPCR).

Другу групу метода чине молекуларне методе у које спадају анализа полиморфизма дужина рестрикционих фрагмената заснована на PCR-у (*Restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP*), анализа микросателита и мултилокусно типизирање секвенце (*multilocus sequence typing (MLST)*) једне копије токсоплазматске ДНК и оне се користе за генотипизацију сојева *T. gondii* (Su и сар., 2010).

Квантитативни PCR у реалном времену (qPCR)

Увођење qPCR технологије представљало је велики напредак у молекуларној дијагностици токсоплазмозе. За разлику од конвенционалног PCR-а, код кога су резултати умножавања циљне ДНК видљиви тек након електрофорезе добијених PCR-продуката, qPCR је омогућио праћење ефикасности умножавања у току саме реакције ("real-time"). Праћење умножавања ДНК током qPCR-а врши се на два начина: а) детекцијом флуоресцентног сигнала који емитују боје које се неспецифично вежу за било који новостворени двоструки ланац ДНК, или б) детекцијом флуоресцентног сигнала који емитују пробе, сачињене од нуклеотида и обележене флуоресцентним бојама у оном тренутку када се специфично вежу за комплементарни део секвенце. На овај начин, омогућено је брже добијање резултата, у поређењу са конвенционалним PCR-ом. Осим тога, мерењем количине флуоресцентног сигнала, qPCR је омогућио квантификацију паразитске ДНК у узорцима, а упрошћавањем процедуре донекле смањено ризик од

настанка контаминације (Homan и сар., 2000; Bastien и сар., 2008). Такође, у раду са qPCR-ом примећено је и повећање осетљивости, али, услед великих међулабораторијских варијација у начину припреме узорка, опреме и радне процедуре, као и недостатка референтних контрола, ово опажање не би требало олако генерализовати (Pelloux и сар., 1998; Switaj и сар., 2005; Bastien и сар., 2008).

Као и БО, и методе засноване на PCR-у имају одређене предности и недостатке. Један од недостатака јесте нижа осетљивост у односу на БО када је потребно детектовати цисте *T. gondii* у ткивима животиња (Da Silva и Langoni, 2001; Garcia, Gennari и сар., 2006; Tsutsui и сар., 2007) и немогућност разликовања инфективних од мртвих паразита (Esteban-Redondo и Innes, 1998). Мања осетљивост PCR-а је првенствено последица малог узорка и нехомогеног распореда паразита у ткивима производних животиња. Повећање осетљивости могуће је постићи истим методама концентрације које претходе биолошком огледу, или методом концентрације ДНК помоћу магнетних перлица обавијених пробама које циљају специфичан регион токсоплазматског генома (нпр 529 репетитивни елемент, *magnetic capture qPCR*). Осим што омогућава концентрацију циљаног фрагмента, ова метода елиминише и потенцијалне инхибиторе PCR реакције (домаћинова ДНК, соли из сухомеснатих производа итд.) (Opsteegh и сар., 2010; Gomez-Sambblas и сар., 2015). Практичну препреку масовнијој употреби ове методе (нпр. за потребе контроле трупова на кланици) представља и висока цена опреме и реагенаса неопходних за њено извођење (Switaj и сар., 2005).

С друге стране, PCR је метода избора у свим случајевима када је за анализу доступна веома мала количина узорка као и када је резултат потребно добити у што краћем временском року.

Анализа полиморфизма дужина рестрикционих фрагмената заснована на PCR-y (PCR-RFLP)

Генотипизација сојева *T. gondii* није значајна само са аспекта филогенетских истраживања, већ и са аспекта епидемиологије, за утврђивање извора инфекције, као и за студије које се баве испитивањем везе између тежине болести и генотипа паразита (Switaj и сар., 2005).

PCR-RFLP метода је базирана на деловању рестрикционих ендонуклеаза које препознају места тачкастих полиморфизама (SNP, single nucleotide polymorphism). Након умножавања секвенце генома *T. gondii* помоћу PCR, врши се сечење рестрикционим ензимима и добијају се PCR продукти различитих величина на основу којих је могуће одредити припадност неком од клонских типова. Иако се у односу на друге, модерније, методе генотипизације може сматрати мање информативном, PCR-RFLP метода је још увек актуелна као средство идентификације и одређивања генотипа *T. gondii*, првенствено због једноставнијег и бржег извођења, али и због веће економичности (Su и сар., 2006)

2.8.1.5 Мере контроле са циљем елиминације или смањивања присуства *T. gondii* у месу свиња

2.8.1.5.1 Мере контроле на нивоу фарме

Интензиван систем узгоја се у случајевима појединих фарми свиња показао високо ефикасним у контроли токсоплазматске инфекције (Edelhofer, 1994; Kijlstra, Eissen и сар., 2004) Међутим, у случајевима када је околина фарме високо контаминирана ооцистама *T. gondii*, ова мера, сама по себи није довољна (Veronesi и сар., 2011) и мора бити праћена истовременим побољшањем зоохигијенских услова (Hill и сар., 2010) и биосигурносних мера (Tenter и сар., 2000; Kijlstra, Meerburg и Mull, 2004; Veronesi и сар., 2011).

Са друге стране, интензиван узгој и појачане биосигурносне мере често иду на штету добробити животиња и у многим земљама произвођачи се, под притиском јавности, све више окрећу органској производњи и тзв. “*animal-friendly*” условима, који, између осталог, подразумевају већи контакт животиња са природом. Контакт са природом, међутим, значи и већу вероватноћу контакта са инфективним ооцистама и инфицираним прелазним домаћинима, због чега овакви системи производње за последицу могу имати поновни пораст преваленце токсоплазмозе код свиња. Тако је у Швајцарској, након увођења прописа о добробити животиња, примећен пораст серопреваленце *T. gondii* код свиња у тову за 13% (са 1% на 14%) (Berger-Schoch, Bernet и сар., 2011). Висока серопреваленца је детектована и код органски гајених свиња (90,9%) (Dubey и сар., 2012), као и код свиња из претежно екстензивног система узгоја (47,4%) у САД-у (Gamble и сар., 1999). Ипак, Kijlstra, Eissen и сар. (2004) су доказали да и “*animal-friendly*” фарме, могу бити слободне од *T. gondii*. Као безбедносне мере, на овим фармама се препоручује

контрола присуства мачака и глодара, контролисано кретање људи на фарми и избегавање храњења свиња ризичним материјалом, као што је козија сурутка (Meerburg и сар., 2006).

Вакцинација би била најједноставнији начин заштите свиња у “*animal-friendly*” системима. Међутим, упркос обећавајућим резултатима појединих студија (Jongert и сар., 2008; Wang и сар., 2013), вакцина задовољавајуће ефикасности за ову врсту још увек није пронађена. (Kringel и сар., 2004). Вакцинација мачака, у циљу спречавања излучивања ооциста и последичне контаминације околине такође је предложена као мера контроле. Ефикасност овакве једне вакцине је чак и потврђена на терену (Mateus-Pinilla и Dubey, 1999), међутим, због високе цене, ниских температура чувања и кратког рока трајања, као и због недовољног интересовања власника, прекинута је њена комерцијална производња (Jones и Dubey, 2012).

Што се хомотерапеутика тиче, већина њих се показала ефикасним само против тахизоита *T. gondii*. Иако су неки од њих, попут атоваквона (Djurkovic-Djakovic и сар., 2002) у *in vivo* студијама показали одређену ефикасност и против брадизоита, још увек не постоји антипаразитик који је способан да у потпуности елиминише цисте *T. gondii* из ткива инфицираних животиња (Djurković-Djaković и сар., 2005).

2.8.1.5.2 Мере контроле на нивоу кланице

У одсуству клиничке слике и специфичних патолошких промена код највећег броја инфицираних животиња, као и због изузетно малих димензија ткивних циста *T. gondii*, стандардне методе *post mortem* инспекције меса нису ефикасне у диференцијацији меса здравих и заражених свиња (Blagojevic и Antic, 2014). Такође, ни једна од тренутно постојећих метода лабораторијске дијагностике није довољно осетљива да би могла са потпуном сигурношћу да потврди или искључи присуство токсоплазматске инфекције код појединачне животиње (EFSA, 2007). Као последица овога, ни у једној европској земљи, на линији клања тренутно не постоји контрола меса на *T. gondii* (Dubey и сар., 2002). Потенцијално решење овог проблема, засновано на анализи ризика, понудила је Европска агенција за безбедност хране – EFSA (*European Food Safety Authority*). Према њеним препорукама, на основу процене заступљености познатих фактора ризика на фарми, и резултата серолошког скрининга свиња на линији клања, фарме би се класификовале на

фарме високог и ниског ризика од присуства инфекције (EFSA, 2011). Месо свиња са фарми повећаног ризика затим би могло бити подвргнуто додатним процесима обраде који ће осигурати губитак инфективности потенцијлно присутних ткивних циста (Kijlstra и Jongert, 2009). Такође, у складу са Директивом Европског парламента и већа (2003/99/EZ) (European Parliament and Council of the European Union, 2003) токсоплазма је увршћена међу зоонозе чије праћење¹ је обавезно од стране држава чланица ЕУ чија епидемиолошка ситуација то захтева.

Коначно, јасно декларисање производа пореклом од свиња из „*animal friendly*“ система, додатно би помогло у контроли ризика од инфекције критичних група, као што су труднице и имунокомпромитоване особе (Cook и сар., 2000; Bayarri и сар., 2010).

2.8.1.5.3 *Методe инактивације циста T. gondii у месу свиња*

Термичка обрада представља најједноставнији и, истовремено, најефикаснији начин убијања ткивних форми *T. gondii*. Према препорукама USDA (*US Department of Agriculture*), за потребе инактивације евентуално присутних ткивних циста, температура у дубини меса би приликом припреме требала да износи најмање 66°C у случају свињетине, јагњетине и говедине, најмање 71°C у случају дивљачи, и 74°C у случају пилетине (Jones и Dubey, 2012). У исту сврху, EFSA препоручује третман свих врста меса температуром од најмање 67°C. У свету, међутим, постаје све популарнији третман нижим температурама (53 °C and 58 °C) током дужег временског периода (20 h) (тзв. *low temperature long time*, LTLT), чију ефикасност тек треба испитати (Purslow, 2016). Термичка обрада меса у микроталасној пећници се не препоручује као поуздана метода уништавања вијабилних циста *T. gondii*, због неравномерног загревања унутар пећнице (Lunden и Uggla, 1992).

На температури фрижидера ткивне цисте у свежим труповима животиња могу преживети преко три (Kotula и сар., 1991), а према неким ауторима (Hill и сар., 2004) и преко шест недеља, што је знатно дуже него што се месо обично складишти пре употребе. Међутим, применом нижих температура, период преживљавања циста се значајно скраћује. Студије су показале да на температурама између 0°C и -5°C, цисте остају инфективне око седам дана (Hill, Benedetto и сар., 2006), на -7°C и -12°C мање од четири дана (Kuticic и Wikerhauser, 1996), док су на -20°C преживљавале краће од 72h (Lunden и

¹ Под „праћењем“ се у Директиви подразумева прикупљање, анализа и ширење података о зоонози, њеном узрочнику и његовој антимицробној отпорности

Uggla, 1992; Djurkovic-Djakovic и Milenkovic, 2000). Са друге стране, Dubey и Frenkel (1973) су изоловали вијабилне цисте из леша мајмуна, претходно чуваног на -20°C , у трајању од 16 дана, док су турски истраживачи неоштећене цисте пронашли у смрзнутом бесу бивола (Gencay и сар., 2013). Због свега наведеног, у циљу инактивације потенцијално присутних циста *T. gondii*, смрзавање се препоручује искључиво у комбинацији са другим методама.

Сољење, саламурење, димљење, сушење и друге врсте третмана које за циљ имају побољшање укуса или конзервацију меса, могу се користити за умањивање вијабилности токсоплазме. Међутим, због великих варијација у методологији и налазима досадашњих истраживања, у овом тренутку није могуће дати јасне препоруке у погледу састава и концентрације раствора и дужине третмана којима би се осигурала њихова ефикасност (Jones и Dubey, 2012). Тако, док су поједини аутори боље ефекте имали након обогаћивања раствора натријум-хлорида нитритима (Pott и сар., 2013), други (Gomez-Samblas и сар., 2016) су закључили да, у току производње пршуте нитрити уствари успоравају инактивацију циста *T. gondii*, одлажући процес липолизе који аутори сматрају једним од кључних фактора инактивације паразита. Слично томе, Neumaierová и сар. (2014) су закључили да су активност воде и рН вредност меса, односно кобасице, фактори који, уз концентрацију соли, значајно утичу на ефикасност инактивације ткивних циста, док Gomez-Samblas и сар. (2016) и Herrero и сар. (2017) нису приметили ову врсту корелације. Задовољавајући резултати су добијени комбинацијом смрзавања, сољења (без нитрита) и седмомесечног зрења (Gomez-Samblas и сар., 2016). Ефикасна инактивација циста је постигнута и комбинацијом третирања шунки са 3.9% NaCl, 25 mg/kg нитрата и 3 mg/kg нитрита и периода сушења од 14 месеци (Bayarri и сар., 2010).

Ефикасним методама инактивације *T. gondii* у месу показали су се и гама зрачење, у дозама 0,7 kGy (Kuticic и Wikerhauser, 1996) и 1,0 kGy (Tenter, 2009), као и притисак од 300MPa (Lindsay и сар., 2006). Препреку практичној примени ових метода, за сада, представља отпор потрошача и недостатак одговарајуће легислативе у већини држава ЕУ, у случају зрачења (Farkas, 1998) тј. недостатак техничко-технолошких решења у случају притиска.

3. ЦИЉЕВИ И ЗАДАЦИ

Конзумација термички недовољно обрађеног меса свиња је у многим земљама препозната као значајан фактор ризика од инфекције људи са *T. gondii*. Иако у Србији веза између конзумације свињетине и случајева хумане токсоплазмозе није званично доказана, њено постојање с обзиром на индиректне доказе чини се извесним. Сероепизоотиолошке студије су у више наврата потврдиле присуство *T. gondii* код свиња са територије Србије, док су инфективне форме овог паразита успешно изоловане из крви серопозитивних животиња. У једној од старијих студија, токсоплазма је такође изолована из срца и мозга свиња; на жалост, серолошки статус ових животиња није познат. Са друге стране, свињетина представља најчешће конзумирану врсту меса у Србији, а сухомеснати деликатеси, често припремљени у домаћинствима, неодвојиви су део традиционалне кухиње.

Циљ ове докторске дисертације јесте испитивање присуства циста *T. gondii* у одабраним ткивима домаћих свиња намењених људској исхрани, као и испитивање везе између позитивног серолошког и паразитолошког налаза код ових животиња. Осим тога, имајући у виду одсуство података о популационој структури *T. gondii* код свиња у Србији, у случају детекције овог паразита код свиња из ове студије биће испитана и његова припадност одређеном клонском типу.

У складу са наведеним циљевима, формулисани су следећи задаци дисертације:

- утврђивање присуства IgG антитела специфичних за *T. gondii* у узорку закланих свиња са територије северне Србије, узгојених на комерцијалним фармама и у домаћинствима (у затвореном и слободном систему држања);
- доказивање *T. gondii* у месу (тј. дијафрагми/срцу као моделу јестивог органа) свиња, молекуларним и биолошким методама;
- утврђивање степена изолације *T. gondii* из серопозитивних свиња;
- генотипизација *T. gondii* детектоване у ткивима свиња.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Методе коришћене у овој дисертацији имале су за циљ серолошко, биолошко и молекуларно испитивање одабране групе свиња на присуство *T. gondii*. Све свиње су најпре испитане серолошким методама, са циљем да се ткива инфицираних (серопозитивних) јединки даље испитају на присуство паразита. Присуство вијабилних паразита испитивано је биолошким огледом на мишевима, а детекција ДНК токсоплазме је вршена помоћу qPCR-а. Ради ослобађања и концентрисања паразита присутних у испитиваним ткивима, узорци су пре анализе подвргавани вештачкој дигестији. На крају је анализиран генски полиморфизам детектованих сојева чиме је вршена њихова генотипизација.

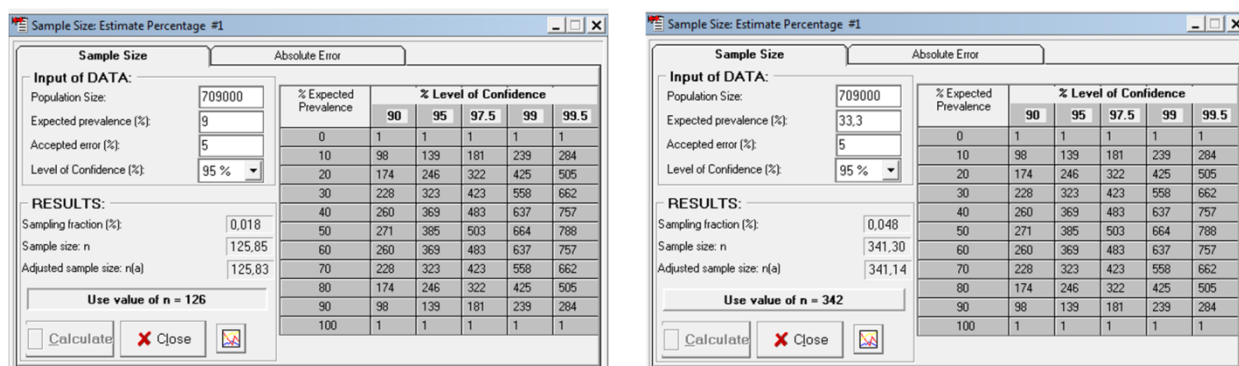
4.1. Узорак

4.1.1 Величина узорка

Приликом планирања истраживања, одлучено је да се као број животиња које ће бити укључене у студију узме најмањи број животиња који је потребан за процену преваленце антитела против *T. gondii* код свиња са територије северне Србије. Ова вредност је добијена коришћењем софтверског пакета Win Episcorpe 2.0. За прорачун су употребљени подаци Републичког завода за статистику о укупном броју свиња на територији северне Србије (Табела 3) као и раније забележене преваленце од 33,3% серопозитивних свиња, за исти регион (Klun и сар., 2006), односно 9%, за свиње заклане на београдским кланицама (Klun и сар., 2011). За очекивану преваленцу од 9% добијена је минимална величина узорка од 126 свиња, док је за преваленцу од 33,3% величина узорка износила 342 животиње (Слика 11).

Табела 3. Подаци преузети са сајта Републичког завода за статистику о укупном броју свиња на територији Републике Србије, на дан 23. мај 2014. год. (РЗС, 2014). Обележено поље представља податке који се односе на укупан број товних свиња (у хиљадама) на територији северне Србије.

	Прасад масе до 20 kg	Свиње масе 20-49 kg	Товне свиње, масе ≥ 50 kg			Приплодне свиње, масе ≥ 50 kg					Свиње, укупно	Од укупног броја свиња > свиње у тову (у хиљ. грла)
			50-79 kg	80-109 kg	110 или више kg	називад крмаче		нерастови				
						укупно	од тога > супрасне назимнице		укупно	од тога > супрасне крмаче		
РЕПУБЛИКА СРБИЈА	1276	738	514	272	112	141	50	408	207	26	3487	1383
СРБИЈА – СЕВЕР	544	366	262	127	54	60	22	155	87	6	1574	709
Београдски регион	60	34	14	18	8	12	5	20	12	2	167	55
Регион Војводине	485	332	248	109	46	49	17	135	76	4	1407	653
СРБИЈА – ЈУГ	731	372	251	145	58	81	28	253	120	21	1912	674
Регион Шумадије и Западне Србије	453	235	176	92	29	36	13	167	81	11	1200	442
Регион Јужне и Источне Србије	278	137	75	53	29	44	15	87	39	10	713	232
Регион Косово и Метохија



Слика 11. Опција у софтверском пакету Win Episcorpe 2.0. која је коришћена за израчунавање минималне величине узорка за преваленцу од: а) 9% и б) 33,3%. За оба прорачуна коришћени су дозвољена грешка од 5% и интервал поверења од 95%.

Пошто је планирано да део материјала за истраживање буде узоркован од свиња на линији клања, код којих се, с обзиром на начин узгоја и млађи узраст животиња, очекује нижа преваленца, сматрало се да у избору величине узорка није потребно ићи до горње израчунате вредности али да би, због веће поузданости резултата, број испитаних животиња требао бити већи од доње израчунате границе. Зато је, за величину узорка, узета приближна средња вредност од укупно 200 свиња.

4.1.2 Испитиване животиње

За потребе истраживања, узорци су сакупљани од свиња кланичног узраста, које су подељене у три категорије: “фармске” свиње, “свиње из домаћинстава” и “слободно држане” свиње.

У категорију **фармских свиња** увршћене су свиње гајене у интензивним условима, на великим фармама (> 1000 грла) које се баве комерцијалном производњом товљеника.

Свињама из **домаћинстава** назване су животиње које су гајене на малим (≤ 10 свиња), породичним имањима, претежно за сопствене потребе. Објекти у којима се држе ове свиње по правилу су затвореног типа, са или без испуста, а сама производња не подразумева примену биосигурносних мера. Исхрана свиња гајених у домаћинствима је најчешће комбинована, у виду комерцијалних концентрата, кукуруза, остатака из кухиње и повременог додатка зелених, кабастих хранива.

Слободно држаним сматране су свиње које су током узгоја, у мањој или већој мери, имале слободу кретања и изражен контакт са спољашњом средином. Све свиње из ове категорије биле су власништво Специјалног резервата природе „Засавица“ и припадале су аутохтоној раси мангулица, која се карактерише високим уделом масти у укупном рандману, за разлику од фармских и свиња из домаћинстава, које су биле у типу савремених, меснатих раса. Разлике у раси и начину това (екстензиван тов код мангулица, насупротив интензивном код осталих свиња из студије), за последицу су имале и различиту старост свиња приликом клања, која је у случају мангулица износила ≥ 18 месеци, а у случају друге две категорије ≥ 6 месеци.

4.1.3 Узимање и обрада узорака

Прикупљање узорака спроведено је током 2014. и 2015. године. Од свиња гајених за сопствене потребе узорци су највећим делом узети у договору са локалним приватним кланицама; због непредвидиве динамике клања, узорке су узимали месари, пратећи добијена упутства о начину узимања и чувања материјала. Део узорака од свиња из домаћинстава сакупљен је лично, на линији клања једне индустријске кланице (тзв. свиње из откупа - сакупљене по селима од стране накупца и продате кланици). На истој кланици су сакупљени и сви узорци од фармских свиња. Од сваке свиње узети су, паралелно, узорак крви и узорак дијафрагме. Изузетак су представљале слободно држане свиње, код којих је уместо дијафрагме узорковано срце.

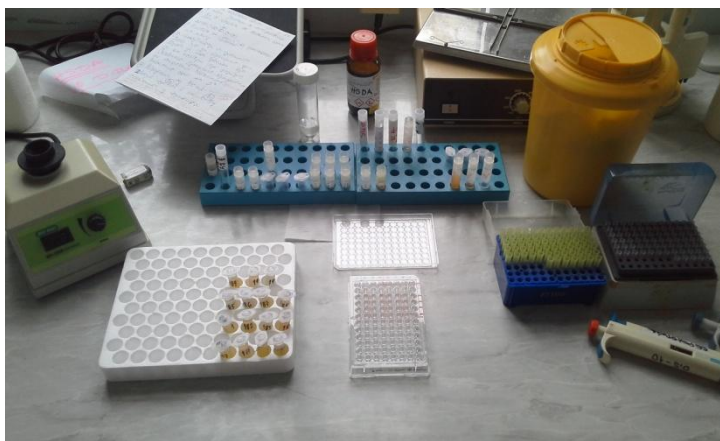
Сакупљени узорци су у року од неколико сати транспортовани до Лабораторије за паразитологију Пољопривредног факултета, Универзитета у Новом Саду; у случајевима одложеног транспорта, узорци су чувани на температури фрижидера. По доласку у лабораторију, крв је центрифугирана 20 мин на 2.000 грт (лабораторијска центрифуга Sigma 2-16, Немачка), након чега су одвајани серуми и складиштени на -20°C до серолошког тестирања. Узорци мускулатуре су складиштени на температури фрижидера

до читавања резултата серолошког тестирања, а не дуже од седам дана. У случају налаза антитела на *T. gondii* у серуму, одговарајући узорак дијафрагме/срца подвргаван је дигестији. У појединим случајевима, серолошке анализе су морале бити одложене, па су дијафрагме подвргаване дигестији и стављане у биолошки оглед независно од серолошког статуса свиња.

За све животиње су сакупљени подаци о њиховом пореклу, док су за свиње са комерцијалних фарми прикупљени и додатни подаци који су се односили на биосигурносне мере и менаџмент на фармама њиховог порекла. Прикупљање ових података вршено је комбинацијом интервјуа и личног увида током посете фарми. Осим тога, на фарми на којој је откривен висок проценат серопозитивних свиња, током посете (месец дана након узорковања на линији клања) је, као контрола, узето додатних 10 узорака крви од засушених крмача.

4.2. Серолошка испитивања

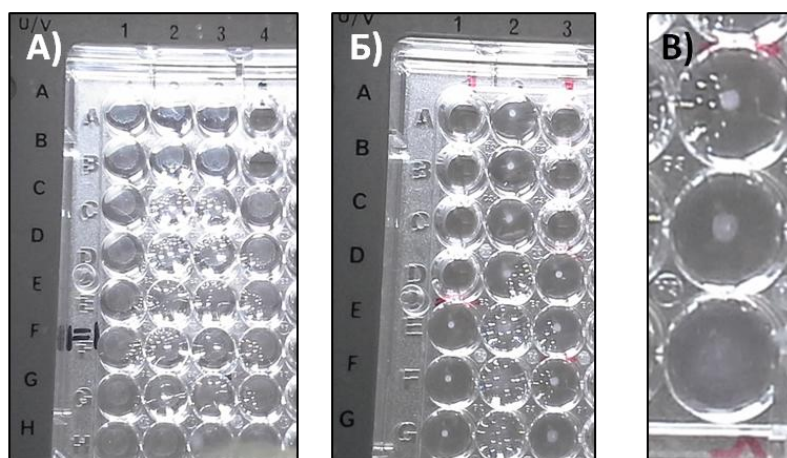
Сви узорци крви свиња, као и узорци крви мишева из биолошког огледа, серолошки су испитани на присуство специфичних IgG антитела за *T. gondii* већ описаном методом модификоване аглутинације - МАТ. Испитивање је извршено у Националној референтној лабораторији за токсоплазмозу (НРЛТ) у Институту за медицинска истраживања (ИМИ) Универзитета у Београду (Слика 12).



Слика 12. Припрема радног окружења за извођење МАТ-а

Антиген за МАТ је припремљен у НРЛТ, тако што су цели, интактни тахизоити RH соја *T. gondii* фиксирани формалином; RH сој је одржаван серијском пасажом на лабораторијским мишевима соја *Swiss-Webster*.

За извођење теста, коришћене су стерилне микротитарске плоче са 96 бунарчића заобљеног дна (Thermo Fisher Scientific, САД). Сваки серум је, за потребе скрининга, најпре испитиван у два разређења (1:25 и 1:50 за свиње одн. 1:20 и 1:40 за мишеве). Разређења серума су прављена у радном раствору 2-МЕ (Прилог 1) чија је улога разградња IgM антитела која би могла довести до појаве лажно позитивних реакција. Разређење 1:25 добијено је тако што је 4 μ l свињског серума мешано са 96 μ l радног раствора 2-МЕ, док је разређење 1:20 прављено додавањем 5 μ l мишјег серума у 100 μ l раствора 2-МЕ. Приликом сваког тестирања, на плочу су, испред испитиваних серума увек наносене и позитивна (пацијент са потврђеним високим титром антитела против *T. gondii*) и негативна (2-МЕ) контрола. У овако припремљене плоче укапавано је по 50 μ l антигена *T. gondii* разређеног у ВABS пуферу (Прилог 2). Радно разређење антигена је зависило од титра антигена утврђеног приликом тестирања сваке нове количине. Након додавања антигена, микроплоче су лагано мешане на шејкеру (EV-301 Tehnica, Железники, Словенија) а затим остављане да се инкубирају на собној температури до јутра, када су читавани резултати. Присуство аглутинације на више од 50% површине дна једног бунарчића тумачи се као позитиван налаз, док таложење антигена у облику дугмета на дну бунарчића представља негативан налаз (Слика 13).



Слика 13. Пример резултата МАТ теста. А) Позитиван налаз - аглутинат се у виду замућеног диска простире преко више од 50% површине дна бунарчића; Б) Негативан налаз (јасно видљив у пољима А2, В2, С2, Д2/3, Е1/3, Ф1/3 и Г1/3) - таложење антигена на дну бунарчића, у виду тачке, које указује на одсуство специфичних антитела у испитиваном серуму; В) Са порастом разређења серума (посматрано од доњег ка горњем бунарчићу), видљив је прелаз позитивног налаза у негативан.

Сви серуми код којих је утврђена аглутинација у разређењу 1:25 (односно 1:20 за мишеве), сматрани су позитивним. Серуми код којих је аглутинација била видљива у оба разређења титрирани су до последњег позитивног разблажења.

4.3. Вештачка дигестија

Вештачка дигестија узорака меса (дијафрагме или срца) извођена је у Лабораторији за паразитологију Пољопривредног факултета Универзитета у Новом Саду, по протоколу добијеном љубазношћу НРЛТ.

Непосредно пре дигестије, сваки комад меса је очишћен од видљивих масноћа, исечен на мање комаде и уситњен у кухињском апарату за сецкање хране (KaufMAX, Немачка). Уситњено месо је затим мерено на дигиталној ваги (Sartorius CP3202S, Немачка) и пребацивано у ерленмајер од 250 ml где су му додавани трипсин (0,25%, Прилог 3) и антибиотици, у количини израчунатој према следећим формулама:

$$\text{трипсин (ml)} = M(\text{g}) \times 1,5$$

$$\text{пеницилин/стрептомицин}^2 \text{ (ml)} = M(\text{g}) \times 0,03$$

$$\text{амоксицилин}^3 \text{ (ml)} = M(\text{g}) \times 0,008$$

где М представља масу узорка који се подвргава дигестији, изражену у грамима.

Ерленмајер, са овако припремљеном смешом, покриван је алуминијумском фолијом и остављан у термошејкеру (BioSan ES-20/60, Литванија) на температури од 37°C и брзини мућкања од 240 грт, у трајању од 1,5 h (контрола на пола сата). По завршеној трипсинизацији, добијени дигест је филтриран кроз шест слојева стерилне памучне газе у нови ерленмајер, а затим пресипан у градуисане пластичне епрувете од 50 ml. Епрувете са филтратом затим су центрифугиране 10 min на 3000 грт и супернатант је пажљиво одливан. Добијени талог ресуспендован је у физиолошком раствору (до 50 ml) и испиран 10 min на 3000 грт, након чега је поново одливан супернатант. Испирање је понављано још два пута, након чега је 300 µl талоба одвајано за PCR и замрзавано на -20°C, до

² 200 000 IU/ml бензилпеницилин-прокаин + 200mg/ml дихидрострептомицин, раствор за ињекције (Neostrep, FM PHARM doo, Палић, Србија).

³ Коришћен је радни раствор амоксицилина који је добијен растварањем капсуле Амоксицилин, 500mg (Хемофарм А.Д., Вршац, Србија) у 100ml физиолошког раствора.

екстракције. Преостали талог мешан је са радним раствором гентамицина⁴ (100µl антибиотика на 1ml талоба) и остављан на температури фрижидера, преко ноћи, до транспорта у виваријум Завода за антирабичну заштиту, „Пастеров завод“, Нови Сад, где је постављан биолошки оглед.

По завршетку рада, употребљено посуђе опрано је најпре врућом водом и детергентом, а затим и 4,5% раствором натријум хипохлорита, након чега је, са изузетком предмета од пластике, стерилисано у аутоклаву.

4.4. Биолошки оглед

За сваки узорак који је био подвргнут трипсинској дигестији, постављен је биолошки оглед на мишевима, по протоколу који су описали Djurković-Djaković и сар. (2005). Укратко, 0,5 ml – 1 ml дигеста (са гентамицином) инокулисано је интраперитонеално у по два лабораторијска миша соја *Swiss-Webster*, тежине ≥ 18 g, поручена са Војномедицинске академије у Београду (ИМИ-одељење за експерименталну хирургију и узгој лабораторијских животиња). Количина инокулизованог материјала зависила је од изгледа дигеста и величине/старости миша (примесе крви у дигесту и/или мања телесна маса миша смањивали су количину инокулата). Здравље мишева праћено је свакодневно, у оквиру стандардне процедуре виваријума Пастеровог завода, током шест недеља.

У случајевима када је пре истека овог периода код мишева дошло до угинућа, приступало се обдукцији и микроскопском испитивању отисака унутрашњих органа (плућа, јетре и мозга), бојених по Гимзи, на присуство развојних облика *T. gondii* (Dubey и Frenkel, 1973).

Уобичајено, мишеви су по истеку периода предвиђеног за биолошки оглед жртвовани, поштујући принципе добробити огледних животиња, и од сваког миша узет је узорак крви и мозак. Крв је пунктирана директно из срца. Сакупљени узорци су у најкраћем могућем року транспортовани у паразитолошку лабораторију Пољопривредног факултета у Новом Саду где су из крви издвојени серуми, а мозгови прегледани на присуство ткивних циста *T. gondii*. Од сваког мозга је узет узорак чеоног режња, величине главе шибице, од којег је притиском између предметног стакла и покровне лјуспице направљен тзв. „squash“ препарат, који је затим гледан под светлосним микроскопом, на

⁴ Радни раствор гентамицина је прављен тако што је 2 ml раствора за ињекције гентамицин-сулфата, концентрације 80 mg/ ml (Neogent, FM PHARM doo, Палић, Србија) мешан са 99 ml физиолошког раствора.

увеличању 40X. Остатак мозга је хомогенизован у 1 ml физиолошког раствора форсираном пасажом кроз иглу 21G (10 пута) и подузорок од 100 µl (четири капи од по 25 µl) прегледан је под микроскопом, под истим увеличањем.

У случају позитивног налаза, приступало се бројању циста у направљеном подзоруку (100 µl), након чега је рачунат просечан број циста у 1 ml хомогената, по следећој формули:

$$\text{бр. циста/ml} = \frac{(\text{бр. циста избројаних у } 100\mu\text{l})}{4} \times 40$$

Цисте су сликане помоћу Moticam 5 (Кина) и Zeiss Axioskop 2 Plus (Немачка) система за сликање. Цисте усликане помоћу Zeiss система су мерене директно, помоћу пратећег софтвера (AxioVision Rel. 4.8.), док су цисте усликане помоћу Moticam 5 апарата мерене накнадно, употребом Image Tool 3.0 софтвера. Просечна величина цисте добијена је анализом резултата мерења у Excel (Microsoft Office) програму.

Извођење биолошког огледа одобрила је Етичка комисија за заштиту и добробит огледних животиња Универзитета у Новом Саду (Мишљење бр. II-2014-02).

4.5. Молекуларна испитивања

Дигести меса свиња, за које је постављен биолошки оглед, испитани су на присуство генетског материјала *T. gondii*. За узорке у којима је паразитска ДНК пронађена у довољној количини, урађена је генотипизација ради утврђивања припадности изолата одређеном клонском типу *T. gondii*. Екстракција ДНК урађена је у Лабораторији за паразитологију Пољопривредног факултета у Новом Саду, док је молекуларна детекција извођена у Лабораторији за молекуларну дијагностику НРЛТ у Београду.

4.5.1 Екстракција ДНК

За екстракцију ДНК из дигеста и мозга коришћени су комерцијални китови reqGOLD Tissue DNA Mini Kit (safety line) (PEQLAB, Немачка) и GeneJet Genomic DNA Purification Kit, (Thermo Fisher Scientific, САД) чији принцип рада се заснива на издвајању нуклеинских киселина у колоницама са силика-гел мембраном. GeneJet Genomic DNA Purification Kit (у даљем тексту GeneJet) је претходно успешно коришћен у НРЛТ за

екстракцију ДНК *T. gondii* из дигеста ткива. Екстракција помоћу овог кита је рађена према пратећем протоколу за изолацију ДНК из крви сисара, уз неколико модификација (уместо 200 μ l крви, како је предвиђено протоколом, коришћена је суспензија 100 μ l дигеста у 100 μ l PBS; уместо 200 μ l “Elution Buffer“ а, силика-мембрана је преливана са 150 μ l PCR воде и овај корак је понављан са садржајем који је током центрифугирања прошао кроз мембрану). С обзиром на то да нису пронађени литературни подаци о употреби reqGOLD Tissue DNA Mini Kit-а (у даљем тексту reqGOLD) за екстракцију токсоплазматске ДНК и пошто је овај кит оригинално предвиђен за рад са узорцима културе ћелија и чврстих ткива, а да су наши узорци (дигести меса и хомогенати мозга) били течне конзистенције, различите густине и са повећаним процентом масноћа у случају хомогената мозга, пре почетка екстракције ДНК из узорака извршено је поређење reqGOLD кита са GeneJet китом и извршена његова оптимизација.

4.5.1.1 Оптимизација reqGOLD кита за екстракцију ДНК

У одређивању оптималне количине узорка кренуло се од 40 mg ткива, како је предвиђено упутством за коришћење кита. Закључено је да ова количина оквирно одговара једној десетини масе мозга одраслог лабораторијског миша. Како се, по завршетку биолошког огледа, мозак миша хомогенизује у 1 ml физиолошког раствора, чиме се добије укупна запремина хомогената од око 1,5 ml, израчунато је да ће се 40 mg мозга наћи у око 150 μ l хомогената. Како је ова вредност приближно одговарала количини узорка од 200 μ l коју је предвиђао GeneJet-ов протокол, који се у значајној мери подударао са протоколом за reqGOLD кит, за почетну величину узорка хомогената мозга узета је запремина од 200 μ l, док је, у складу са претходним искуствима истраживача из НРЛТ, у случају дигеста коришћен узорак од 100 μ l. По један од сваке врсте узорка, негативних на *T. gondii*, спајкован је са $1,5 \times 10^7$ тахизоита/ml да би се добио сигурно позитиван узорак, док су као негативни узорци коришћени по један нетретирани дигест и хомогенат. Сви узорци су потом подвргнути лизи и даљим корацима екстракције у складу са упутством произвођача.

Мерењем укупне количине екстраховане ДНК (Qubit® 2.0., Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, САД) и qPCR методом утврђено је да екстракција ДНК *T. gondii* из хомогената мозга није успела или да је екстрахована сувише мала концентрација коју инструмент

није могао да детектује. Друга претпоставка је деловала вероватније имајући у виду да је Qubit® регистровао присуство дволанчане ДНК, али у изузетно малим количинама (49,3 pg/μl и 99,8 pg/μl). Екстракција паразитске ДНК из спајкованог дигеста дала је задовољавајуће резултате.

Имајући у виду добар резултат постигнут са дигестима, екстракција reqGOLD китом је поновљена по истом протоколу, с тим да је количина хомогената мозгова смањена на 100 μl; такође, за сваки узорак је паралелно урађена екстракција са GeneJet китом. Сви добијени екстракти су затим подвргнути qPCR методи која је детектовала токсоплазматску ДНК у свим спајкованим узорцима, као и у позитивној контроли коју је чинило 500 тахизоита RH соја *T. gondii* (који се континуирано одржава у НРЛТ) и показала задовољавајући степен подудараности између резултата екстракције поређених китова. Тако је, за количину узорка који ће се у будуће користити при екстракцији ДНК из дигеста и хомогената reqGOLD Tissue DNA Mini Kit-ом одређена запремина од 100 μl.

Такође, усвојена је модификација претходно направљена са GeneJet китом, а која се односила на корак елуције, где је уместо “Elution Buffer”-а, због веће сигурности у погледу оптималне ефикасности PCR-реакције, коришћена PCR-вода, која је загревана до 60°C пре преливања колонице (уместо да се цела колоница загрева на истој температури). Корак је понављан са PCR-водом која је током центрифугирања прошла кроз силика-мембрану.

4.5.1.2 Екстракција ДНК из узорака употребом reqGOLD кита

Из свих прикупљених узорка дигеста меса и хомогената мозгова, екстракција је изведена тако што је 100 μl узорка најпре лизирано са 400 μl DNA Lysis Buffer-а „Т“, 20 μl протеиназе и 15 μl RNA-зе “А”. Лизирање се одвијало на 56 °C (ThermoStat C, Eppendorf, Немачка) током просечно 2 h тј. до потпуне лизе узорка. По завршетку лизе, узорцима је додавано 200 μl DNA Binding Buffer-а и 750 μl овакве мешавине преношено је у колонице са мембраном, које су затим центрифугиране (Eppendorf 5424, Немачка) 2 min на 10000 x g. Као резултат тога, екстрахована ДНК везивала се за мембрану на дну колонице, а затим је вишак ћелија и другог „отпада“ испиран пуферима за испирање 2 min на 10.000 x g и уједно се сушила мембрана.

У последњем кораку, колоница је пребачена у стерилну, од нуклеаза слободну, епруветицу од 1,5 ml и директно на мембрану је укапано 150 µl загрејане PCR-воде. Након инкубације од 3 min на собној температури, колоница је заједно са епруветицом центрифугована 1 min на 6000 x g, а да би се добила већа количина ДНК, овај корак је поновљен са водом која се током центрифугирања сакупила у епруветици. По завршетку овог корака, колонице су одбациване, а вода са екстрахованом ДНК, која се током центрифугирања накупила у епруветици, складиштена је на -20 °C, до извођења PCR-а.

4.5.2 Real-time quantitative PCR (qPCR)

За детекцију ДНК *T. gondii* из дигеста меса свиња коришћен је протокол за qPCR методу која се користи за молекуларну дијагностику токсоплазмозе у НРЛТ, а која представља модификацију методе коју су описали Villena и сар. (Villena et al., 2004).

Детекција ДНК вршена је умножавањем дела 529 бп региона (GenBank accession number AF146527), који се у геному *T. gondii* понавља 200-300 пута (Homan et al., 2000). Умножавање је вршено помоћу прајмера HO1 (*forward*) и HO2 (*reverse*), а добијени ампликони (величине 81 бп, Прилог 4) су детектовани помоћу TaqMan пробе HOFT (Табела 4).

Табела 4. Назив и секвенца прајмера и пробе коришћених за амплификацију токсоплазматске ДНК, помоћу qPCR методе

ОПИС	НАЗИВ	СЕКВЕНЦА	РЕФЕРЕНЦА
„Forward“ прајмер	HO1	aga gac acc gga atg cga tct	
“Reverse” прајмер	HO2	ccc tct tct cca ctc ttc aat tct	(Vujanic и сар., 2011)
Проба	HOFT	FAM-acg ctt tcc tcg tgg tga tgg cg-TAMRA	

Реакциона смеша за qPCR састојала се од 1 X Maxima Probe/Rox qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Масачусетс, САД), 3µM прајмера HO1 и HO2, 7.5µM пробе HOFT, 1U урацил N-гликозилазе (UNG), 1 X UNG пуфера (Thermo Fischer Scientific) и интерне контроле (TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents, Echo IPC, Applied Biosystems), коју су чинили IPC ДНК (1 X Echo IPC DNA) и IPC прајмери и пробе (1 X Echo IPC Mix). Улога UNG састојала се у елиминацији евентуалне контаминације амплификованим продуктима из претходне реакције, док је интерна контрола омогућавала

разликовање негативне PCR реакције као последице одсуства циљане ДНК у испитиваном узорку, од негативне PCR реакције која је последица присуства PCR инхибитора. Реакциона смеша је прављена за укупан број узорака у реакцији, након чега је разливана у стерилне низове микротубица у које је, затим, додавано по 3 μl екстраховане ДНК. Финална запремина реакционе смеше по узорку износила је 20 μl (Табела 5). Свака PCR реакција је, уз испитиване узорке, укључивала по две негативне контроле (стерилна дестилована вода) и позитивну екстракциону контролу (ДНК изолована из тахизоита RH соја).

Табела 5. Састав qPCR реакционе смеше за појединачан узорак

КОМПОНЕНТЕ PCR СМЕШЕ	КОЛИЧИНА
2 X Maxima Probe/Rox qPCR Master Mix	10,00 μl
HO1 (3 μM)	0,30 μl
HO2 (3 μM)	0,30 μl
HOFT (7.5 μM)	0,35 μl
50 X Exo IPC DNA	0,40 μl
10 X Exo IPC Mix	2,00 μl
UNG	1,00 μl
10 X UNG пуфер	2,00 μl
H ₂ O	0,65 μl
Екстрахована ДНК	3,00 μl
Укупан волумен:	20,00 μl

Након прављења смеше, садржај микротубица је обаран центрифугирањем (Eppendorf 5430) на 1800 rpm, у трајању од 10-ак секунди, након чега су колонице пребациване у апарат StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Калифорнија, САД), помоћу којег је вршено умножавање и детекција ампликона. Програм за амплификацију састојао се од 45 циклуса, састављених од два корака: корака денатурације дволанчане ДНК и корака везивања прајмера (анилинг, енгл. *annealing*) и елонгације (екстензије) комплементарних ланаца. Првом циклусу увек је претходио корак иницијалне денатурације („*hot start*“ или активација полимеразе) (Табела 6):

Табела 6. Програм за амплификацију ДНК *T.gondii*

КОРАК	ТЕМПЕРАТУРА	ВРЕМЕ	БРОЈ ЦИКЛУСА
UDG* - претретман	50°C	120s	1
Иницијална денатурација	95°C	300s	1
Денатурација	95°C	15 s	45
Анилинг / екстензија	60°C	60s	

* UDG - Урацил ДНК гликозидаза

Резултати PCR реакције анализирани су помоћу софтверског пакета StepOne™ Software v.2.3.

Током истраживања, предузете су све неопходне мере како би се избегла контаминација, укључујући физичко раздвајање простора у којем је рађена екстракција, прављена реакциона смеша и додавана екстрахована ДНК, као и рад у ламинарним коморама са ХЕПА филтерима и УВ светлом, уз употребу заштитне опреме и стерилисаног потрошног материјала.

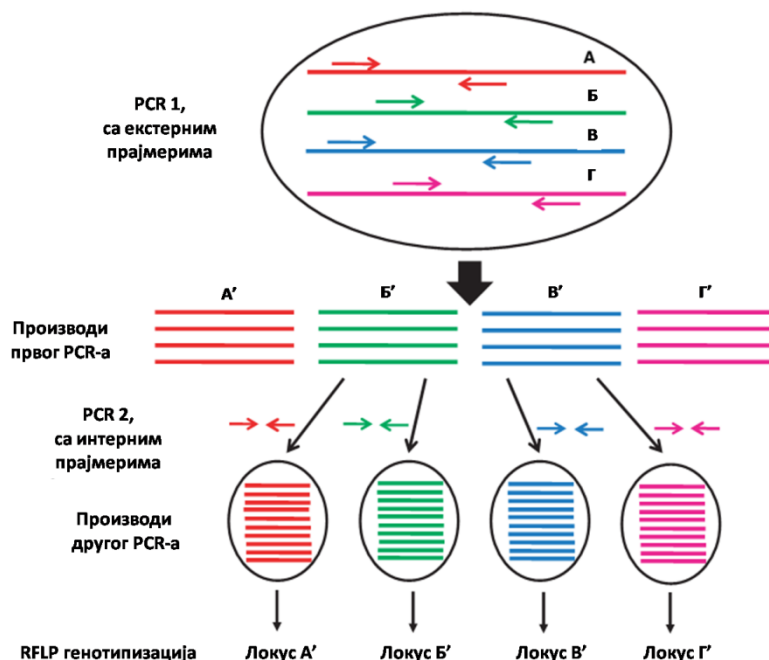
4.5.3 Генотипизација

Припадност *T. gondii* одређеном клонском типу испитивана је анализом полиморфизма дужина рестрикционих фрагмената заснованој на мултиплекс „*nested*“ PCR-у (Mn-PCR-RFLP), коју су развили Su и сар. (2010) и чија се осетљивост сматра десет пута већом од оне коју има класична PCR-RFLP метода.

Метода Mn-PCR-RFLP се изводи у два корака:

1. Одабрани генски локуси се најпре умножавају мултиплекс Mn-PCR-ом, који се састоји из два корака: први корак (PCR 1) је мултиплекс PCR у којим се, помоћу екстерних прајмера амплификују свих шест маркера заједно, други корак (PCR 2) је индивидуални PCR за сваки маркер, помоћу интерних прајмера. За PCR 1 се прави један реакциони микс за све узорке, док се за PCR 2 праве индивидуални реакциони миксеви за сваки маркер. Темплат за PCR 1 је ДНК изолована из одговарајућег узорка док је темплат за PCR 2 реакциони микс из првог корака (Слика 14).

2. Производи Mn-PCR-а се затим секу одговарајућим ензимима (корак дигестије), након чега се врши визуелизација добијених фрагмената електрофорезом на агар гелу



Слика 14. Мултиплекс „nested“ PCR- RFLP генотипизација. Хоризонталне линије представљају секвенце ДНК, а хоризонталне стрелице представљају прајмере (Su и сар., 2010).

Генотипизација је, у случају ове студије, извођена помоћу шест генских маркера (alt. SAG2, VTUB, GRA6, C22-8, PK1 и Apico).

Смеше за Mn-PCR и ензимску дигестију (RFLP) припремане су по узору на Su и сар. (2006) уз модификацију која је подразумевала употребу готовог мастер микса (2X PCR MasterMix, Thermo Fischer Scientific). Укратко, смеша за прву Mn-PCR реакцију се састојала од 1 X PCR MasterMix, 0,15 μ M мешавине екстерних „forward“ (F) и „reverse“ (R) прајмера за сваки од шест маркера и 1,5-3 μ l ДНК узорка (Табела 7). Мешавина прајмера (10X) је прављена тако што је сваки од укупно 12 екстерних прајмера (шест F и шест R) најпре разблажен на концентрацију од 0,15 μ M, а затим је у исту тубицу додавана иста количина сваког од прајмера. Укупна запремина смеше износила је 25 μ l.

За другу Mn-PCR реакцију смеша је прављена за сваки маркер посебно и састојала се од 1 X PCR MasterMix, по 0,30 μ M одговарајућих интерних „forward“ и „reverse“ прајмера и 2–4 μ l производа прве Mn-PCR реакције., тако да укупна запремина смеше

износи 25 μl (Su и сар., 2006). Парови прајмера за амплификацију делова alt. SAG2, BTUB, GRA6, C22-8, PK1 и Arico маркера и њихове секвенце, наведени су у Табели 8, док су одговарајући PCR програми наведени су у Табели 9.

Смеша за ензимску дигестију се састојала од 1 - 2 U ензима, 1X FD пуфера (Fast Digest), воде без нуклеаза и 5 μl производа друге реакције Mn-PCR-а. Коначни волумен смеше износио је 25 μl . Комбинација маркера и одговарајућих рестрикционих ензима, као и температурни режим и дужина трајања ензимске дигестије наведени су у Табели 9.

Табела 7. Састав реакционе смеше за PCR1, PCR2 и RFLP, за појединачан узорак

КОМПОНЕНТЕ PCR1 СМЕШЕ	КОЛИЧИНА	КОМПОНЕНТЕ PCR2 СМЕШЕ	КОЛИЧИНА	КОМПОНЕНТЕ RFLP СМЕШЕ	КОЛИЧИНА
PCR MasterMix (2X)	12,5 μl	PCR MasterMix (2X)	12,5 μl	Пуфер	2,5 μl
Мешавина (F и R) прајмера (0,15 μM)	2,5 μl	Појединачни (F и R) прајмери (0,30 μM)	по 2,5 μl	Ензим(и)	по 0,5 μl
H ₂ O	до 25 μl	H ₂ O	до 25 μl	H ₂ O	до 25 μl
Темплат (ДНК из узорка)	1,5 μl до 3 μl	Темплат (PCR1 реакц.)	2 μl до 4 μl	Темплат (PCR2 реакц.)	5 μl до 7 μl
Укупно:	25 μl	Укупно:	25 μl	Укупно:	25 μl

Табела 8. Секвенце прајмера коришћених за Mn-PCR-RFLP генотипизацију

Маркер	Бр. хромоз.	Екстерни прајмери		Интерни прајмери	
		Назив	Секвенца ^а	Назив	Секвенца ^б
alt. SAG2	VIII	alt. SAG2(f)	F: GGAACGCGAACAATGAGTTT	SAG2-Fa	F:ACCCATCTGCGAAGAAAACG
		alt. SAG2(r)	R: GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	SAG2-Ra	R: ATTTTCGACCAGCGGGAGCAC
BTUB	IX	BTUB(f)	F: TCCAAAATGAGAGAAATCGT	Btb-F	F: GAGGTCATCTCGGACGAACA
		BTUB(r)	R:AAATTGAAATGACGGAAGAA	Btb-R	R: TTGTAGGAACACCCGGACGC
GRA6	X	GRA6(f)	F: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT	GRA6-F1	F: TTTCCGAGCAGGTGACCT
		GRA6(r)	R: GCACCTTCGCTTGTGGTT	GRA6-R1	R: TCGCCGAAGAGTTGACATAG
C22-8	Ib	C22-8(f)	F: TGATGCATCCATGCGTTTAT	C22-8F	F: TCTCTCTACGTGGACGCC
		C22-8(r)	R: CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	C22-8R	R: AGGTGCTTGGATATTCGC
PK1	VI	PK1(f)	F: GAAAGCTGTCCACCCTGAAA	PK1-F	F: CGCAAAGGGAGACAATCAGT
		PK1(r)	R: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	PK1-R	R: TCATCGCTGAATCTCATTGC
Apico	Пластид	Apico(f)	F: TGGTTTTAACCCCTAGATTGTGG	Apico-F	F: GCAAATTCTTGAATTCTCAGTT
		Apico(r)	R: AAACGGAATTAATGAGATTTGAA	Apico-R	R: GGGATTCGAACCCCTTGATA

^а(Su и сар., 2006); ^б(Su и сар., 2010)

Табела 9. Протокол Mn-PCR-RFLP генотипизације (Su и сар., 2010)

Генски маркери	alt. SAG2	BTUB	GRA6	C22-8	PK1	Apico
Екстерни прајмери за PCR 1	alt. SAG2 EF alt. SAG2 ER	BTUB EF BTUB ER	GRA6 EF GRA6 ER	C22-8 EF C22-8 ER	PK1 EF PK1 ER	Apico EF Apico ER
PCR 1 програм	4 min 95°C 30 x 30 s 94°C 1 min 55°C 2 min 72°C					
Интерни прајмери за PCR 2	SAG2 IF SAG2 IR	Btb IF Btb IR	GRA6 IF GRA6 IR	C22-8 IF C22-8 IR	PK1 IF PK1 IR	Apico IF Apico IR
PCR 2 програм	4 min 95°C 35 x 30 s 94°C 1 min 60°C 1,5 min 72 °C					4 min 95°C 35 x 30 s 94°C 1 min 58°C 1,5 min 72 °C
Величина Mn-PCR продукта	546 bp	411 bp	344 bp	521 bp	903 bp	640 bp
Ензим (коришћени изошизомер ^а)	Mbo I FD ^б	BsiE I (Bsh1285I)	Mse I (SaqA I) FD	BsmA I (Alw26 I) FD	Ava I	Afl II (BspT I) FD
		TaqI TANGO ^в		Mbo II	Rsa I	Dde I (HpyF3I)
Температура	37°C	37°C	65°C	37°C	37°C	37°C
Време	30 min	1 h ^г		30 min	30 min	30 min

^а Ензим који препознаје исту секвенцу нуклеотида и сече на истој локацији као и „оригинални“ ензим (прототип)

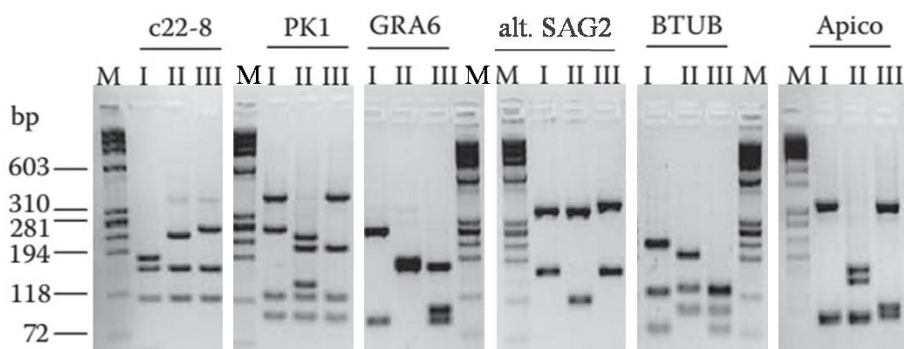
^б FD = „fast digest“ ензим

^в TANGO пуфер (Thermo Scientific), посебно дизајниран за дупле дигестије класичним ензимима (који нису FD)

^г важи за обе температуре

Раздвајање и анализа продуката који су добијени Mn-PCR-RFLP методом вршена је електрофорезом на 2,5% агарозном гелу у трајању од 45 min до сат времена на 90 V. Гел је прављен од 2,5 g агарозе са 100 ml пуфера TAE 1X и бојен са 3 µl етидијум бромид (10 mg/ml). Узорци су у бунарчиће укапавани у количини од 7 µl. Поред узока у бунарчиће гела додавано је и 2 µl "100bp ladder" (Fermentas) који је служио за читавање величине продуката. Гел је после завршене електрофорезе читаван постављањем на УВ трансилуминатор (Gel Documentation system/CCD, Biometra), фотографисан и анализиран одговарајућим софтвером.

Да би се одредили генотипови, фрагменти који су од испитиваних узока добијени Mn-PCR-RFLP методом, су упоређивани са „шаблоном“ који су за одговарајуће маркере дале позитивне контроле (Слика 15). Као позитивна контрола за сојеве типа I је коришћен RH сој, типа II ME49 сој, а као контрола типа III NED сој. Сојеви RH и ME49 се одржавају у НРЛТ, док је ДНК соја NED добијен од проф. Isabelle Villena из Лабораторије за паразитологију и микологију Универзитета у Ремсу у Француској. Осим као кључ за интерпретацију резултата генотипизације, позитивне контроле су служиле и као контрола ефикасности појединих корака MnPCR-RFLP-а.



Слика 15. Пример типичног изгледа фрагмената добијених деловањем рестрикционих ензима на PCR продукте типа I, II и III, добијене умножавањем маркера C22-8, PK1, GRA6, alt. SAG2, Btub и Apico (Su и Dubey, 2009).

4.6. Статистичка обрада података

Преваленца *T. gondii*-специфичних IgG антитела код испитаних свиња, као и одговарајући интервали за ниво поверења 95% (95% CI - confidence intervals), израчунати су употребом *EpiTools online epidemiological calculator* (Sergeant, ESG, 2016). Исти сервис

је коришћен за потребе испитивања везе између типа фарме и присуства специфичних антитела код свиња. У ову сврху, коришћен је *Pearson's Chi-square* тест. Веза између нивоа специфичних антитела и изолације *T. gondii* испитана је помоћу логистичке регресије, у софтверу IBM SPSS Statistics 19. У анализу нису биле укључене свиње са МАТ титром испод 1:25, а виши титрови су, пре извођења анализе, кодирани (титру 1:25 додељена је вредност 1, титру 1:50 вредност 2, и тако редом до највишег измереног титра). У оба случаја, ниво значајности је износио 5%.

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Подаци о животињама

Узорковање крви и ткива свиња спроведено је у периоду јул 2014. - децембар 2015. године. Узорци су узети од укупно 200 јединки: 90 пореклом са комерцијалних фарми, 92 гајених у домаћинствима, за сопствене потребе, и 18 слободно држаних свиња.

Свиње су потицале из 10 насеља (у осам општина), лоцираних на северу Србије, од којих су сва, изузев једног (Смедерево), припадала територији АП Војводине (Слика 16).



Слика 16. Места (општине) порекла свиња од којих су сакупљани узорци

Северни део Србије, коме припада и Војводина, смештен је у Панонској низији, због чега се одликује претежно равничарским рељефом „прошараним“ острвским планинама, алувијалним равнинама, лесним заравнима и пешчарама. Клима у овом делу Србије је континентална.

5.2. Резултати испитивања серума свиња на присуство специфичних IgG антитела против *T. gondii*

Специфична IgG антитела против *T. gondii* су доказана код укупно 21,5% (43/200, 95% CI: 16,4 – 27,7) испитаних свиња, при чему се титар антитела код серопозитивних јединки кретао од 1:25 до 1:400. Није утврђена разлика ($p > 0,05$) у серопреваленци између фармских свиња (17,8%, 16/90, 95% CI: 11,2 – 26,9) и свиња из домаћинства (16,3%, 15/92, 95% CI: 10,1 – 25,2) (Табела 10). Код екстензивно држаних свиња, антитела против *T. gondii* су детектована код чак 12 од 18 јединки (66,7%), али због мале бројности ове животиње нису укључене у статистичку анализу.

Табела 10. Серопреваленца *T. gondii* код свиња кланичног узраста са територије северне Србије

Тип фарме	Општина	Испитано (n)	Позитивно (n / %)	МАТ титар				
				1:25	1:50	1:100	1:200	1:400
Велике фарме								
	А. Шантић ¹	15	15/100	0	9	5	0	1
	Ченеј ²	40	1/2,5	1	0	0	0	0
	Б. Топола ³	15	0/0	0	0	0	0	0
	Сомбор ⁴	20	0/0	0	0	0	0	0
	Укупно:	90	16/17,8	1	9	5	0	1
Домаћинства								
	Лаћарак	52	8/15,4	4	1	0	3	0
	Србобран	5	0/0	0	0	0	0	0
	Свилојево	5	0/0	0	0	0	0	0
	Смедерево	15	4/26,7	3	0	1	0	0
	Кикинда	15	3/20,0	1	1	0	1	0
	Укупно:	92	15/16,3	8	2	1	4	0
Слободне								
	Засавица	18	12/66,7	4	4	3	1	0
УКУПНО:		200	43/21,5	13	15	9	5	1

¹ У даљем тексту Фарма 1; ² Фарма 2; ³ Фарма 3; ⁴ Фарма 4.

Серопреваленца на нивоу фарми је износила 50%, пошто су серопозитивне свиње пронађене на две од четири комерцијалне фарме.

5.3. Организациони и зоохигијенски профил фарми

Зоотехнички подаци су успешно сакупљени у случају три од четири фарме са којих су потекле свиње обухваћене студијом. У случају две фарме (Фарме 1 и 2), подаци су

сакупљени током обиласка самих фарми, увидом у затечено стање и разговором са дежурним ветеринаром. Подаци о преосталој фарми (Фарма 3) су сакупљени путем телефонског интервјуа са једним од запослених ветеринара. Прикупљени подаци су сумирани у Табели 11.

Табела 11. Зоотехнички подаци сакупљени за фарме са којих су потекле испитане свиње

Врста података	Фарме		
	Фарма 1	Фарма 2	Фарма 3
Организација производње	затворени систем ^а	затворени систем	затворени систем
Тип објеката	комбиновани ^б	Комбиновани	затворен
Храна			
Врста	концентрат, силажа	концентрат, силажа	концентрат, силажа
Порекло	комерцијална	сопствена производња	сопствена производња
Биосигурносне мере			
Дезинфекционе баријере	одсутне	на улазу у фарму	на улазу у објекте
Пунктови за дезинфекцију руку	одсутни	на улазу у фарму	на улазу у објекте
Пресвлачење	нема	пре уласка на фарму	пре уласка на фарму
Хигијена ^в	1	3	4 ^г
Друге животиње			
На фарми	пси, мачке, глодари	пси, мачке, глодари	пси, мачке, глодари
У објектима	голубови, глодари	глодари	глодари
Контакт с лешевима	нема података	да	да
Дератизација			
Извођач	екстерна фирма	екстерна фирма	сопствена служба
Контролна мера	мамци	мамци	мамци

^а Зокружени циклус производње код ког се на истој фарми врши и производња и тов прасади (енгл. *farrow-to-finish*)

^б Комбинација затворених и објеката са испустом

^в На скали 1 до 5, при чему 1 означава најнижи, а 5 највиши ниво хигијене

^г Ефикасност дезинфекције просторија проверава се микробиолошким методама пре уласка нових свиња у тов

Као што се види у Табели 9, Фарма 1, код које је утврђена изузетно велика серопреваленца (100% - специфична антитела су пронађена код свих 15 испитаних свиња), разликовала се од Фарме 2 и Фарме 3 по пореклу коришћене хране (комерцијална vs. мешана на фарми). На овој фарми је уочено и генерално одсуство биосигурносних мера, као што су дезинфекција руку и обуће и пресвлачење посетилаца приликом уласка на фарму. Такође, изнад боксева појединих објеката на Фарми 1 је примећено интензивно сакупљање голубова. Интересантно је да је свих десет крмача са Фарме 1, од којих су узорци крви узети накнадно, имало негативне резултате серолошких испитивања.

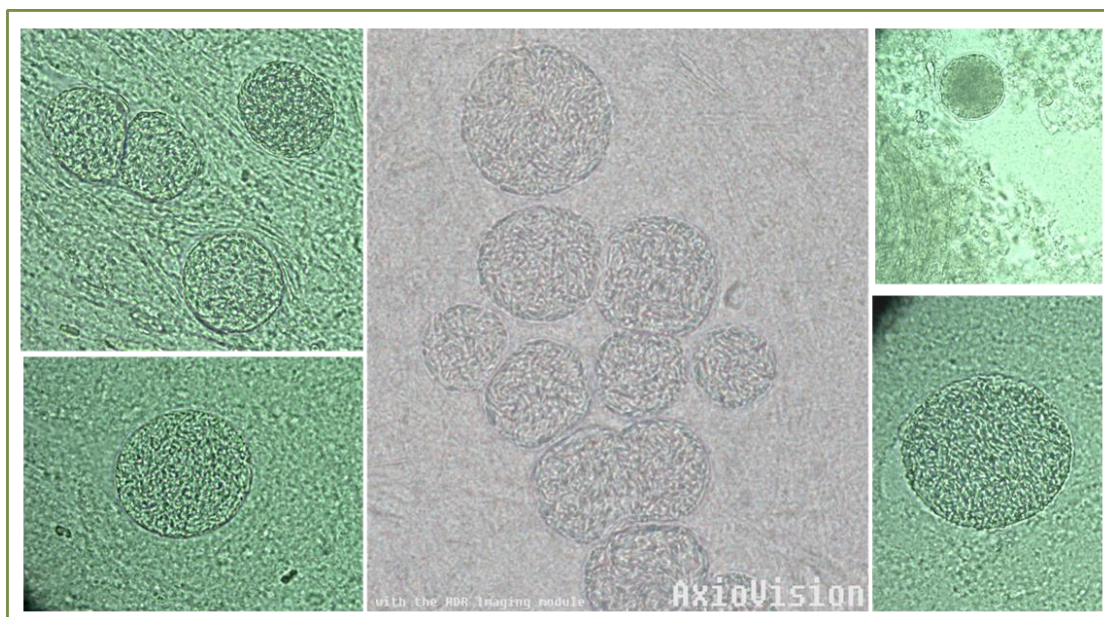
5.4. Резултати биолошког огледа

Биолошки оглед је постављен за 30 од 43 серопозитивне свиње (из техничких разлога, оглед није могао бити постављен за 13 серопозитивних животиња), као и за 20 серонегативних свиња. Укупно 12 БО је дало позитиван резултат (Табела 12).

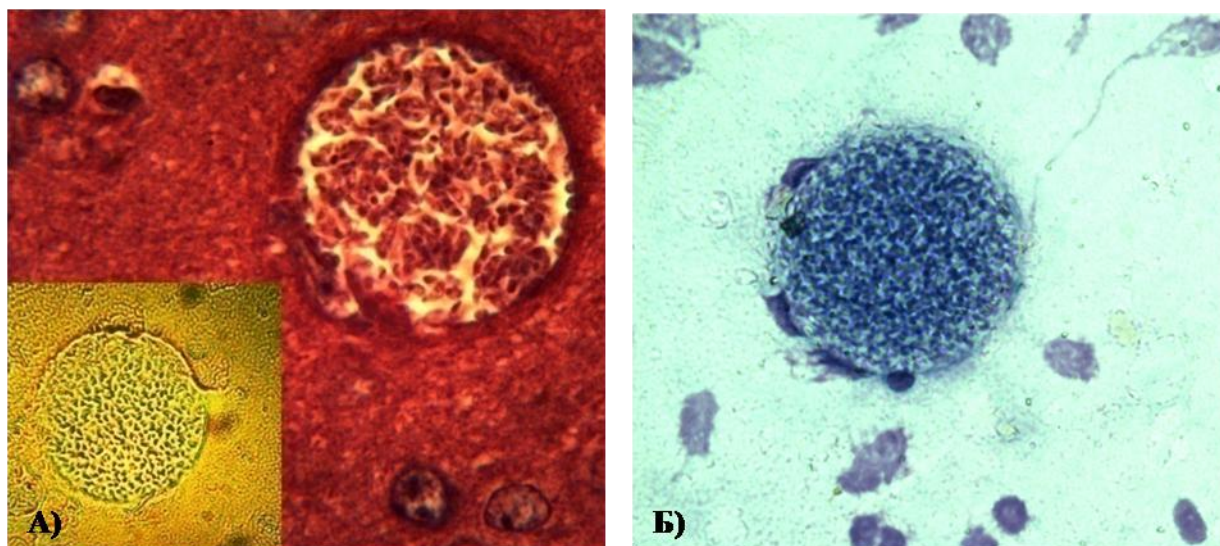
Табела 12. Степен иолације вијабилне *T. gondii* у односу на серолошки статус свиња за чија ткива је постављан БО

Резултати МАТ-а	Стављено у оглед	Позитиван БО	
		n	%
Позитивно	30	11	36,7
Негативно	20	1	5
УКУПНО:	50	12	24

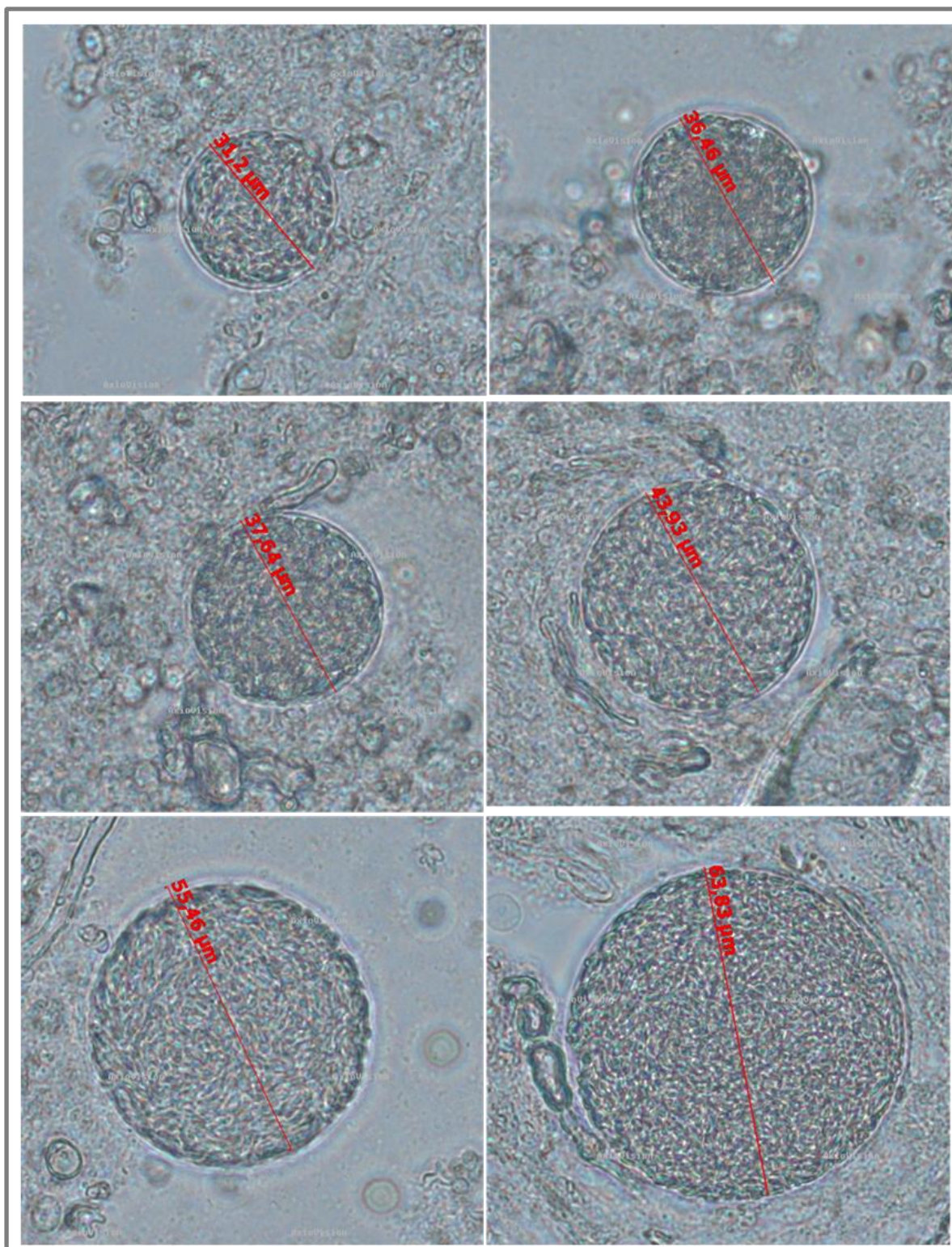
Једанаест огледа је проглашено позитивним на основу истовременог налаза циста (Слика 17 и 18) и специфичних IgG антитела код инокулисаних мишева, док је један БО био позитиван само на основу серопозитивности мишева (Табела 13). Концентрација циста у хомогенатима мозга мишева из биолошких огледа кретала се од 10 циста/ml хомогената до 710 циста/ml, а просечна величина 37 насумично изабраних циста износила је 51,7 μm (Слика 18).



Слика 17. Појединачне цисте и цисте у „гроздовима“, детектоване у мозгу мишева из биолошког огледа (увећање 400 X)



Слика 18. Цисте у отиску мозга миша, обојеног Eriochrome-ом (А) и по Giemsa-и (Б)



Слика 19. Пример циста *T. gondii* у хомогенатима мозга из биолошког огледа (увећање 400 X)

Табела 13. Свиње у чијим ткивима је детектована вијабилна *T. gondii*

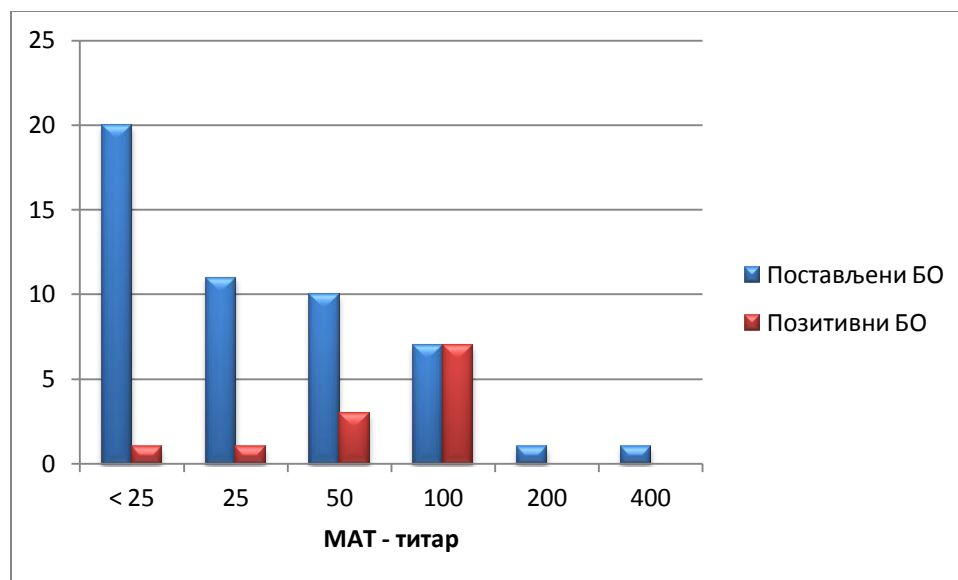
Редни бр.	ID број свиње	Титар антитела ^а	Биолошки оглед	
			Мишеви са цистама/ мишеви у БО	МАТ-позитивни мишеви/ мишеви у БО
1.	БМ 17	< 25	2/2	2/2
2.	НО 27	25	1/2	1/2
3.	НФ 52		2/2	2/2
4.	НФ 50	50	0/2	1/2
5.	БМ 1		1/2	1/2
6.	НО 4		2/2	2/2
7.	НФ 47		1/2	1/2
8.	НФ 48		1 ^б /2	1/2
9.	НФ 51	100	1 ^б /2	1/2
10.	НФ 56		1 ^б /2	1/2
11.	НФ 57		1/2	1/2
12.	БМ 6		2/2	2/2

^а Реципрочна вредност

^б Један миш је угинуо пре истека БО; у отисцима ткива нису нађени паразити.

^в Један миш је угинуо пре истека БО; из техничких разлога, органи нису били доступни за преглед.

Сви добијени изолати *T. gondii*, осим једног, потицали су од серопозитивних свиња. Иако је паразит чешће изолован из ткива свиња чији је титар антитела износио $\geq 1:100$ (75%, наспрам 17,6% код свиња са титром $\leq 1:50$) (Графикон 1), веза између титра антитела и степена изолације није доказана ($p=0,054$).



Графикон 1. Приказ резултата биолошког огледа у односу на титар антитела специфичних за *T. gondii*

Анализом пратећих података свиња са позитивним резултатима биолошког огледа, уочено је да је вијабилна токсоплазма пронађена у ткивима свиња из сва три система узгоја (свиње гајене на фарми, у домаћинству и слободно) (Табела 14).

Табела 14. Резултати биолошког огледа у односу на порекло (тип фарме) свиња

Тип фарме	Укупно узето узорака	Биолошки оглед		
		испитано	n	%
Комерцијална	90	21	2	9,5
Домаћинство	92	23	6	26,1
Слободне	18	6	3 ^a	50
УКУПНО:	200	50	12	24

^a Од тога, једна свиња са МАТ-титром < 1:25

Током истраживања, угинуло је укупно четири миша (три из позитивних и један из негативног БО), између 10. и 15. дана након инфекције. Из техничких разлога, обојене препарате отисака ткива било је могуће направити само за два угинула миша, али ни у једном нису пронађени развојни облици *T. gondii*.

5.5. Резултати qPCR-а у дигестима ткива

Молекуларном испитивању на присуство *T. gondii* подвргнуто је укупно 58 узорака ткива – 49 дигеста ткива (дијафрагми и срца) од 50 који су ушли у БО, као и једна

дијафрагма и осам дигеста срца који нису стављени у БО. Паразитска ДНК је детектована у ткивима укупно 12 свиња, осам серопозитивних и четири серонегативне. Позитивни резултати PCR-а добијени су за ткива пет свиња са позитивним БО, пет свиња са негативним БО и две свиње за које оглед није постављен, односно није могао бити прочитан. Са друге стране, ДНК *T. gondii* није пронађена у ткивима седам свиња са позитивним БО (Табела 15).

Табела 15. Свиње у чијим ткивима је детектована токсоплазма – молекуларним методама и/или биолошким огледом

Редни бр.	ID број свиње	МАТ титар ^а	Биолошки оглед		qPCR	Врста ткива
			Цисте	МАТ		
1.	НО 15		-	-	+	дијафрагма
2.	НО 23		-	-	+	дијафрагма
3.	НФ 20	< 25	НП	НП	+	дијафрагма
4.	БМ 17		+	+	+	срце
5.	НО 27		+	+	+	дијафрагма
6.	ЛА 28	25	-	-	+	дијафрагма
7.	НФ 52		+	+	-	дијафрагма
8.	НФ 50		-	+	-	дијафрагма
9.	БМ 1	50	+	+	+	срце
10.	БМ 12		НП*	НП*	+	срце
11.	НО 4		+	+	-	дијафрагма
12.	НФ 47		+	+	-	дијафрагма
13.	НФ 48		+	+	+	дијафрагма
14.	НФ 51	100	+	+	-	дијафрагма
15.	НФ 56		+	+	-	дијафрагма
16.	НФ 57		+	+	-	дијафрагма
17.	БМ 6		+	+	+	срце
18.	НО 22	200	-	-	+	дијафрагма
19.	НФ 49	400	-	-	+	дијафрагма

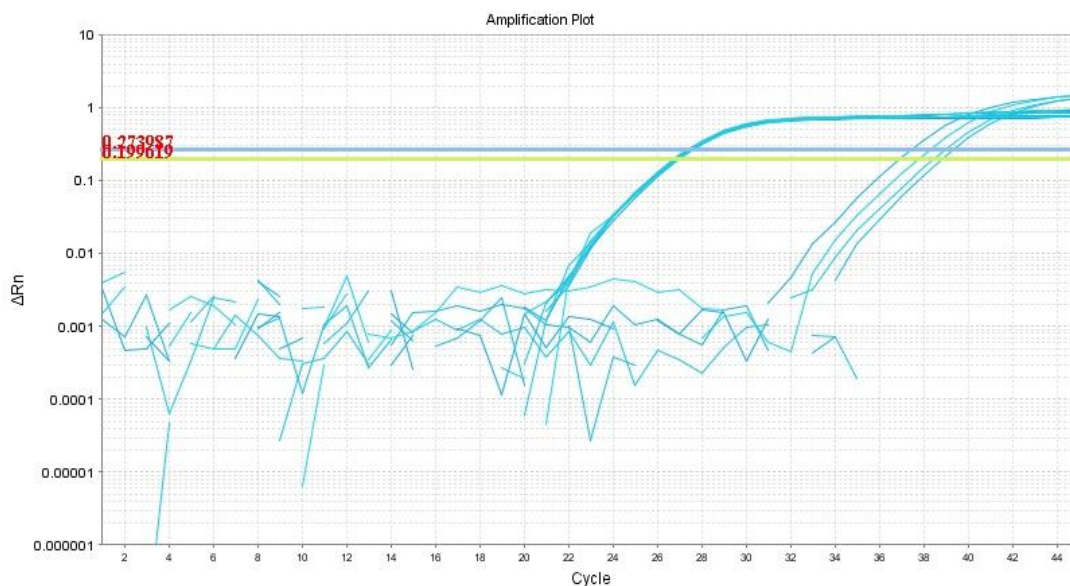
^а Реципрочна вредност

НП = нема података (узорци нису могли бити прегледани из техничких разлога),

НП* = нема података (из техничких разлога, БО није постављен).

Сумирањем резултата обе методе (БО и qPCR-а) види се да су на присуство *T. gondii* испитана (барем једном методом) ткива укупно 59 свиња, и да је паразит пронађен у 19 случајева и то у 15 од 45 (33,3%) испитаних дијафрагми и у четири од укупно 14 (28,6%) испитаних срца.

Приликом читавања резултата qPCR-а, нису примећени знаци контаминације реагенаса (позитивне и негативне контроле су дале очекиване резултате), као ни присуства PCR инхибитора (вредности позитивне интерне контроле су такође биле задовољавајуће) (Слика 20).



Слика 20. Приказ амплификационе криве qPCR-а за узорке 5, 13, 16, 21, 23. ΔRn представља интензитет флуоресцентног сигнала генерисаног током PCR реакције. Зелена и плава хоризонтална линија представљају граничну вредност флуоресценције изнад којег су интерне контроле (зелена) односно испитивани узорци (плава) сматрани позитивним

5.6. Генотипизација

Генотипизација је покушана за све узорке ткива у којима је доказано присуство *T. gondii*, било путем qPCR-а или Б.О., изузев узорка који је у БО био позитиван само на основу серологије. Метода је извођена и директно, на дигестима ткива, и индиректно, на мозговима мишева из биолошког огледа. Испитани материјал је потицао од укупно 18 свиња (осам фармских, шест из домаћинства и четири слободно држане).

Анализом фрагмената добијених деловањем рестрикционих ензима на M_n-PCR продукте, одређивање генотипа је било могуће за укупно девет изолата *T. gondii*; два изолата су идентификована као тип III, а седам као тип II (Слике 21-26). Код појединих

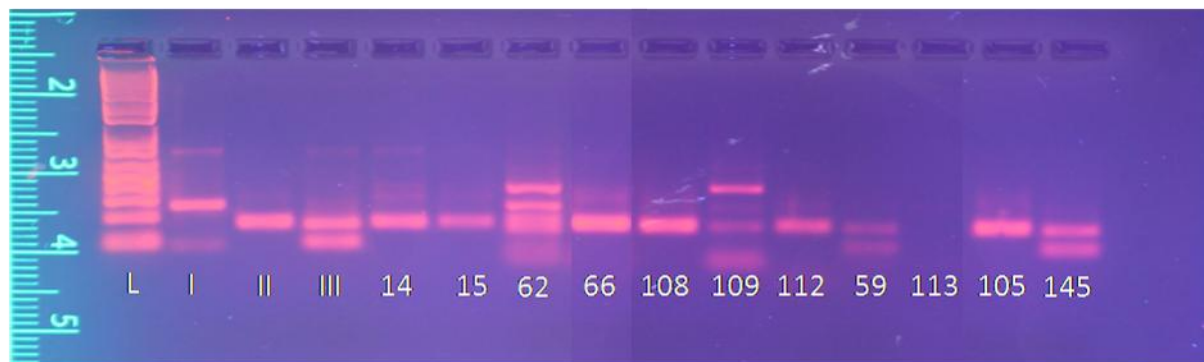
узорака је сасвим изостало умножавање једног или више маркера (Табела 16); у случају *Apico* маркера, због неодређених резултата (Слика 26) прецизна детерминација типа није била могућа ни за један од испитаних узорака.

Због варијација у ефикасности методе, које су биле присутне између различитих узорака истог порекла, за потребе ове дисертације приказани су резултати само оног узорка који је најбоље репрезентовао дати изолат, при чему је, када год је то било могуће, предност давана дигесту ткива, као изворном узорку. Изузетак у погледу презентације резултата је направљен у случају изолата 6БМ. Код овог изолата, генотипизација из дигеста није успела, али су зато код оба миша из огледа добијени резултати умножавања за свих шест маркера. Због тога је одлучено да се покажу резултати за оба миша, као демонстрација успешног повећања осетљивости Mn-PCR-RFLP методе пасажом паразита кроз мишеве.

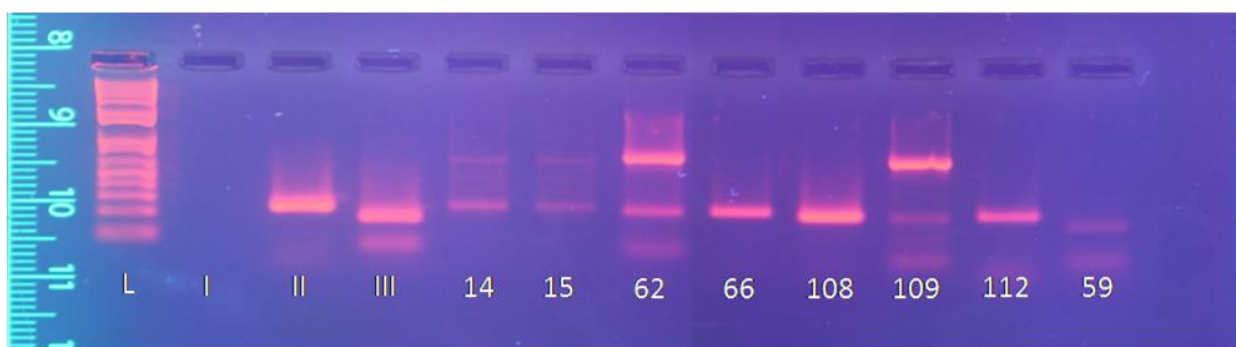
Табела 16. Резултати MnPCR-RFLP генотипизације

Бр.	Шифра узорка	Генски маркери						Тип	Порекло свиње	Врста узорка
		GRA6	alt. SAG2	PK-1	VTUB	C22-8	Apico			
1	НФ56/112	II	II	НУ	НУ	НУ	НУ	II	Ф	мозак
2	НО4/145	III	III	III	III	III	II/III	III	Д	мозак
3	НФ47/105	II	II	II	II	II	II/III	II	Ф	мозак
4	НФ48/59	III	III	НУ	III	II	НУ	III	Ф	дигест
5	НФ51/66	II	II	II	II	II	II/III	II	Ф	мозак
6	НФ52/108	II	II	II	II	II	II/III	II	Ф	Мозак
7	БМ17/113	НУ	II	НУ	II	II	НД	II	М	дигест
8	НФ57/62	II	II	II	II	II	НУ	II	Ф	мозак
9	6БМ/14	II	II	I/II	II	II	III	II	М	мозак
	6БМ/15	II	II	I/II	II	II	III	II	М	мозак

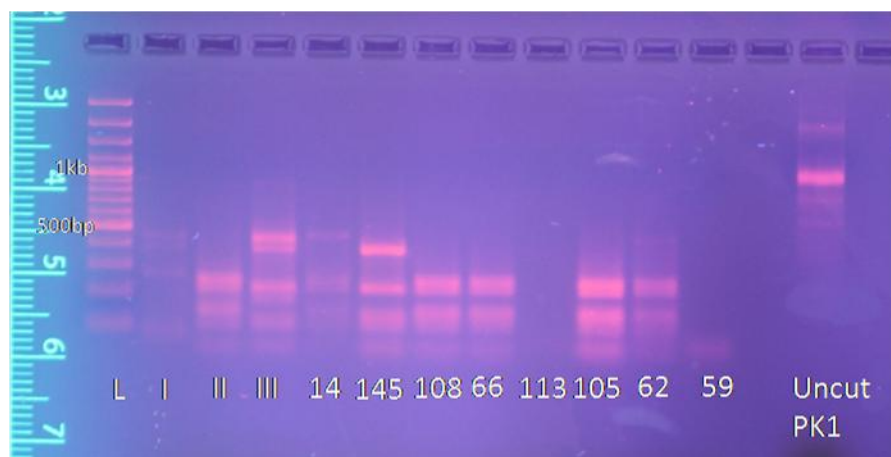
Ф=фарма, Д=домаћинства, М=мангулица,
НУ = није умножен; НД = није детерминисан.



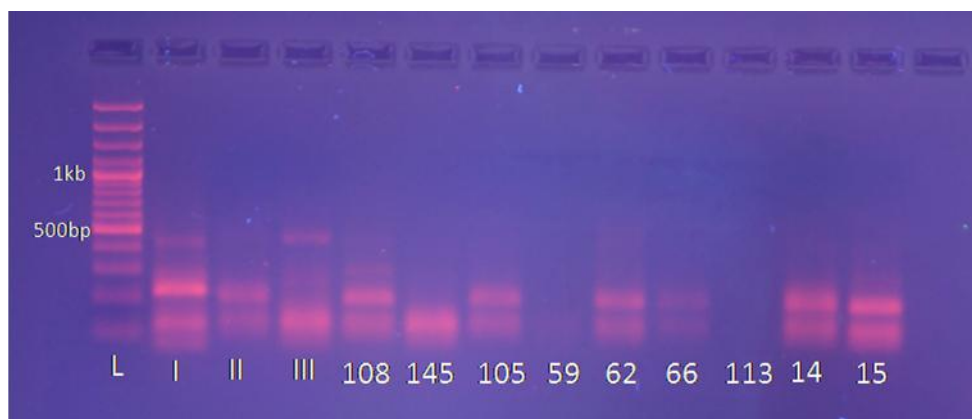
Слика 21. Фрагменти добијени деловањем рестрикционих ензима, за маркер GRA 6; L – „ladder“; I, II, III – позитивне контроле тип I, II III; 14-145 – узорци



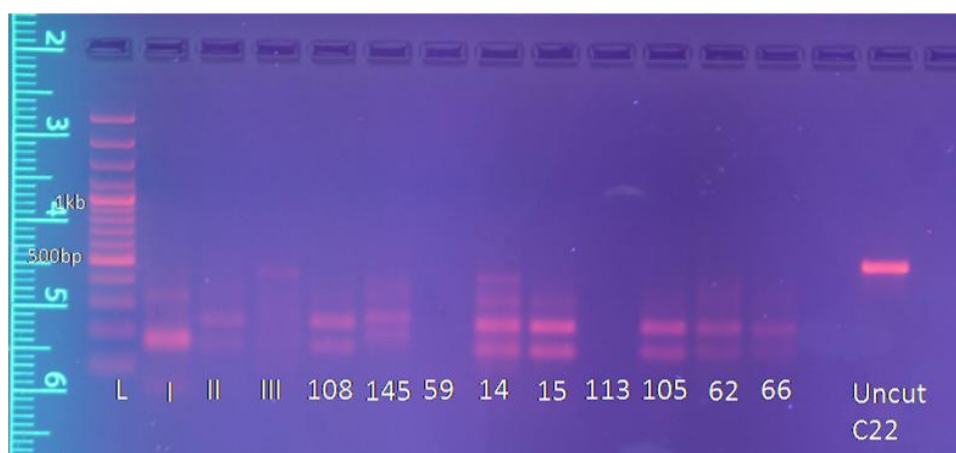
Слика 22. Фрагменти добијени деловањем рестрикционих ензима, за маркер alt. SAG 2; L – „ladder“; I, II, III – позитивне контроле тип I, II III; 14-109 – узорци



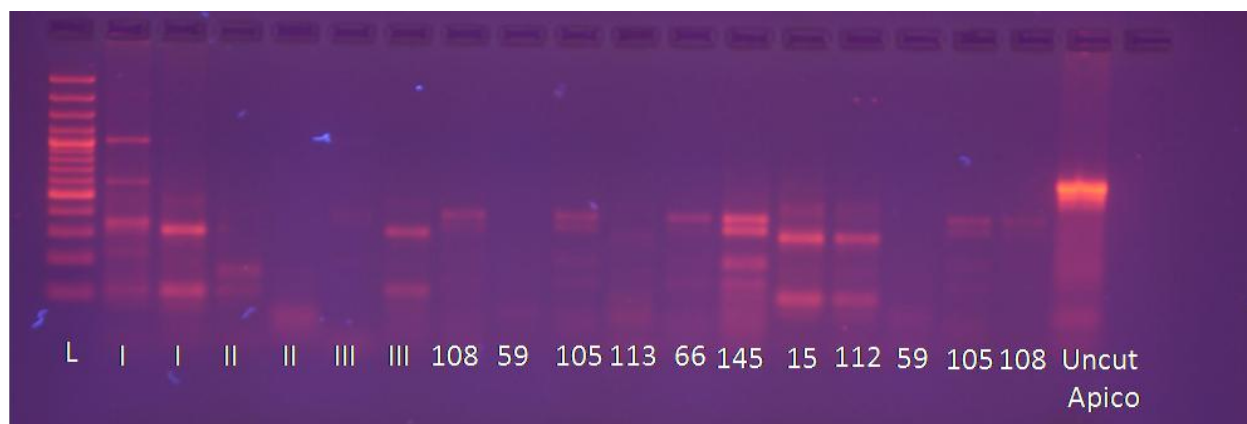
Слика 23. Фрагменти добијени деловањем рестрикционих ензима, за маркер PK 1; L – „ladder“; I, II, III – позитивне контроле тип I, II III; 14-145 – узорци



Слика 24. Фрагменти добијени деловањем рестрикционих ензима, за маркер BTUB; L – „ladder“; I, II, III – позитивне контроле тип I, II III; 14-145 – узорци



Слика 25. Фрагменти добијени деловањем рестрикционих ензима, за маркер C22-18; L – „ladder“; I, II, III – позитивне контроле тип I, II III; 14-145 – узорци



Слика 26. Фрагменти добијени деловањем рестрикционих ензима, за маркер Apico; L – „ladder“; I, II, III – позитивне контроле тип I, II III; 14-145 – узорци

6. ДИСКУСИЈА

Након више од једног века истраживања, којима се тек препознати и, лишманији сличан паразит трансформисао у зооноски патоген светске дистрибуције и значаја, поједини аспекти инфекције *T. gondii* још увек нису сасвим разјашњени. Једно од питања које заокупља пажњу истраживача са аспекта безбедности хране јесте корелација присуства специфичних антитела у серуму производних животиња и живог паразита у њиховим ткивима. Иако су серолошке методе усавршене у погледу осетљивости и специфичности, једино што се и даље са сигурношћу може рећи у случају позитивног серолошког налаза јесте да је животиња у одређеном тренутку свог живота била инфицирана токсоплазмом. Имајући у виду да паразит након инфекције годинама перзистира у ткивима домаћина, серопозитивност указује на присуство ткивних циста *T. gondii*, али питање њихове вијабилности, кључно са аспекта безбедности меса ових животиња за људску исхрану, остаје неодговорено.

Истраживања су показала да домаћа свиња (*Sus scrofa domesticus*) представља важан резервоар *T. gondii* (Dubey, 2009б). Иако у погледу серопреваленте генерално заостају за великим и малим преживарима, свиње представљају једног од прелазних домаћина у чијим су ткивима инфективне цисте најзаступљеније (Tenter и сар., 2000). Вијабилни паразити су детектовани како у свежем свињском (Bayartí и сар., 2012; Wang и сар., 2012), тако и у различитим производима од меса (Dias и сар., 2005; Gomez-Sambles и сар., 2015), а конзумација термички недовољно обрађене свињетине је успешно повезана са случајевима хумане токсоплазмозе (Choi и сар., 1997; Pereira и сар., 2010). Студије спроведене у Србији су показале да конзумација ТНО меса, генерално, представља један од фактора ризика за инфекцију људи токсоплазмом. Међутим, када је у анализу укључена и врста конзумираног меса, само је говедина успешно повезана са повећаном инциденцом хумане инфекције (Bobić и сар., 2007). Ипак, чињеница да свињско месо представља

најчешће конзумирану врсту меса у Србији (Klun и сар., 2006), и то често у форми ТНО сухомеснатих производа, подстиче на даља истраживања у овој области.

Сероепизоотиолошке студије спроведене на територији Србије потврдиле су присуство антитела против *T. gondii* код различитих узрасних и производних категорија свиња. Седамдесетих година прошлог века, Десанка Шибалић (Šibalić, 1966) је доказала присуство специфичних антитела код 26% од 466 свиња, закланих у околини Београда. Готово 40 година касније, спроведена је за сада једина студија којом су обухваћени сви региони Србије, а у којој су Klun и сар. (2006) пронашли антитела код укупно 28,9% од 605 испитаних свиња. Новија истраживања исте групе аутора (Klun и сар., 2011) доказала су антитела код 9,2% (45/488) свиња закланих на територији Београда. Осим по географском пореклу, узорак из ове студије се, у односу на претходно испитани узорак, разликовао по значајно већем уделу млађих животиња (< 8 месеци), што је допринело нижој укупној серопреваленци. Низак ниво (4,5%) специфичних антитела пронађен је и код 134 испитане свиње са територије Бачке (Kurusu и сар., 2014).

У нашој студији, IgG антитела против *T. gondii* пронађена су код 21,5% укупно испитаних свиња са територије северне Србије. Ово је мање од 33,3% које су Klun и сар. (2006) пронашли на претходно испитаном узорку од 447 свиња са севера Србије. Уколико се, међутим, у обзир узму само свиње кланичног узраста, разлика у серопреваленци постаје незнатна (15,2% свиња у студији Klun и сар., у односу на 17,0% свиња из наше студије). У Европи, преваленца специфичних антитела код свиња варира између 0% и 64% (Genchi и сар., 1991; Kijlstra, Eissen и сар., 2004). Имајући ово у виду, укупна серопреваленца код свиња у нашој студији могла би се сматрати умерено високом. Такође би се могло рећи да је серопреваленца код свиња са севера Србије упоредива са вредностима пријављеним у Румунији (23,1%) (Paștiu и сар., 2013), Швајцарској (23,3%) (Berger-Schoch, Bernet и сар., 2011) и северној Шпанији (24,5%) (Herrero и сар., 2016). При томе се, наравно, не сме изгубити из вида да се наведене студије међусобно разликују у погледу врсте коришћених серолошких тестова и њихових граничних вредности, величине испитиваног узорка, географског порекла животиња, њихове старости и припадности одређеној производној категорији, што директно утиче на резултат сваке појединачне студије.

Код већине серопозитивних животиња у овој студији ниво антитела је био низак – 65,1% (28/43) свиња је имало титар $\leq 1:50$, 20,9% (9/43) је имало титар 1:100, 11,6% (5/43) је имало титар 1:200, док је свега 2,3% (1/43) имало највиши измерени титар од 1:400. Низак ниво антитела против *T. gondii* је чест налаз код природно инфицираних свиња, а варијације које се уочавају између јединки унутар исте фарме могу бити условљене временом настанка инфекције, разликом у реактивности имунског система животиња, разликама у инфективним облицима које су животиње унеле и разликама у вируленцији између сојева (Dubey, 2009б; Veronesi и сар., 2011; Dubey и сар., 2012).

Истраживања посвећена факторима ризика од инфекције свиња са *T. gondii*, истичу контакт са глодарима, мачкама, спољашњом средином и испашу као неке од чинилаца који значајно повећавају вероватноћу инфекције свиња овим паразитом. Због тога се сматра да су свиње узгојене на органским фармама, као и другим системима који подстичу природно понашање животиња, изложене већем ризику од инфекције, у односу на свиње гајене у контролисаним условима затворених објеката. Резултати сероепизоотиолошких студија генерално подржавају ову теорију. Dubey и сар. (2012) су тако антитела против *T. gondii* пронашли код 90,9% (30/33) органски гајених свиња, док је у студији коју су извели Васси и сар. (2015) ова вредност износила чак 95,2% (20/21). Серопреваленца коју су код слободно држаних свиња у Холандији, нашли Van der Giessen и сар. (2007) била је далеко нижа (5,6 %), али је ризик од детекције антитела против *T. gondii* и даље био готово 16 пута већи код ове категорије него код интензивно гајених свиња. До сличних резултата, нешто раније, дошла је још једна група истраживача из Холандије (Kijlstra, Eissen и сар., 2004). У Швајцарској, Berger-Schoch, Bernet и сар. (2011) нису уочили разлику у серопреваленци између класично и слободно држаних свиња, али су регистровали пораст серопреваленце код свиња у затвореном систему узгоја, у односу на претходне године, и изразили сумњу да би узрок ове промене могла бити имплементација новог закона о добробити животиња, који подразумева увођење сламе и других природних материјала у објекте за узгој, чиме је, по њиховом мишљењу, нарушен дотадашњи високо-хигијенски статус фарми. У овој студији, највећи ниво серопозитивности (66,7%) је детектован управо код слободно држаних животиња. Међутим, све „слободне“ свиње из наше студије су истовремено припадале и раси мангулица, којој је, у екстензивним условима гајења потребно најмање 18 месеци да достигне тржишну тежину (Živković и Perunović, 2012). То

значи да су ове свиње у тренутку клања биле два до три пута старије у односу на фармске свиње и свиње из домаћинства. Због тога је у овом конкретном случају немогуће са сигурношћу рећи да ли је висока серопреваленца првенствено последица слободног начина држања или веће старости овако држаних свиња, која је такође идентификована као фактор ризика (Edelhofer, 1994; Venturini и сар., 2004; Klun и сар., 2006). У студији спроведеној у Швајцарској, узраст свиња се, на пример, показао значајнијим фактором ризика у односу на начин њиховог држања (класично vs. слободно) (Berger-Schoch, Bernet и сар., 2011).

Већина студија се такође слаже да су свиње гајене у интензивним условима под мањим ризиком од инфекције токсоплазмом у односу на свиње држане у домаћинствима. Оваква ситуација се објашњава одсуством биосигурносних мера у објектима у којима се свиње гаје за сопствене потребе, генерално лошијим хигијенским условима у односу на фарме, ближим контактом са другим животињама, као и честом исхраном отпацама са трпезе (Klun и сар., 2011; Paštiu и сар., 2013; Cademartori и сар., 2014; Djokic, Fablet и сар., 2016). У нашој студији, разлика у серопреваленци *T. gondii* између свиња гајених на комерцијалним фармама и свиња гајених у домаћинствима није примећена ($p > 0,05$). Међутим, на серопреваленцу код фармских свиња у нашој студији је у великој мери утицала висока преваленца утврђена на Фарми 1, са које је потекло 15 од 16 серопозитивних фармских свиња.

На Фарми 1, антитела су пронађена код 100% испитаних свиња, док се на осталим фармама проценат позитивних свиња кретао од 0% (Фарма 3 и 4) до 2,5% (Фарма 2). Током посете фармама нису уочене значајније разлике у погледу њихове организације, присуства других животињских врста и контроле глодара. У појединим објектима Фарме 1 јесте уочено окупљање великог броја голубова, међутим, с обзиром на то да ни на другим фармама није уочено присуство заштитних мрежа⁵, присуство голубова се, иако није потврђено, не може искључити. Интересантно је да су на Фарми 1 свиње храњене готовом смешом за исхрану, за разлику од друге две фарме где су компоненте хране мешане на самој фарми. Иако би употреба комерцијалне хране требала да представља заштитни фактор код инфекције са *T. gondii*, могуће је да су у конкретном случају већи значај имали

⁵ У истраживању које су спровели Davies и сар. (1998), постављање мрежа, које су онемогућавале улазак птица у објекте, повезано је са значајним смањењем серопреваленце токсоплазматске инфекције код свиња на фарми.

услови чувања хране, који су на све три фарме били такви да су, у мањој или већој мери, омогућавали контакт хране са околином и другим животињским врстама примећеним на фарми. Значајна разлика међу фармама уочена је у погледу нивоа хигијене и биосигурности, који су били очигледно лошији на Фарми 1, у поређењу са Фармом 2 и, нарочито, Фармом 3. Иако је број фарми обухваћених студијом сувише мали за озбиљније испитивање потенцијалних фактора ризика, наведени подаци говоре у прилог констатацији да присуство антитела против *T. gondii* представља добар показатељ хигијенског статуса и биосигурности дате фарме (Damriyasa и сар., 2004; Venturini и сар., 2004). С обзиром на то да је на свим фармама уочено присуство других животињских врста, а да је Фарма 3 била једина од три испитане фарме са потпуно затвореним системом држања, могуће је да је приступ свиња оборима, као местима појачаног контакта са околином, односно другим животињама, био фактор који је допринео већем нивоу инфекције на Фармама 1 и 2, као што је примећено у неким другим студијама (García-Vosaneira, Dubey и сар., 2010). Међутим, како су на свакој од четири фарме идентификовани извесни пропусти у погледу менаџмента и/или биосигурности, такође је могуће да је виша преваленца специфичних антитела, која је пронађена код свиња са Фарме 1, просто „ствар случаја“ – последица једнократног излагања испитаних животиња инфективним облицима *T. gondii*, путем контаминираног контигента хране или воде. У прилог овом објашњењу говори и одсуство специфичних антитела код накнадно тестираних крмача са исте фарме, нарочито због чињенице да се, на било којој фарми, највиши ниво инфекције очекује управо код ове категорије свиња (Edelhofer, 1994; Klun и сар., 2006).

Без обзира на то који сценарио је био одговоран за инфекцију свиња на Фарми 1, њено присуство говори у прилог следећем:

- а) Било који вид држања свиња може представљати фактор ризика уколико подразумева постојање путева којима се омогућава контакт свиња са ооцистама *T. gondii*. Односно, увођењем мера којима се ови путеви прекидају, може се значајно допринети смањењу степена токсоплазматске инфекције код свиња у било ком систему узгоја (Weigel и сар., 1995). Ово се показало тачним у случају недавно објављене француске студије (Djokic, Fablet и сар., 2016), у којој је увођење тзв. „данског улаза“, који онемогућава директан улазак у објекат

(захваљујући својеврсној комори са системом врата која се сукцесивно отварају) и пружа могућност санитације и пресвлачења посетиоцима објекта, идентификовано као заштитни фактор у погледу инфекције свиња токсоплазмом.

- б) Иако су свиње које се гаје у контролисаним условима интензивне производње генерално најмање изложене ризику од инфекције, када до пропуста у оваквим системима ипак дође, животиње, због велике концентрације јединки у затвореном простору, лакше долазе у контакт са извором инфекције (Herrego и сар., 2016).

Након инфекције, цисте *T. gondii* могу бити присутне у практично било ком ткиву животиње (Hill и Dubey, 2002), али се у неким органима, као што су: мозак, језик, срце и дијафрагма (Edelhofer, 1994; Dubey и сар., 1996; Dos Santos и сар., 2005), чешће налазе. За потребе изолације, у овој студији је коришћена дијафрагма (осим у случају слободно држаних свиња код којих је на анализу достављано срце). Поред тога што има малу економску вредност, због чега се њеним узорковањем кланици не наноси економска штета, дијафрагма представља и добар модел јестивог попречно-пругастог мишића. У нашој студији, токсоплазма и/или њена ДНК је детектована у укупно 32,2% (19/59) испитаних узорака ткива; цисте су у незнатно вишој мери пронађене у узорцима дијафрагме (33,3%) него у узорцима срца (28,6%). Од 19 узорака ткива позитивних на *T. gondii*, 15 је потицало од серопозитивних свиња, док су четири припадала серонегативним свињама. Вијабилни паразити су пронађени код 24% (12/50) животиња за које је постављен биолошки оглед; у случају 11 огледа, вијабилност је доказана истовременим налазом циста и специфичних антитела, док је један оглед проглашен позитивним само на основу серопозитивности (МАТ титар > 1:40) инокулисаног миша. Један од могућих узрока негативног паразитолошког налаза код овог миша може бити ниска концентрација циста у мозгу, која је претходно већ примећена у случају два миша, код којих је концентрација износила ≤ 10 циста у 1 ml хомогената мозга, а којој су, у својим истраживањима, сведочили и други аутори (Dubey, Thulliez и Powell, 1995). Друго објашњење би могло бити да цисте заиста нису биле присутне у мозгу серопозитивног миша што, са друге стране, не искључује могућност њиховог присуства у другим органима. Наиме, иако се показало да је код мишева мозак највероватније место налаза циста *T. gondii*, код неких сојева (као што је GT-1 сој *T. gondii*, изолован из козе)

примећено је задржавање паразита у плућима током неколико недеља, због чега га је лакше детектовати у њима него у мозгу (Dubey, 2009a).

Процент серопозитивних свиња са позитивним резултатом биолошког огледа у нашој студији је износио 36,7% (11/30), што је приближно вредностима добијеним у неким другим земљама: 40,5% у САД (Dubey, Thulliez и Powell, 1995) и Португалији (De Sousa и сар., 2006) и 42,1% у Шпанији (Herrero и сар., 2016). Иако је већина (75%) изолата из наше студије потицала из свиња чији је титар антитела био $\geq 1:100$, веза између титра и резултата биолошког огледа ипак није пронађена ($p=0,054$). До сличног закључка дошли су и неки други аутори (Dos Santos и сар., 2005; Wang и сар., 2012; Gomez-Sambblas и сар., 2015), при чему можда најдрастичнији пример представља студија коју су извели Gajadhar и сар. (1998), у којој токсоплазма није изолована ни из једне од 2800 испитаних свиња, упркос обећавајућим серолошким и молекуларним налазима. Због тога, ови аутори закључују да серопозитивност животиње не треба сматрати прецизним показатељем ризика од инфекције људи. Са друге стране, постоје и студије (Work, 1967; Dubey, Thulliez и Powell, 1995; Herrero и сар., 2016) чији резултати говоре у прилог томе да изолација *T. gondii* из ткива свиња расте пропорционално са порастом нивоа специфичних антитела код испитиваних животиња. Тако су, на пример, Herrero и сар. (2016) код испитаних свиња утврдили изражену везу ($p = 0,003$) између IFAT титра $\geq 1:80$ и изолације *T. gondii*, због чега овај титар чак препоручују као лимит приликом категорисања свиња на кланици у погледу ризика од присуства инфективних циста у њиховим ткивима.

У овој студији, код свиња са највишим детектованим нивоом антитела (1:200 и 1:400) вијабилне цисте нису пронађене. Са друге стране, код обе ове животиње је у ткивима потврђено присуство ДНК *T. gondii*. Налаз паразитске ДНК у ткивима свиња са негативним резултатима биолошког огледа, уочен је код још једне серопозитивне и две серонегативне свиње из ове студије. Пошто PCR тест доказује само присуство паразитске ДНК у узорцима и, за разлику од биолошког огледа, не прави разлику између живих и мртвих паразита, наведена разлика између резултата PCR-а и биолошког огледа може се разумети као доказ да је *T. gondii* у датом узорку била присутна, али да је била мртва. Технички фактор који је могао допринети оваквом налазу јесте ниска концентрација циста у дигесту испитиваног ткива, због чега је могуће да, упркос труду да се дигест у потпуности хомогенизује пре инокулације у мишеве, неки инокулуми ипак нису садржали

ни једног паразита. На сличан начин би се могао објаснити и изостанак детекције ДНК *T. gondii* у ткивима седам свиња са позитивним биолошким огледом (Hill, Chirukandoth и сар., 2006; Opsteegh и сар., 2010; Pastiu и сар., 2015), поготово ако се у обзир узме да је запремина подузорка који се подвргава молекуларним испитивањима пет до десет пута мања од запремине инокулума у БО.

Осим код серопозитивних, вијабилна токсоплазма је у овој студији нађена и код 5% (1/20) серонегативних свиња за које је постављен биолошки оглед, што чини (најмање) 0,6% (1/157) свих серонегативних свиња. Негативан серолошки налаз код свиња из чијих ткива је изолована *T. gondii* може се објаснити скорашњом инфекцијом, где антитела још нису достигла границу детекције серолошких тестова, или падом нивоа антитела испод ове границе током времена (Dubey, Thulliez и Powell, 1995). У студији коју су спровели Hejliček и Literák (1993), чак 47,4% (18/38) добијених изолата је потицало из серонегативних свиња, док је у студијама које су извели Dubey и сар. овај проценат износио 17,1% (29/170) (Dubey, Thulliez и Powell, 1995) и 3,6% (2/55) (Dubey и сар., 2002). Dubey и сар. примећују да се присуство вијабилне *T. gondii* генерално може очекивати у око 3% серонегативних јединки (Dubey и сар., 2012).

Изолација циста *T. gondii* из ткива свиња са територије Србије није нов налаз. Klun и сар. (2011) су доказали присуство вијабилне *T. gondii* у 16 од 22 (72,7%) узорака крви свиња чији је МАТ титар био $\geq 1:50$, при чему је у 12 случајева вијабилност паразита доказана налазом циста у мозгу мишева. Пре њих, Simitch и сар. (1967) су токсоплазму изоловали из 0,69% свиња (из срца осам од 620 свиња и из мозга три од 967 испитане свиње) непознатог серолошког статуса, закланих у околини Београда. Међутим, ова дисертација представља прву студију на територији Србије која се бавила испитивањем везе између серолошког статуса свиња и успешности изолације *T. gondii* из њихових јестивих ткива.

С обзиром на то да је у нашој студији биолошки оглед постављен за четвртину од укупног броја серолошки испитаних свиња, укупан степен изолације од 6% (12/200) је сигурно нижи од реалног броја животиња у чијим ткивима је била присутна вијабилна *T. gondii*. Међутим, чак и да је оглед постављен за свих 200 свиња, број резервоара инфекције би и даље био потцењен. Узрок овоме лежи у ограничењима са којима се среће свака студија посвећена изолацији *T. gondii* из ткива животиња, а која се односе на избор

тквива, величину узорка и број инокулисаних мишева по узорку (Dubey, Thulliez и Powell, 1995). Наиме, због често мале концентрације циста у тквивима великих животиња, као и њихове нехомогене дистрибуције, постоји реална могућност да узети узорак неће садржати паразите чак и ако је животиња инфицирана токсоплазмом. Иако се ово у извесној мери може превазићи пажљивим избором врсте узоркованог ткива (мозак, срце, дијафрагма итд.) и повећањем количине узорка, негативан налаз добијен за било који узорак не може гарантовати да остатак ткива исте животиње не садржи паразите (Esteban-Redondo и сар., 1999). На исти начин, на вероватноћу детекције циста у дигесту утиче број мишева на којима се поставља оглед тј. количина дигеста који се у оглед ставља. Dubey и сар. су у једној од својих студија (Dubey, Thulliez и Powell, 1995), у којој су користили 10 мишева по сваком огледу, у чак 32,4% случајева позитиван налаз имали код само једног миша; поставља се питање да ли би све ове позитивне животиње биле откривене да је у огледу коришћен мањи број мишева тј. мања количина дигеста.

Међутим, чак и да је проценат изолације у овој студији био мањи, са аспекта безбедности хране он би био значајан. Примера ради, проценат изолације од 1% би значео да око 56540 (РЗС, 2015) трупова свиња инфицираних са *T. gondii* сваке године доспева на тржиште Србије. Ако се даље узме у обзир процена да се од 50 kg свињетине добија око 300 индивидуалних obroка (Jones и Dubey, 2012) и да производња појединих производа од меса подразумева мешање меса више различитих животиња (Aspinall и сар., 2002), ризик од присуства инфицираног меса се додатно повећава. При томе је реално ризик увек већи у односу на ризик процењен на основу изолације паразита на мишевима, због чињенице да је количина меса коју људи конзумирају значајно већа у односу на количину која се инокулише мишевима (Abdulmawjood и сар., 2014). Складиштење и различите процедуре обраде меса могу редуковати или потпуног уништити присутне ткивне цисте (Work, 1968; Lunden и Uggla, 1992; De Oliveira Mendonça и сар., 2004; Da Silva и сар., 2005; Bayarri и сар., 2010; Bayarri и сар., 2012). Међутим, случајеви изолације вијабилне токсоплазме из комерцијално припремљених шунки (Warnekulasuriya и сар., 1998; Gomez-Sambblas и сар., 2015; Herrero и сар., 2017), свежих кобасица (Dias и сар., 2005; Abdulmawjood и сар., 2014), као и готових јела од меса (Abd El-Razik и сар., 2014), указују на то да ефикасност ових метода није увек задовољавајућа. Због тога, сваку инфицирану свињу треба сматрати потенцијалним извором инфекције за људе, и пре конзумације њено месо обавезно

подвргнути ефикасним методама инактивације ткивних циста, као што је нпр. термичка обрада којом се у средини меса постиже температура $\geq 67^{\circ}\text{C}$.

Висок проценат серопозитивности (66,7%) и изолације (50% тестираних тј. 16,7% укупног узорка) пронађен код традиционално гајених мангулица у нашој студији, сугерише да би конзумацију ТНО меса ових свиња требало сматрати посебним фактором ризика за настанак инфекције људи. Као што је случај и са органски гајеним свињама, додатни ризик у случају традиционално гајених мангулица представља то што су управо специфичности узгоја, које представљају факторе ризика од инфекције свиња токсоплазмом, истовремено и разлог због којег су сухомеснати производи од њиховог меса високо цењени код потрошача. Иако у овој студији није било разлике у серопреваленци инфекције *T. gondii* између фармских свиња и свиња из домаћинства, може да се закључи да свиње из домаћинства представљају важнији резервоар овог паразита за људе. Наиме, у Србији је још увек у великој мери присутна традиција производње сухомеснатих производа за сопствене потребе. Осим што је у таквим условима присутна већа варијација у погледу поступка производње (концентрација соли, дужина сушења итд.), чиме се могу створити повољнији услови за преживљавање ткивних циста *T. gondii* (Tenter, 2009; Pott и сар., 2013), укус производа се, током његове припреме неретко контролише конзумацијом („пробањем“) сирове смеше меса и зачина.

Генотипизација изолата добијених у овој студији је вршена Mn-PCR-RFLP методом, помоћу шест маркера (GRA6, alt. SAG2, PK-1, BTUB, C22-8 и Apico). Ослањајући се на клонску структуру популације токсоплазме у Европи и Северној Америци, у почетку се сматрало да је употреба једног маркера, као што су SAG2 или GRA6, довољна за PCR-RFLP генотипизацију изолата *T. gondii*. Међутим, са порастом сазнања о разноврсности популационе структуре овог паразита, постало је јасно да, иако појединачни маркери могу да диференцирају три основна клонска типа, њима није могуће детектовати рекомбинантне или атипичне сојеве. Због тога је у PCR-RFLP анализу постепено укључиван све већи број маркера, тако да се у новијим студијама могу наћи резултати генотипизације добијени на основу анализе 10 и више, локуса (Su и сар., 2010; Donahoe и сар., 2015; Vacci и сар., 2015). Упркос томе, многи полиморфизми и даље могу остати неоткривени овом анализом, с обзиром на то да RFLP маркери детектују само оне варијације које се одражавају на места деловања ендонуклеаза. У овој студији,

генотипизација је успешно извршена код укупно девет изолата, од којих су два припадала типу III и седам типу II. У случају неких генотипизираних изолата, изостало је умножавање једног или више маркера, вероватно због недовољне количине ДНК (Вујанић, 2012). Интересантно је да је у два случаја, генотипизација извршена на основу анализе дигеста, тј. директно из узорка ткива. Иако се ткиво, као оригинални узорак, сматра идеалним извором паразита за генотипизацију, концентрација паразита, а тиме и ДНК, у њему је обично сувише ниска да би PCR-RFLP анализа била успешна. Са друге стране, иако постоје наговештаји да пасажа паразита кроз миша може резултирати селекцијом, тј. фаворизовањем преживљавања једних сојева у односу на друге (Villena и сар., 2004), биолошким огледом се омогућава умножавање и додатно концентрисање паразита, чиме се повећава количина ДНК а тиме и успешност генотипизације. Иако употреба Mn-PCR-а значајно повећава осетљивост класичне PCR-RFLP методе, генотипизација је и у нашој студији била најуспешнија управо посредним путем, из мозга мишева. Типичан пример представљају резултати анализе дигеста срца једне мангулице (6БМ) и мозга мишева из припадајућег огледа (узорци бр. 14 и 15), где, у случају дигеста, није било довољно ДНК да би се умножило било који од маркера, док је код узорака пореклом од мишева успешно умножено свих шест маркера.

Присуство типова II и III је претходно већ доказано код животињских изолата у Србији. Класичном PCR-RFLP методом, помоћу (друге комбинације) шест маркера (SAG1, 5'SAG2, 3'SAG2, GRA6, 5'GRA7 и 3'GRA7) тип II је детектован код два голуба и једне овце, док је тип III пронађен код једног голуба (Marković и сар., 2014). Тип III је, методом анализе микросателита, недавно детектован и код два коња у Србији (Klun и сар., 2017). Подаци добијени за производне животиње у нашој земљи су у складу са резултатима других студија спроведених на територији Европе и Северне Америке, према којима је највећи број сојева *T. gondii*, изолованих пре свега из оваца и свиња, припадао генотипу II, након чега су следили генотип III, атипични сојеви и, изузетно редак, генотип I (Mondragon и сар., 1998; De Sousa и сар., 2006; Sibley и сар., 2009; Berger-Schoch, Herrmann, и сар., 2011; Hill и Dubey, 2013). Са друге стране, налаз типа III код трећине животињских изолата из Србије, укључујући свиње из ове студије, говори у прилог сугестијама о већој заступљености типа III на југу Европе, у односу на њене друге делове, што би могла бити последица ширења (миграције птица, трговина) овог типа из афричких

и других земаља, у којима се сматра уобичајеним налазом (Mercier и сар., 2010; Shwab и сар., 2014; Klun и сар., 2017).

У недавној студији спроведеној у Француској, сви изолати *T. gondii*, добијени из 41 свиње, идентификовани су као тип II (Djokic, Vлага и сар., 2016), а до истог су резултата дошли и истраживачи из Чешке, испитујући узорке дијафрагме свиња из различитих система узгоја (фармског, органског, "backyard") (Slanu и сар., 2016). У Португалији је поред типа II, који је био доминантно заступљен (11/15 испитаних изолата) код свиња пронађен и тип III (4/15) (De Sousa и сар., 2006). С друге стране, у Словачкој је тип I (85,7%) био далеко заступљенији у свињским изолатима у односу на тип II (14,3%) (Turčeková и сар., 2013). У Италији је, код органски гајених свиња поред типа II пронађен и тип чију припадност аутори нису могли са сигурношћу да одреде због присуства две врсте алела (I и II) и неуспешног умножавања великог броја маркера (Васси и сар., 2015). У Северној Америци је, као и у Европи, већина до сада идентификованих свињских изолата *T. gondii* окарактерисана као тип II или тип III, с тим да је у новије време, употребом већег броја маркера, потврђено присуство и неклонских сојева, које карактеришу различите комбинације алела I, II, и III на различитим локусима (Mondragon и сар., 1998; Velmurugan и сар., 2009; Dubey и сар., 2012; Hill и Dubey, 2013). С друге стране, у Јужној Америци, а нарочито у Бразилу, ситуација је сасвим другачија. Од клонских типова, доминирају типови I и III (Dos Santos и сар., 2005; Da Silva и сар., 2005), док се тип II сматра изузетно ретким. Такође, комбиновањем употребе већег броја RFLP маркера и секвенционирања, постало је јасно да је велики број изолата који круже међу свињама и другим животињама у Бразилу атипичан (Bezerra и сар., 2012; Clementino Andrade и сар., 2013; Samico-Fernandes и сар., 2015).

Интересантно је да је од два изолата типа III у нашој студији један потицао од свиње са фарме, а други од свиње узгојене у домаћинству, док су оба изолата добијена из мангулица, припадала типу II. Екстензиван узгој мангулицама пружа могућност контакта са разноврснијим изворима инфекције у односу на фармске свиње, па би се код њих, теоријски, могла очекивати већа генетска разноврсност изолата. Тим пре, што су мангулице из наше студије узгајане у непосредној близини Специјалног резервата природе „Засавица“ кога карактеришу висок биодиверзитет и укрштање различитих екосистема. С друге стране, резултати досадашњих истраживања су показали да је у

Европи генетска структура сојева који круже међу домаћим и дивљим животињама веома слична – клонска, са израженом доминацијом типа II (Richomme и сар., 2009; Aubert и сар., 2010). Имајући то у виду, налаз типа II код мангулица из ове студије није изненађење, али се због малог узорка не може сматрати показатељем генетске структуре сојева *T. gondii* присутних у широј популацији. Такође је интересантно да је свиња из које је изолован тип III потицала са исте фарме (Фарма 1) са које су биле и свиње из којих је изолован тип II, што указује на присуство више од једног извора инфекције на овој фарми.

Идентификација генотипова *T. gondii* присутних код производних животиња значајна је због оцене ризика коју месо такво животиње представља за човека. Иако, за разлику од испитивања на мишевима, није још увек показана јасна веза између генотипа и вируленције, извесни обрасци се назире. Истраживања су тако показала да су у Европи сојеви изоловани у случајевима хумане очне и конгениталне токсоплазмозе најчешће припадали типу II, при чему је клиничка слика конгениталне болести варијала у зависности од периода гравидитета у којем је дошло до инфекције (Ajzenberg и сар., 2002). У Северној Америци, у случајевима конгениталне токсоплазмозе, такође је примећена доминација типа II (Howe и Sibley, 1995; Boothroyd и Grigg, 2002), с тим да је у студији коју су спровели McLeod и сар. (2012) доказано да је значајно више случајева тешке форме болести било изазвано серотиповима који нису били тип II, а који би могли припадати тзв. четвртом клонском типу (Khan и сар., 2011; Dardé и сар., 2014). Случајеви очне токсоплазмозе у САД су углавном повезивани са типом I и рекомбинованим тј. атипичним сојевима (Boothroyd и Grigg, 2002; Dardé, 2008). Атипични сојеви се широм света такође везују за случајеве тешке конгениталне токсоплазмозе, као и случајеве дисеминоване болести код имунокомпетентних особа. Осим овога, атипични сојеви се везују за случајеве доказане реинфекције трудница претходно имунизованих неким од три клонска генотипа, и последичну трансмисију инфекције на плод, што би могло да утиче и на традиционално схватање да стечени имунитет мајке штити плод од конгениталне токсоплазмозе (Lindsay и Dubey, 2011). Када су у питању имунокомпромитоване особе, истраживања говоре у прилог томе да ће међу изолованим сојевима највероватније преовлађивати генотип који је доминантан у животном окружењу пацијента, с обзиром на то да код ових особа болест углавном настаје као последица реактивације латентне инфекције (Dardé и сар., 2014).

У Србији је у случајевима конгениталне инфекције изолован тип II, осим једног случаја код ког је изолован могући тип I (Djurković-Djaković и сар., 2006; Вујанић, 2012; Marković и сар., 2014). Такође, изолован је и један атипични сој, и то из трансплантираног пацијента са Нијмегеновим синдромом (урођеним генетским поремећајем репарације ДНК) код кога је дошло до фаталне реактивације токсоплазмозе (Štajner и сар., 2013).

7. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата истраживања у којима је серолошким, биолошким и молекуларним методама испитивано присуство инфекције паразитом *T. gondii* код 200 свиња са територије Србије, може се закључити следеће:

1. Присуство антитела против *T. gondii* је доказано код 21% испитаних свиња, што се може сматрати умерено високом вредношћу у поређењу са резултатима добијеним у другим европским земљама.
2. Серопозитивне свиње су нађене у свим системима узгоја, при чему је највиша серопреваленца детектована код свиња из слободног система држања.
3. *T. gondii* и/или њена ДНК су доказане у 32,2% испитаних узорака ткива. Инфективне цисте су потврђене код 24% свиња за које је постављен биолошки оглед, што чини 6% свих серолошки испитаних свиња у овој студији.
4. Није показана веза између висине титра антитела против *T. gondii* и степена изолације паразита из меса инфицираних животиња, иако је 75% добијених изолата потицало од свиња чији је титар IgG антитела износио $\geq 1:100$.
5. *T. gondii* је нађена и у месу серонегативних свиња; у три случаја је детектована само њена ДНК, док су у једном случају нађене и инфективне цисте.
6. Висок проценат серопозитивности (66,7%) и изолације (50% тестираних тј. 16,7% укупног узорка) доказан код традиционално гајених мангулица, сугерише да би приликом производње и припреме меса и месних производа пореклом од ових свиња требало посветити посебну пажњу мерама инактивације циста *T. gondii*. Ипак, за боље разумевање улоге ове категорије свиња као резервоара *T. gondii*, неопходно је спровести даља истраживања, на већем узорку животиња.

7. Генотипизацији су подвргнути узорци укупно 18 свиња, у којима је доказана жива токсоплазма и/или њена ДНК. Одређивање клонског типа је било успешно у случају девет изолата, од којих је седам припадало типу II, а два типу III. Добијени резултати представљају прве податке о популационој структури *T. gondii* код домаћих свиња у Србији, и у складу су са претходним налазом типова II и III код оваца, голубова и коња. Осим тога, налаз два изолата типа III у релативно малом узорку свиња из ове студије, уз податке о изолацији истог типа из голуба и коња у Србији, говори у прилог тврдњи да је учесталост изолације типа III у медитеранским и околним земљама чешћа у односу на остатак Европе.

Налаз специфичних антитела код свиња из различитих система узгоја и демонстрација инфективних циста у њиховим јестивим ткивима, потврђују значај свињског меса као потенцијалног извора хумане инфекције са *T. gondii*. У прилог овоме говори и велика заступљеност типа II, која је утврђена код свиња у овој студији, а која је показана и код људи у Србији. Одсуство корелације између висине титра специфичних антитела и степена изолације *T. gondii* из ткива испитаних свиња, као и налаз живих циста у ткивима серонегативних животиња, указују на то да се серолошки статус свиња не може сматрати поузданом мером безбедности њиховог меса.

8. ЛИТЕРАТУРА

- Abd El-Razik, K.A.A., Fadaly, H.A. El, Elnaga, S.M.A., 2014. Zoonotic Hazards *T. gondii* Viable Cysts in Ready to Eat Egyptian Meat-Meals. *World J. Med. Sci.* 11, 510–517.
- Abdulmawjood, A., Rosa, S., Taubert, A., Bauer, C., Failing, K., Zahner, H., Bülte, M., 2014. Investigation of persistence of infectious *Toxoplasma gondii* in raw sausages using in-house developed and validated real time-PCR. *Meat Sci.* 97, 542–547.
- Ajzenberg, D., Cogné, N., Paris, L., Bessières, M.-H., Thulliez, P., Filisetti, D., Pelloux, H., Marty, P., Dardé, M.-L., 2002. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J. Infect. Dis.* 186, 684–689.
- Ajzenberg, D., Bañuls, A.L., Su, C., Dumètre, A., Demar, M., Carme, B., Dardé, M.L., 2004. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 34, 1185–1196.
- Akstein, R.B., Wilson, L.A., Teutsch, S.M., 1982. Acquired toxoplasmosis. *Ophthalmology* 89, 1299–302.
- Anderson-White, B., Beck, J.R., Chen, C.T., Meissner, M., Bradley, P.J., Gubbels, M.J., 2012. Cytoskeleton Assembly in *Toxoplasma gondii* Cell Division. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 298, 1–31.
- Arantes, T.P., Lopes, W.D.Z., Ferreira, R.M., Pieroni, J.S.P., Pinto, V.M.R., Sakamoto, C.A., Costa, A.J. da, 2009. *Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by semen in dogs. *Exp. Parasitol.* 123, 190–194.
- Ardoin, P., Couzineau, P., Baufine-Ducrocq, H., 1967. Sur l'utilisation du sarcome T.G. 180 pour l'obtention d'une suspension riche en *Toxoplasma gondii* extracellulaires. *C. R. Soc. Biol.* 161, 117-119.
- Arkush, K.D., Miller, M.A., Leutenegger, C.M., Gardner, I.A., Packham, A.E., Heckerroth, A.R., Tenter, A.M., Barr, B.C., Conrad, P.A., 2003. Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int. J. Parasitol.* 33, 1087–1097.
- Aspinall, T. V., Marlee, D., Hyde, J.E., Sims, P.F.G., 2002. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction - Food for thought? *Int. J. Parasitol.* 32, 1193–1199.
- Aubert, D., Ajzenberg, D., Richomme, C., Gilot-fromont, E., Terrier, M.E., 2010. Molecular and biological characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in France. *Vet. Parasitol.* 171, 346–349.

-
- Bacci, C., Vismarra, A., Mangia, C., Bonardi, S., Bruini, I., Genchi, M., Kramer, L., Brindani, F., 2015. Detection of *Toxoplasma gondii* in free-range, organic pigs in Italy using serological and molecular methods. *Int. J. Food Microbiol.* 202, 54–56.
- Baldursson, S., Karanis, P., 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2004-2010. *Water Res.* 45, 6603–6614.
- Barragan, A., Sibley, L.D., 2003. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol.* 11, 426–430.
- Bartoszcze, M., Krupa, K., Roszkowski, J., 1991. ELISA for assessing *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs. *J. Vet. Med. B* 38, 263–264.
- Basso, W., Handke, M., Sydler, T., Borel, N., Grimm, F., Sidler, X., Deplazes, P., 2015. Involvement of *Toxoplasma gondii* in reproductive disorders in Swiss pig farms. *Parasitol. Int.* 64, 157–160.
- Bastien, P., 2002. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 205–215.
- Bastien, P., Procop, G.W., Reischl, U., 2008. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1897–1900.
- Bayarri, S., Gracia, M.J., Lázaro, R., Pe Rez-Arquillué, C., Barberán, M., Herrera, A., 2010. Determination of the viability of *Toxoplasma gondii* in cured ham using bioassay: influence of technological processing and food safety implications. *J. Food Prot.* 73, 2239–2243.
- Bayarri, S., Gracia, M.J., Pérez-Arquillué, C., Lázaro, R., Herrera, A., 2012. *Toxoplasma gondii* in Commercially Available Pork Meat and Cured Ham: A Contribution to Risk Assessment for Consumers. *J. Food Prot.* 75, 597–600.
- Benenson, M.W., Takafuji, E.T., Stanley, L.M., Greenup, S.J., Alexander, S.J., 1982. Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *N. Engl. J. Med.* 307, 666–669.
- Berger-Schoch, A.E., Bernet, D., Doherr, M.G., Gottstein, B., Frey, C.F., 2011. *Toxoplasma gondii* in Switzerland: A Serosurvey Based on Meat Juice Analysis of Slaughtered Pigs, Wild Boar, Sheep and Cattle. *Zoonoses Public Health* 58, 472–478.
- Berger-Schoch, A.E., Herrmann, D.C., Schares, G., Müller, N., Bernet, D., Gottstein, B., Frey, C.F., 2011. Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in feline faeces (oocysts) and meat from sheep, cattle and pigs in Switzerland. *Vet. Parasitol.* 177, 290–297.
- Beverley, J., Beattie, C., 1958. Glandular Toxoplasmosis a Survey of 30 Cases. *Lancet* 2, 379–384.
- Bezerra, R.A., Carvalho, F.S., Guimarães, L.A., Rocha, D.S., Maciel, B.M., Wenceslau, A.A., Lopes, C.W.G., Albuquerque, G.R., 2012. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs intended for human consumption in Brazil. *Vet. Parasitol.* 189, 153–161.
- Björkman, C., Ugglå, A., 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.* 29, 1497–1507.
- Black, M.W., Boothroyd, J.C., 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol.*

Rev. 64, 607–623.

- Blader, I.J., Saeij, J.P., 2009. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: Impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS* 117, 458–476.
- Blagojevic, B., Antic, D., 2014. Assessment of potential contribution of official meat inspection and abattoir process hygiene to biological safety assurance of final beef and pork carcasses. *Food Control* 36, 174–182.
- Bobić, B., Šibalić, D., Djurković-Djaković, O., 1991. High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary toxoplasma infection. Case report. *Gynecol. Obstet. Invest.* 31, 182–184.
- Bobić, B., Jevremović, I., Marinković, J., Šibalić, D., Djurković-Djaković, O., 1998. Risk factors for *Toxoplasma* infection in a reproductive age female population in the area of Belgrade, Yugoslavia. *Eur. J. Epidemiol.* 14(6), 605–610.
- Бобић, Б., Николић, А., Ђурковић-Ђаковић, О., 2003. Идентификација фактора ризика за инфекцију паразитом *Toxoplasma gondii* у Србији као основ програма превенције конгениталне токсоплазмозе. *Срп. Арх. Целок. Лек.* 131, 162–167.
- Bobić, B., Nikolić, A., Klun, I., Vujanić, M., Djurković-Djaković, O., 2007. Undercooked meat consumption remains the major risk factor for *Toxoplasma infection* in Serbia. *Parassitologia* 49, 227–230.
- Bobić, B., Klun, I., Vujanić, M., Nikolić, A., Ivović, V., Živković, T., Djurković-Djaković, O., 2009. Comparative evaluation of three commercial *Toxoplasma*-specific IgG antibody avidity tests and significance in different clinical settings. *J. Med. Microbiol.* 58, 358–364.
- Bohne, W., Heesemann, J., Gross, U., 1994. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect. Immun.* 62(5), 1761–1767.
- Boothroyd, J.C., Grigg, M.E., 2002. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: Do different strains cause different disease? *Curr. Opin. Microbiol.* 5(4), 438–442.
- Bousquet, A., Bigaillon, C., Dumitrescu, N., Larréché, S., Godreuil, C., Mestiri, R., Le Caruyer, N., Mérens, A., Andriamanantena, D., 2016. Acute myocarditis in an immunocompetent young man: Don't forget *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Cardiol.* 214, 358–359.
- Boyer, K., Hill, D., Mui, E., Wroblewski, K., Karrison, T., Dubey, J.P., Sautter, M., Noble, A.G., Withers, S., Swisher, C., Heydemann, P., Hosten, T., Babiarz, J., Lee, D., Meier, P., McLeod, R., 2011. Unrecognized ingestion of *Toxoplasma gondii* oocysts leads to congenital toxoplasmosis and causes epidemics in North America. *Clin. Infect. Dis.* 53, 1081–1089.
- Бркић, С., Гајски, Г., Богавац, М., Марић, Д., Туркулов, В., Томић, С., 2010. Серопреваленца токсоплазмозе у Војводини. *Срп. Арх. Целок. Лек.* 138, 333–336.
- Buffolano, W., Gilbert, R.E.E., Holland, F.J.J., Fratta, D., Palumbo, F., Ades, A.E.E., 1996. Risk factors for recent toxoplasma infection in pregnant women in Naples. *Epidemiol. Infect.* 116, 347–351.

- Burg, J.L., Grover, C.M., Pouletty, P., Boothroyd, J.C., 1989. Direct and Sensitive Detection of a Pathogenic Protozoan, *Toxoplasma gondii*, by Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1787–1792.
- Buxton, D., 1990. Ovine toxoplasmosis: a review. *J. R. Soc. Med.* 83, 509–511.
- Cademartori, B.G., Santos, L.M.J.F., Oliveira, F.C., Quevedo, P., Oliveira, P.A., Ramos, T.S., Rocha, A.S.R., Ruas, J.L., Farias, N.A.R., 2014. Isolation and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* in naturally infected (rustic farm) pigs in southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 203, 207–211.
- Carme, B., Bissuel, F., Ajzenberg, D., Bouyne, R., Aznar, C., Bichat, S., Louvel, D., Bourbigot, A.M., Peneau, C., Dardé, M. L., Demar, M., Neron, P., Darde, M.L., 2002. Severe Acquired Toxoplasmosis in Immunocompetent Adult Patients in French Guiana. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4037–4044.
- Carruthers, V.B., Sibley, D.L., 1977. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* 73, 114–123.
- Choi, W.Y., Nam, H.W., Kwak, N.H., Huh, W., Kim, Y.R., Kang, M.W., Cho, S.Y., Dubey, J.P., 1997. Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 175, 1280–1282.
- Clementino Andrade, M.M., Pinheiro, B. V., Cunha, M.M., Carneiro, A.C.A. V, Andrade Neto, V.F., Vitor, R.W.A., 2013. New genotypes of *Toxoplasma gondii* obtained from farm animals in Northeast Brazil. *Res. Vet. Sci.* 94, 587–589.
- Cook, A.J.C., Gilbert, R.E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P. a, Foulon, W., Semprini, a E., Dunn, D.T., 2000. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ* 321, 142–147.
- Da Silva, A.V., Langoni, H., 2001. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). *Vet. Parasitol.* 97, 191–198.
- Da Silva, A.V., De Oliveira, M.A., Pezerico, S.B., Domingues, P.F., Langoni, H., 2005. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains detected in pork sausage. *Parasitol. Latinoam.* 60, 65–68.
- Da Silva, M.F.F., Barbosa, H.S., Groß, U., Lüder, C.G.K., 2008. Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biosyst.* 4(8), 824–834.
- Damriyasa, I.M., Bauer, C., Edelhofer, R., Failing, K., Lind, P., Petersen, E., Schares, G., Tenter, A.M., Volmer, R., Zahner, H., 2004. Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: Seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* in sows. *Vet. Parasitol.* 126, 271–286.
- Dardé, M.-L., 2008. *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence. *Parasite* 15, 366–371.
- Dardé, M.-L., Ajzenberg, D., Su, C., 2014. Molecular Epidemiology and Population Structure of *Toxoplasma gondii*, Second Edi. ed, *Toxoplasma gondii*. Elsevier. pp. 61–97.

- Davies, P., Morrow, W.E., Deen, J., Gamble, H., Patton, S., 1998. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Trichinella spiralis* in finishing swine raised in different production systems in North Carolina, USA. *Prev. Vet. Med.* 36, 67–76.
- De Oliveira Mendonça, A., Domingues, P.F., Vieira Da Silva, A., Bergamaschi Pezerico, S., Langoni, H., 2004. Detection of *Toxoplasma gondii* in swine sausages. *Parasitol. Latinoam.* 59, 42–45.
- De Sousa, S., Ajzenberg, D., Canada, N., Freire, L., Da Costa, J.M.C., Darde, M.L., Thulliez, P., Dubey, J.P., 2006. Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. *Vet. Parasitol.* 135, 133–136.
- Delbac, F., Sanger, A., Neuhaus, E.M., Stratmann, R., Ajioka, J.W., Toursel, C., Herm-Götz, A., Tomavo, S., Soldati, T., Soldati, D., 2001. *Toxoplasma gondii* myosins B/C: one gene, two tails, two localizations, and a role in parasite division. *J. Cell Biol.* 155, 613–623.
- Demar, M., Ajzenberg, D., Maubon, D., Djossou, F., Panchoe, D., Punwasi, W., Valery, N., Peneau, C., Daigre, J.-L., Aznar, C., Cottrelle, B., Terzan, L., Dardé, M.-L., Carme, B., 2007. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clin. Infect. Dis.* 45, e88–e95.
- Derouin, F., Pelloux, H., 2008. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 1089–1101.
- Desmonts, G., Remington, J.S., 1980. Direct Agglutination Test for Diagnosis of *Toxoplasma* Infection: Method for Increasing Sensitivity and Specificity. *J. Clin. Microbiol.* 11, 562–568.
- Dias, R.A.F., Navarro, I.T., Ruffolo, B.B., Bugni, F.M., De Castro, M.V., Freire, R.L., 2005. *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Parana State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 47, 185–189.
- Diza, E., Frantzidou, F., Souliou, E., Arvanitidou, M., Gioula, G., Antoniadis, A., 2005. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in northern Greece during the last 20 years. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 719–723.
- Djokic, V., Blaga, R., Aubert, D., Durand, B., Perret, C., Geers, R., Ducry, T., Vallee, I., Djurkovic-Djakovic, O., Mzabi, A., Villena, I., Boireau, P., 2016. *Toxoplasma gondii* infection in pork produced in France. *Parasitology* 143, 557–567.
- Djokic, V., Fablet, C., Blaga, R., Rose, N., Perret, C., Djurkovic-Djakovic, O., Boireau, P., Durand, B., 2016. Factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in confined farrow-to-finish pig herds in western France: an exploratory study in 60 herds. *Parasit. Vectors* 9, 466.
- Djurković-Djaković, O., 1995. *Toxoplasma* infection and pathological outcome of pregnancy. *Gynecol. Obstet. Invest.* 40, 36–41.
- Ђурковић-Ђаковић, О., 1998. Токсоплазма и имуносупресија. *Срп. Арх. Целок. Лек.* 126(5-6), 197-203.
- Ђурковић-Ђаковић, О., 2004. Токсоплазма: проблем и за 21. век? У: О. Ђурковић-Ђаковић (ured.) Токсоплазма у хуманој и ветеринарској медицини, Институт за здравље Црне Горе и

-
- Društvo mikrobiologa Crne Gore, Podgorica. Zbornik radova Seminara, 14.10.2003., str: 7-29.
- Djurković-Djaković, O., 2010. Toxoplasmosis as a public health issue in Serbia. *Sci. Medica (Porto Alegre)* 20, 108–112.
- Djurkovic-Djakovic, O., Milenković, V., 2000. Effect of refrigeration and freezing on survival of *Toxoplasma gondii* cysts. *Acta Vet.* 50(5-6), 375-380.
- Djurković-Djaković, O., Bobić, B., Vuković, D., Marinković, J., Jevtović, D., 1997. Risk for toxoplasmic encephalitis in AIDS patients in Yugoslavia. *Int. J. Infect. Dis.* 2, 74–78.
- Djurkovic-Djakovic, O., Milenković, V., Nikolić, A., Bobić, B., Grujić, J., 2002. Efficacy of atovaquone combined with clindamycin against murine infection with a cystogenic (Me49) strain of *Toxoplasma gondii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 981–987.
- Djurkovic-Djakovic, O., Nikolic, A., Bobic, B., Grujic., B., Klun, I., 2003. Atovaquone as an anti-*Toxoplasma gondii* agent – review of our data. *Y: Recent Res. Devel. Antimicrob. Agents & Chemother.* 6: 39-51. Research Signpost, Kerala, India.
- Djurković-Djaković, O., Nikolić, A., Bobić, B., Klun, I., Aleksić, A., 2005. Stage conversion of *Toxoplasma gondii* RH parasites in mice by treatment with atovaquone and pyrrolidine dithiocarbamate. *Microbes Infect.* 7, 49–54.
- Djurković-Djaković, O., Klun, I., Khan, A., Nikolić, A., Knežević-Ušaj, S., Bobić, B., Sibley, L.D., 2006. A human origin type II strain of *Toxoplasma gondii* causing severe encephalitis in mice. *Microbes Infect.* 8, 2206–2212.
- Djurkovic-Djakovic, O., Bobic, B., Klun, I., 2010. Toxoplasmosis in Serbia: time for an action plan. *Parasite* 17, 187–192.
- Djurković-Djaković, O., Bobić, B., Nikolić, A., Klun, I., Dupouy-Camet, J., 2013. Pork as a source of human parasitic infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, 586–594.
- Doganci, L., Tanyuksel, M., Araz, E.R., Besirbellioglu, B.A., Erdem, U., Ozoguz, C.A., Yucel, N., Ciftcioglu, A., 2006. A probable outbreak of toxoplasmosis among boarding school students in Turkey. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 672–674.
- Donahoe, S.L., Šlapeta, J., Knowles, G., Obendorf, D., Peck, S., Phalen, D.N., 2015. Clinical and pathological features of toxoplasmosis in free-ranging common wombats (*Vombatus ursinus*) with multilocus genotyping of *Toxoplasma gondii* type II-like strains. *Parasitol. Int.* 64, 148–153.
- Dos Santos, C.B.A., De Carvalho, A.C.F.B., Ragozo, A.M., Soares, R.M., Amaku, M., Yai, L.E.O., Dubey, J.P., Gennari, S.M., 2005. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 131, 207–211.
- Dubey, J.P., 1986. A review of toxoplasmosis in pigs. *Vet. Parasitol.* 19, 181–223.
- Dubey, J.P., 1995. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *J. Parasitol.* 81, 410–415.
- Dubey, J.P., 1996. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *J*

-
- Parasitol 82, 957–961.
- Dubey, J.P., 1997. Validation of the specificity of the modified agglutination test for toxoplasmosis in pigs. *Vet. Parasitol.* 71, 307–310.
- Dubey, J.P., 1998a. *Toxoplasma* oocyst survival under defined temperatures. *J. Parasitol.* 84, 862–865.
- Dubey, J.P., 1998b. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 28, 1019–1024.
- Dubey, J.P., 2002. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. *J. Parasitol.* 88, 713–717.
- Dubey, J.P., 2008. The History of *Toxoplasma gondii* —The First 100 Years. *J. Eukaryot. Microbiol.* 55, 467–475.
- Dubey, J.P., 2009a. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*, Second Ed. ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York.
- Dubey, J.P., 2009b. Toxoplasmosis in pigs-The last 20 years. *Vet. Parasitol.* 164, 89–103.
- Dubey, J.P., Frenkel, J.K., 1972. Cyst-Induced Toxoplasmosis in Cats. *J. Protozool.* 19, 155–177.
- Dubey, J.P., Frenkel, J.K., 1973. Experimental *Toxoplasma* Infection in Mice with Strains Producing Oocysts. *J. Parasitol.* 59, 505–512.
- Dubey, J.P., Frenkel, J.K., 1976. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J. Protozool.* 23, 537–546.
- Dubey, J.P., Su, C., 2009. Population biology of *Toxoplasma gondii*: What’s out and where did they come from. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 190–195.
- Dubey, J.P., Miller, N.L., Frenkel, J.K., 1970. Characterization of the New Fecal Form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 56, 447–456.
- Dubey, J.P., Schlafer, D.H., Urban Jr., J.F., Lindsay, D.S., 1990. Lesions in fetal pigs with transplacentally-induced toxoplasmosis. *Vet Pathol* 27, 411–418.
- Dubey, J.P., Thulliez, P., Powell, E.C., 1995. *Toxoplasma gondii* in Iowa sows: comparison of antibody titers to isolation of *T. gondii* by bioassays in mice and cats. *J. Parasitol.* 81, 48–53.
- Dubey, J.P., Thulliez, P., Weigel, R.M., Andrews, C.D., Lind, P., Powell, E.C., 1995. Sensitivity and specificity of various serologic tests for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. *Am.J.Vet.Res.* 56(8), 1030-1036.
- Dubey, J.P., Lunney, J.K., Shen, S.K., Kwok, O.C., Ashford, D., Thulliez, P., 1996. Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. *J. Parasitol.* 82, 438–443.
- Dubey, J.P., Andrews, C.D., Thulliez, P., Lind, P., Kwok, O.C.H., 1997. Long-term humoral antibody responses by various serologic tests in pigs orally inoculated with oocysts of four strains of *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.* 68, 41–50.

- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Speer, C.A., 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin. Microbiol. Rev. 11, 267–299.
- Dubey, J.P., Gamble, H.R., Hill, D., Sreekumar, C., Romand, S., Thulliez, P., 2002. High Prevalence of Viable *Toxoplasma gondii* Infection in Market Weight Pigs From a Farm in Massachusetts. J. Parasitol. 88, 1234–1238.
- Dubey, J.P., Hill, D.E., Rozeboom, D.W., Rajendran, C., Choudhary, S., Ferreira, L.R., Kwok, O.C.H., Su, C., 2012. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA. Vet. Parasitol. 188, 14–18.
- Edelhofer, R., 1994. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in pigs in Austria--an evaluation of data from 1982 and 1992. Parasitol Res 80, 642–644.
- Edvinsson, B., Lappalainen, M., Evengård, B., Buffalano, W., Ferguson, D.J.P., Guy, E., Jenum, P., Nowakowska, D., Pelloux, B., Stray-Pedersen, B., Szénási, Z., 2006. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. Clin. Microbiol. Infect. 12, 131–136.
- EFSA, 2007. Surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, food and animals. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards, The EFSA J. 583 1-64
- EFSA, 2011. Technical specifications on harmonised epidemiological indicators for public health hazards to be covered by meat inspection of swine. EFSA J. 9(10), 2371.
- Ekman, C.C.J., Chiossi, M.F.D.V., Meireles, L.R., Andrade Júnior, H.F. De, Figueiredo, W.M., Marciano, M.A.M., Luna, E.J.D.A., 2012. Case-control study of an outbreak of acute toxoplasmosis in an industrial plant in the state of São Paulo, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 54, 239–244.
- El-Tras, W.F., Tayel, A.A., El-Kady, N.N., 2012. Source diversity of *Toxoplasma gondii* infection during meal preparation. J. Food Saf. 32, 1–5.
- Esteban-Redondo, I., Innes, E.A., 1998. Detection of *Toxoplasma gondii* tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts. Int. J. Parasitol. 28, 1459–1466.
- Esteban-Redondo, I., Maley, S.W., Thomson, K., Nicoll, S., Wright, S., Buxton, D., Innes, E., 1999. Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. Vet Parasitol 86, 155–171.
- Etheredge, G.D., Michael, G., Muehlenbein, M.P., Frenkel, J.K., 2004. The roles of cats and dogs in the transmission of *Toxoplasma* infection in Kuna and Embera children in eastern Panama. Rev. Panam. salud publica/Pan Am. J. public Heal. 16, 176–186.
- European Parliament and Council of the European Union, 2003. Directive 2003/99/EC of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC. Off. J. Eur. Union 46, 31–40.
- FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. 2014. Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. Microbiological Risk Assessment Series No. 23. Рим, 302 стр.

-
- Farkas, J., 1998. Irradiation as a method for decontaminating food: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 44, 189–204.
- Ferguson, D.J.P., 2009. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 133–148.
- Ferguson, D.J.P., Dubremetz, J.F., 2014. The Ultrastructure of *Toxoplasma gondii*, Second Edition, *Toxoplasma gondii*: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods: Second Edition. Elsevier. 19-59.
- Ferguson, D.J.P., Birch-Andersen, A., Siim, J.C., Hutchison, W.M., 1979. Ultrastructural studies on the sporulation of oocysts of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 87, 171–181.
- Ferreira, É.C., Marchioro, A.A., Guedes, T.A., Mota, D.C.G.A., Guilherme, A.L.F., De Araújo, S.M., 2013. Association between seropositivity for *Toxoplasma gondii*, scholastic development of children and risk factors for *T. gondii* infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 107, 390–396.
- Fertig, A., Selwyn, S., Tibble, M.J.K., 1977. Tetracycline treatment in a food-borne outbreak of toxoplasmosis. *Br. Med. J.* 1064.
- Fischer, S., Agmon-Levin, N., Shapira, Y., Porat Katz, B.S., Graell, E., Cervera, R., Stojanovich, L., Gómez Puerta, J.A., Sanmartí, R., Shoenfeld, Y., 2013. *Toxoplasma gondii*: Bystander or cofactor in rheumatoid arthritis. *Immunol. Res.* 56, 287–292.
- Fichera, M.E., Roos, D.S., 1997. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* 390, 407-409.
- Flegr, J., 2013. How and why *Toxoplasma* makes us crazy. *Trends Parasitol.* 29, 156–163.
- Forbes, L.B., Parker, S.E., Gajadhar, A.A., 2012. Performance of commercial ELISA and agglutination test kits for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in serum and muscle fluid of swine infected with 100, 300, 500 or 1000 oocysts. *Vet. Parasitol.* 190, 362–367.
- Foroutan-Rad, M., Majidiani, H., Dalvand, S., Daryani, A., Kooti, W., Saki, J., Hedayati-Rad, F., Ahmadvour, E., 2016. Toxoplasmosis in blood donors: A systematic review and meta-analysis. *Transfus. Med. Rev.* 30(3), 116-22.
- Frenkel, J.K., 1973. *Toxoplasma* In and Around Us. *Bioscience* 23, 343–352.
- Frenkel, J.K., Dubey, J.P., 1973. Effects of Freezing on the Viability of *Toxoplasma* Oocysts. *J. Parasitol.* 59, 587–588.
- Frenkel, J.K., Parker, B.B., 1996. An apparent role of dogs in the transmission of *Toxoplasma gondii*. The probable importance of xenosmophilia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 791, 402–407.
- Frenkel, J.K., Dubey, J.P., Miller, N.L., 1970. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science.* 167, 893–896.
- Frenkel, J.K., Ruiz, A., Chinchilla, M., 1975. Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24, 439–443.

- Freyre, A., Dubey, J.P., Smith, D.D., Frenkel, J.K., 1989. Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. *J. Parasitol.* 75, 750–755.
- Fulton, J.D., 1965. Micro-agglutination test for *Toxoplasma* antibodies. *Immunology* 9, 491-495.
- Fulton, J.D., Fulton, F., 1965. Complement-fixation test in toxoplasmosis with purified antigen. *Nature* 205, 776–778.
- Fulton, J.D., Turk, J. L., 1959. Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. *Lancet* ii, 1068-1069.
- Gajadhar, A.A., Aramini, J.J., Tiffin, G., Bisailon, J.R., 1998. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in Canadian market-age pigs. *J. Parasitol.* 84, 759–763.
- Gamble, H.R., Brady, R.C., Dubey, J.P., 1999. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in the New England states. *Vet. Parasitol.* 82, 129–136.
- Gamble, H.R., Dubey, J.P., Lambillotte, D.N., 2005. Comparison of a commercial ELISA with the modified agglutination test for detection of *Toxoplasma* infection in the domestic pig. *Vet. Parasitol.* 128, 177–181.
- Garcia, J.L., Gennari, S.M., Machado, R.Z., Navarro, I.T., 2006. *Toxoplasma gondii*: Detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. *Exp. Parasitol.* 113, 267–271.
- Garcia, J.L., Navarro, I.T., Vidotto, O., Gennari, S.M., Machado, R.Z., da Luz Pereira, A.B., Sinhorini, I.L., 2006. *Toxoplasma gondii*: Comparison of a rhoptry-ELISA with IFAT and MAT for antibody detection in sera of experimentally infected pigs. *Exp. Parasitol.* 113, 100–105.
- Garcia, J.L., Gennari, S.M., Navarro, I.T., Machado, R.Z., Headley, S.A., Vidotto, O., Da Silva Guimarães, J., Bugni, F.M., Igarashi, M., 2008. Evaluation of IFA, MAT, ELISAs and immunoblotting for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in paired serum and aqueous humour samples from experimentally infected pigs. *Res. Vet. Sci.* 84, 237–242.
- García-Bocanegra, I., Dubey, J.P., Simon-Grifé, M., Cabezón, O., Casal, J., Allepuz, A., Napp, S., Almería, S., 2010. Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in pig farms from Catalonia, north-eastern Spain. *Res. Vet. Sci.* 89, 85–87.
- García-Bocanegra, I., Simon-Grifé, M., Dubey, J.P., Casal, J., Martín, G.E., Cabezón, O., Perea, A., Almería, S., 2010. Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* in domestic pigs from Spain. *Parasitol. Int.* 59, 421–426.
- Gencay, Y.E., Yildiz, K., Gokpinar, S., Leblebici, A., 2013. A potential infection source for humans: Frozen buffalo meat can harbour tissue cysts of *Toxoplasma gondii*. *Food Control* 30, 86–89.
- Genchi, G., Polidori, G.A., Zaghini, L., Lanfranchi, P., 1991. Epidemiological aspects of toxoplasmosis on intensive pig farms. *Arch. Vet. Ital.* 42, 105–111.
- Gilbert, R.E., Stanford, M.R., 2000. Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? *Br. J. Ophthalmol.* 84, 224–226.
- Gilot-Fromont, E., Dardé, M.L.M.-L., Richomme, C., Aubert, D., Afonso, E., Mercier, A.,

-
- Gotteland, C., Villena, I., 2012. The Life Cycle of *Toxoplasma gondii* in the Natural Environment, Y: Toxoplasmosis - Recent Advances. INTECH, стр. 3–36.
- Gkogka, E., Reij, M.W., Havelaar, A.H., Zwietering, M.H., Gorris, L.G.M., 2011. Risk-based estimate of effect of foodborne diseases on public health, Greece. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1581–1590.
- Gomez-Samblas, M., Vílchez, S., Racero, J.C., Fuentes, M. V., Osuna, A., 2015. Quantification and viability assays of *Toxoplasma gondii* in commercial “Serrano” ham samples using magnetic capture real-time qPCR and bioassay techniques. *Food Microbiol.* 46, 107–113.
- Gomez-Samblas, M., Vílchez, S., Racero, J.C., Fuentes, M.V., Osuna, A., 2016. *Toxoplasma gondii* detection and viability assays in ham legs and shoulders from experimentally infected pigs. *Food Microbiol.* 58, 112–120.
- Graczyk, T.K., Knight, R., Tamang, L., 2005. Mechanical Transmission of Human Protozoan Parasites by Insects. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 128–132.
- Gror, M.W., Yolken, R.H., Xiao, J.C., Beckstead, J.W., Fuchs, D., Mohapatra, S.S., Seyfang, A., Postolache, T.T., 2011. Prenatal depression and anxiety in *Toxoplasma gondii* positive women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 204, 433.e1-433.e7.
- Havelaar, A.H., Haagsma, J.A., Mangen, M.J.J., Kemmeren, J.M., Verhoef, L.P.B., Vijgen, S.M.C., Wilson, M., Friesema, I.H.M., Kortbeek, L.M., Van Duynhoven, Y.T.H.P., Van Pelt, W., 2012. Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009. *Int. J. Food Microbiol.* 156, 231–238.
- Havelaar, A. H., Kirk, M., Torgerson, P., Gibb, H., Hald, T., Lake, R., Praet, N., Bellinger, D., De Silva, N., Gargouri, N., Speybroeck, N., Cawthorne, A., Mathers, C., Stein, C., Angulo, F., Devleeschauwer, B., 2015. World Health Organisation Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLOS Med.* 1–23.
- Hedman, K., Lappalainen, M., Seppäiä, I., Mäkelä, O., 1989. Recent Primary Toxoplasma Infection Indicated by a Low Avidity of Specific IgG. *J. Infect. Dis.* 159 (4), 736-740.
- Hejliček, K., Literak, I., 1993. Prevalence of toxoplasmosis in pigs in the region of south bohemia. *Acta Vet. Brno* 62, 159–166.
- Herrero, L., Gracia, M.J., Pérez-Arquillué, C., Lázaro, R., Herrera, M., Herrera, A., Bayarri, S., 2016. *Toxoplasma gondii*: Pig seroprevalence, associated risk factors and viability in fresh pork meat. *Vet. Parasitol.* 224, 52–59.
- Herrero, L., Gracia, M.J., Pérez-Arquillué, C., Lázaro, R., Herrera, A., Bayarri, S., 2017. *Toxoplasma gondii* in raw and dry-cured ham: the influence of the curing process. *Food Microbiol.* 65, 213-220.
- Hill, D.E., Dubey, J.P., 2002. *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis, and prevention. *Clin. Microbiol. Infect.* 8, 634–640.
- Hill, D.E., Dubey, J.P., 2013. *Toxoplasma gondii* prevalence in farm animals in the United States. *Int. J. Parasitol.* 43, 107–113.
- Hill, D.E., Sreekumar, C., Gamble, H.R., Dubey, J.P., 2004. Effect of Commonly Used

-
- Enhancement Solutions on the Viability of *Toxoplasma gondii* Tissue Cysts in Pork Loin. J. Food Prot. 67, 2230–2233.
- Hill, D.E., Chirukandoth, S., Dubey, J.P., 2005. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. Anim. Health Res. Rev. 6, 41–61.
- Hill, D.E., Benedetto, S.M.C., Coss, C., McCrary, J.L., Fournet, V.M., Dubey, J.P., 2006. Effects of time and temperature on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in enhanced pork loin. J. Food Prot. 69, 1961–5.
- Hill, D.E., Chirukandoth, S., Dubey, J.P., Lunney, J.K., Gamble, H.R., 2006. Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. Vet. Parasitol. 141, 9–17.
- Hill, D.E., Haley, C., Wagner, B., Gamble, H.R., Dubey, J.P., 2010. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in the US swine herd using sera collected during the national animal health monitoring survey (Swine 2006). Zoonoses Public Health. 57(1), 53–59.
- Hillman, A.E., Lymbery, A.J., Thompson, R.C.A., 2016. Is *Toxoplasma gondii* a threat to the conservation of free-ranging Australian marsupial populations? Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. 5, 17–27.
- Hoffmann, S., Fischbeck, P., Krupnick, A., McWilliams, M., 2007. Using expert elicitation to link foodborne illnesses in the United States to foods. J. Food Prot. 70, 1220–1229.
- Holliman, R., 1994. Recent developments in the diagnosis of toxoplasmosis. Serodiagn. Immunother. Infect. Dis. 6, 5–16.
- Homan, W.L., Vercammen, M., De Braekeleer, J., Verschueren, H., 2000. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Int. J. Parasitol. 30, 69–75.
- Howe, D.K., Sibley, L.D., 1995. *Toxoplasma gondii* Comprises Three Clonal Lineages : Correlation of Parasite Genotype with Human Disease. J. Infect. Dis. 172, 1561–1566.
- Hu, K., Mann, T., Striepen, B., Beckers, Con, J.M., Roos, D.S., Murray, J.M., 2002. Daughter Cell Assembly in the Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii*. Mol. Biol. Cell 13, 593–606.
- Hu, K., Roos, D.S., Angel, S.O., Murray, J.M., 2004. Variability and heritability of cell division pathways in *Toxoplasma gondii*. J. Cell Sci. 117, 5697–5705.
- Hutchison, W.M., Dunachie, J.F., Siim, J.C., Work, K., 1969. The life cycle of *Toxoplasma gondii*. Br. Med. J. 4, 806.
- Hutchison, W.M., Dunachie, J.F., Siim, J.C., Work, K., 1970. Coccidian-like Nature of *Toxoplasma gondii*. Br. Med. J. 1, 142–144.
- Hutchison, W.M., Dunachie, J.F., Work, K., Siim, J.C., 1971. The life cycle of the coccidian parasite, *Toxoplasma gondii*, in the domestic cat. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 65, 380–399.
- Ihara, F., Nishikawa, Y., 2014. Starvation of low-density lipoprotein-derived cholesterol induces bradyzoite conversion in *Toxoplasma gondii*. Parasit. Vectors 7, 248.

-
- Innes, E.A., 2009. A Brief History and Overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses Public Health* 57, 1-7.
- Jacobs, L., Remington, J.S., Melton, M.L., 1960. The Resistance of the Encysted Form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 46, 11–21.
- James, G.S., Sintchenko, V.G., Dickeson, D.J., Gilbert, G.L., 1996. Comparison of cell culture, mouse inoculation, and PCR for detection of *Toxoplasma gondii*: effects of storage conditions on sensitivity. *J.Clin.Microbiol.* 34, 1572–1575.
- Jerant Patić, V., Milošević, V., Hrnjaković Cvjetković, I., Patić, A., Stefan Mikić, S., Ristić, M., 2013. Infekcije toksoplazmom gondii kod gravidnih žena. *Med. Pregl.* 66, 459–463.
- Jokelainen, P., 2012. Endemic *Toxoplasma gondii* Genotype II Causes Fatal Infections in Animal Hosts in Europe – Lessons Learnt, V: Djurković-Djaković, O. (уред.), *Toxoplasmosis - Recent Advances*. INTECH, стр. 121-126.
- Jones, J.L., Dubey, J.P., 2010. Waterborne toxoplasmosis - Recent developments. *Exp. Parasitol.* 124, 10–25.
- Jones, J.L., Dubey, J.P., 2012. Foodborne toxoplasmosis. *Clin. Infect. Dis.* 55, 845–851.
- Jones, J.L., Kruszon-Moran, D., Sanders-Lewis, K., Wilson, M., 2007. *Toxoplasma gondii* Infection in the United States, 1999–2004, Decline from the Prior Decade. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 77, 405–410.
- Jones, J.L., Dargelas, V., Roberts, J., Press, C., Remington, J.S., Montoya, J.G., 2009. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 49, 878–884.
- Jongert, E., Melkebeek, V., De Craeye, S., Dewit, J., Verhelst, D., Cox, E., 2008. An enhanced GRA1-GRA7 cocktail DNA vaccine primes anti-*Toxoplasma* immune responses in pigs. *Vaccine* 26, 1025–1031.
- Jovanović-Galović, A., Milošević, V., Hrnjaković-Cvjetković, I., Kovačević, G., Radovanov, J., Elez, I., Patić, A., 2014. Toxoplasmosis in children of the South Bačka region, Serbia: A new light in the public health perspective. *Arch. Biol. Sci.* 66, 131–136.
- Jungersen, G., Jensen, L., Riber, U., Heegaard, P.M.H., Petersen, E., Poulsen, J.S.D., Bille-Hansen, V., Lind, P., 1999. Pathogenicity of selected *Toxoplasma gondii* isolates in young pigs. *Int. J. Parasitol.* 29, 1307–1319.
- Juránková, J., Basso, W., Neumayerová, H., Baláž, V., Jánová, E., Sidler, X., Deplazes, P., Koudela, B., 2014. Brain is the predilection site of *Toxoplasma gondii* in experimentally inoculated pigs as revealed by magnetic capture and real-time PCR. *Food Microbiol.* 38, 167–170.
- Juurikkala, A., 1961. Posterior uveitis and toxoplasmosis. *Acta Ophthalmol.* 39, 367–369.
- Kapperud, G., Jenum, P.A., Stray-Pedersen, B., Melby, K.K., Eskild, A., Eng, J., 1996. Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in Pregnancy: Results of a Prospective Case-Control Study in Norway. *Am. J. Epidemiol.* 144, 405–412.
- Katsube, Y., Hagiwara, T., Masuda, K., 1981. Declining of Prevalence of Latent Swine Toxoplasmosis in Recent Years. *Jpn J Vet Sci* 43, 761–762.

- Kean, B., Kimball, A.C., Christenson, W., 1969. Epidemic of Acute Toxoplasmosis. J. Am. Med. Assoc. 208, 1002–1004.
- Khan, A., Dubey, J.P., Su, C., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Sibley, L.D., 2011. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. Int. J. Parasitol. 41, 645–655.
- Kijlstra, A., Jongert, E., 2009. Toxoplasma-safe meat: close to reality? Trends Parasitol. 25, 18–22.
- Kijlstra, A., Eissen, O.A., Cornelissen, J., Munnikma, K., Eijck, I., Kortbeek, T., 2004. *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 45, 3165–9.
- Kijlstra, A., Meerburg, B.G., Mull, M.F., 2004. Animal-friendly production systems may cause re-emergence of *Toxoplasma gondii*. NJAS 52, 119–132.
- Kim, J.H., Kang, K. Il, Kang, W.C., Sohn, H.J., Jean, Y.H., Park, B.K., Kim, Y., Kim, D.Y., 2009. Porcine abortion outbreak associated with *Toxoplasma gondii* in Jeju Island, Korea. J. Vet. Sci. 10, 147–151.
- Klun, I., Djurković-Djaković, O., Katić-Radivojević, S., Nikolić, A., 2006. Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: Seroprevalence and risk factors. Vet. Parasitol. 135, 121–131.
- Klun, I., Vujanić, M., Yera, H., Nikolić, A., Ivović, V., Bobić, B., Bradonjić, S., Dupouy-Camet, J., Djurković-Djaković, O., 2011. *Toxoplasma gondii* infection in slaughter pigs in Serbia: Seroprevalence and demonstration of parasites in blood. Vet. Res. 42, 1–6.
- Klun, I., Uzelac, A., Villena, I., Mercier, A., Bobić, B., Nikolić, A., Rajnpreht, I., Opsteegh, M., Aubert, D., Blaga, R., van der Giessen, J., Djurković-Djaković, O., 2017. The first isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from horses in Serbia. Parasit. Vectors 10, 167.
- Kotula, A.W., Dubey, J.P., Sharar, A., Andrews, C.D., Shen, K.S., Lindsay, D.S., 1991. Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. J. Food Prot. 54, 687–690.
- Kovačević -Pavičević, D., Radosavljević, A., Ilić, A., Kovačević, I., Djurković -Djaković, O., 2012. Clinical pattern of ocular toxoplasmosis treated in a referral centre in Serbia. Eye 26, 723–728.
- Kringel, H., Dubey, J.P., Beshah, E., Hecker, R., Urban, J.F., 2004. CpG-oligodeoxynucleotides enhance porcine immunity to *Toxoplasma gondii*. Vet. Parasitol. 123, 55–66.
- Kuruca, L., Simin, S., Savović, M., Lalošević, V., 2014. *Toxoplasma gondii* in pigs from Bačka district, Serbia: a serological study, V: First Euro-Regional Conference on Parasitic Zoonoses, Timisoara, Romania, Abstract Book. стр. 31.
- Kuticic, V., Wikerhauser, T., 1996. Studies of the Effect of Various Treatments on the Viability of *Toxoplasma gondii* Tissue Cysts and Oocysts, V: Gross, U. (уред.), (Current Topics in Microbiology and Immunology 219) *Toxoplasma gondii*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, стр. 261–266.

- Lainson, R., 1958. Observations on the development and nature of pseudocysts and cysts of *Toxoplasma gondii*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 52, 396–407.
- Lass, A., Pietkiewicz, H., Modzelewska, E., Dumètre, A., Szostakowska, B., Myjak, P., 2009. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental soil samples using molecular methods. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 28, 599–605.
- Li, X., Wang, Y., Yu, F., Li, T., Zhang, D., 2010. An outbreak of lethal toxoplasmosis in pigs in the Gansu province of China. J. Vet. Diagn. Invest. 22, 442–444.
- Liesenfeld, O., Remington, J.S., 2001. Toxoplasmosis. Y: Martens, M., Faro, S., Soper, D. (уред.), Infectious diseases in women, WB Saunders, Philadelphia, стр. 57-79.
- Lind, P., Haugegaard, J., Wingstrand, A., Henriksen, S.A., 1997. The time course of the specific antibody response by various ELISAs in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. Vet. Parasitol. 71, 1–15.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., 2009. Long-Term Survival of *Toxoplasma gondii* Sporulated Oocysts in Seawater. J. Parasitol. 95, 1019–20.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., 2011. *Toxoplasma gondii*: the changing paradigm of congenital toxoplasmosis. Parasitology 138, 1829–31.
- Lindsay, D., Blagburn, B., Braund, K., 1995. A review of *Toxoplasma gondii* and muscular toxoplasmosis. BAM 5(3), 255-260.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., Butler, J.M., Blagburn, B.L., 1997. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. Vet. Parasitol. 73, 27–33.
- Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., Dubey, J.P., 2002. Survival of nonsporulated *Toxoplasma gondii* oocysts under refrigerator conditions. Vet. Parasitol. 103, 309–313.
- Lindsay, D.S., Collins, M. V., Mitchell, S.M., Wetch, C.N., Rosypal, A.C., Flick, G.J., Zajac, A.M., Lindquist, A., Dubey, J.P., 2004. Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in Eastern oysters (*Crassostrea virginica*). J. Parasitol. 90, 1054–7.
- Lindsay, D.S., Collins, M. V., Holliman, D., Flick, G.J., Dubey, J.P., 2006. Effects of high-pressure processing on *Toxoplasma gondii* tissue cysts in ground pork. J. Parasitol. 92, 195–196.
- Lopes, W.D.Z., Rodriguez, J.D.A., Souza, F.A., Dos Santos, T.R., Dos Santos, R.S., Rosanese, W.M., Lopes, W.R.Z., Sakamoto, C.A., da Costa, A.J., 2013. Sexual transmission of *Toxoplasma gondii* in sheep. Vet. Parasitol. 195, 47–56.
- Lubroth, J.S., Dreesen, D.W., Ridenhour, R.A., 1983. The role of rodents and other wildlife in the epidemiology of swine toxoplasmosis. Prev. Vet. Med. 1, 169–178.
- Lunden, A., Ugglå, A., 1992. Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. Int. J. Food Microbiol. 15, 357–363.
- Lyons, R.E., McLeod, R., Roberts, C.W., 2002. *Toxoplasma gondii* tachyzoite–bradyzoite interconversion. Trends Parasitol. 18, 198–201.
- Maenz, M., Schlüter, D., Liesenfeld, O., Schares, G., Gross, U., Pleyer, U., 2014. Ocular

-
- toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. *Prog. Retin. Eye Res.* 39, 77–106.
- Marković, M., Ivović, V., Štajner, T., Djokić, V., Klun, I., Bobić, B., Nikolić, A., Djurković-Djaković, O., 2014. Evidence for genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in selected intermediate hosts in Serbia. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 37, 173–179.
- Masur, H., Jones, T.C., Lempert, J.A., Cherubini, T.D., 1978. Outbreak of toxoplasmosis in a family and documentation of acquired retinochoroiditis. *Am. J. Med.* 64, 396–402.
- Mateus-Pinilla, N. E., Dubey, J.P., 1999. A field trial of the effectiveness of a feline *Toxoplasma gondii* vaccine in reducing *T. gondii* exposure for swine. *J. Parasitol.* 85, 855–860.
- McCabe, R.E., Oster, S., 1989. Current recommendations and future prospects in the treatment of toxoplasmosis. *Drugs.* 38(6), 973-987.
- McDonald, J.C., Gyorkos, T.W., Alberton, B., Maclean, J.D., Richer, G., Juranek, D., 1990. An Outbreak of Toxoplasmosis in Pregnant Women in Northern Québec. *J. Infect. Dis.* 161, 769–774.
- McLeod, R., Boyer, K.M., Lee, D., Mui, E., Wroblewski, K., Karrison, T., Noble, A.G., Withers, S., Swisher, C.N., Heydemann, P.T., Sautter, M., Babiarz, J., Rabiah, P., Meier, P., Grigg, M.E., 2012. Prematurity and severity are associated with *Toxoplasma gondii* alleles (NCCCTS, 1981-2009). *Clin. Infect. Dis.* 54, 1595–1605.
- McLeod, R., Van Tubbergen, C., Montoya, J.G., Petersen, E., 2013. *Human Toxoplasma Infection, V: Toxoplasma gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods: Second Edition.* Elsevier. ctp. 99-159.
- Meerburg, B.G., van Riel, J.W., Cornelissen, J.B., Kijlstra, A., Mul, M.F., 2006. Cats and Goat Whey Associated with *Toxoplasma gondii* Infection in Pigs. *Vector-borne zoonotic Dis.* 6, 266–275.
- Mercier, A., Devillard, S., Ngoubangoye, B., Bonnabau, H., Bañuls, A. L., Durand, P., Bettina, S., Ajzenberg, D., Dardé, M. L., 2010. Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: Population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 4(11), e876.
- Miller, C.M., Boulter, N.R., Ikin, R.J., Smith, N.C., 2009. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 39, 23–39.
- Miller, M.A., Miller, W.A., Conrad, P.A., James, E.R., Melli, A.C., Leutenegger, C.M., Debritz, H.A., Packham, A.E., Paradies, D., Harris, M., Ames, J., Jessup, D.A., Worcester, K., Grigg, M.E., 2008. Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: new linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *Int. J. Parasitol.* 38, 1319–1328.
- Miman, O., Aktan, E., Ozcan, O., Atambay, M., Karlidag, R., Unal, S., 2010. Is there any role of *Toxoplasma gondii* in the etiology of obsessive – compulsive disorder? *Psychiatry Res.* 177, 263–265.

-
- Moncada, P.A., Montoya, J.G., 2012. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 10, 815–828.
- Mondragon, R., Howe, D.K., Dubey, J.P., Sibley, L.D., 1998. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. *J. Parasitol.* 84, 639–641.
- Morrisette, N.S., Ajioka, J.W., 2009. The early years of *Toxoplasma* research: What's past is prologue. *Int. J. Parasitol.* 39, 865–869.
- Morrisette, N.S., Sibley, L.D., 2002. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 21–38.
- Mosti, M., Pinto, B., Giromella, A., Fabiani, S., Cristofani, R., Panichi, M., Bruschi, F., 2013. A 4-year evaluation of toxoplasmosis seroprevalence in the general population and in women of reproductive age in central Italy. *Epidemiol. Infect.* 141, 2192–5.
- Munoz-Zanzi, C.A., Fry, P., Lesina, B., Hill, D., 2010. *Toxoplasma gondii* Oocyst-specific antibodies and source of infection. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1591–1593.
- Nasiri, V., Teymurzadeh, S., Karimi, G., Nasiri, M., 2016. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in snakes. *Exp. Parasitol.* 169, 102–106.
- Neumayerová, H., Juránková, J., Saláková, A., Gallas, L., Kovařík, K., Koudela, B., 2014. Survival of experimentally induced *Toxoplasma gondii* tissue cysts in vacuum packed goat meat and dry fermented goat meat sausages. *Food Microbiol.* 39, 47–52.
- Nichols, B.A., Chiappino, M.L., 1987. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.* 34, 217–226.
- Nicolle, C., Manceaux, L.H., 1908. Sur une infection a corps de Leischman (ou organismes voisins) du gondii. *C R Acad Sci (Paris)* 147: 763-766.
- Nicolle, C., Manceaux, L.H., 1909. Sur un protozoaire nouveau du gondi. *Arch. Inst. Pasteur Tunis* 97–103.
- Olinda, R.G., Pena, H.F.J., Frade, M.T.S., Ferreira, J.S., Maia, L.Â., Gennari, S.M., Oliveira, S., Dantas, A.F.M., Riet-Correa, F., 2016. Acute toxoplasmosis in pigs in Brazil caused by *Toxoplasma gondii* genotype Chinese 1. *Parasitol. Res.* 115, 2561–2566.
- Omata, Y., Dilorenzo, C., Venturini, C., Venturini, L., Igarashi, I., Saito, A., Suzuki, N., 1994. Correlation between antibody levels in *Toxoplasma gondii* infected pigs and pathogenicity of the isolated parasite. *Vet. Parasitol.* 51, 205–210.
- Opsteegh, M., Langelaar, M., Sprong, H., den Hartog, L., De Craeye, S., Bokken, G., Ajzenberg, D., Kijlstra, A., der Giessen, J. van, 2010. Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 139, 193–201.
- Ortega-Pacheco, A., Acosta-Viana, K.Y., Guzman-Marin, E., Uitzil-Álvarez, B., Rodríguez-Buenfil, J.C., Jimenez-Coello, M., 2011. Infection dynamic of *Toxoplasma gondii* in two fattening pig farms exposed to high and low cat density in an endemic region. *Vet. Parasitol.* 175, 367–371.
- Pardini, L., Maksimov, P., Herrmann, D.C., Bacigalupe, D., Rambeaud, M., Machuca, M., Moré,

- G., Basso, W., Schares, G., Venturini, M.C., 2012. Evaluation of an in-house TgSAG1 (P30) IgG ELISA for diagnosis of naturally acquired *Toxoplasma gondii* infection in pigs. *Vet. Parasitol.* 189, 204–210.
- Paștiu, A.I., Györke, A., Blaga, R., Mircean, V., Rosenthal, B.M., Cozma, V., 2013. In Romania, exposure to *Toxoplasma gondii* occurs twice as often in swine raised for familial consumption as in hunted wild boar, but occurs rarely, if ever, among fattening pigs raised in confinement. *Parasitol. Res.* 112, 2403–2407.
- Paștiu, A.I., Györke, A., Kalmar, Z., Bolfa, P., Rosenthal, B.M., Oltean, M., Villena, I., Spinu, M., Cozma, V., 2015. *Toxoplasma gondii* in horse meat intended for human consumption in Romania. *Vet. Parasitol.* 212, 393–395.
- Pavesio, C.E., Chiappino, M.L., Setzer, P.Y., Nichols, B.A., 1992. *Toxoplasma gondii*: differentiation and death of bradyzoites. *Parasitol. Res.* 78, 1–9.
- "PCR Methods—Top Ten Strategies | Thermo Fisher Scientific". <https://www.thermofisher.com/rs/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-methods.html> (datum приступа: 14 Mar. 2017).
- Pedersen, M.G., Mortensen, P.B., Norgaard-Pedersen, B., Postolache, T.T., 2012. *Toxoplasma gondii* Infection and Self-directed Violence in Mothers. *Arch. Gen. Psychiatry* 69, 1123–1130.
- Pelloux, H., Guy, E., Angelici, M.C., Aspöck, H., Bessières, M.H., Blatz, R., Del Pezzo, M., Girault, V., Gratzl, R., Holberg-Petersen, M., Julie Johnson, Krüger, D., Lappalainen, M., Naessens, A., Olsson, M., 1998. A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. *FEMS Microbiol. Lett.* 165, 231–237.
- Pereira, K.S., Franco, R.M.B., Leal, D.A.G., 2010. Transmission of toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) by foods. *Adv. Food Nutr. Res.* 60, 1–19.
- Petersen, E., Vesco, G., Villari, S., Buffolano, W., 2010. What do we know about risk factors for infection in humans with *Toxoplasma gondii* and how can we prevent infections? *Zoonoses Public Health* 57, 8–17.
- Pinkerton, H., Henderson, R.G., 1941. Adult toxoplasmosis. *J. Am. Med. Assoc.* 116, 807–814.
- Pomares, C., Ajzenberg, D., Bornard, L., Bernardin, G., Hasseine, L., Dardé, M.-L., Marty, P., 2011. Toxoplasmosis and Horse Meat, France. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1327–1328.
- Pott, S., Koethe, M., Bangoura, B., Zoller, B., Dauschies, A., Straubinger, R.K., Fehlhaber, K., Ludewig, M., 2013. Effects of pH, sodium chloride and curing salt on the infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *J. Food Prot.* 76, 1056–1061.
- Purslow, P., 2016. Parasitic zoonoses present some risks with low-temperature cooking of pork. *Meat Sci.* 119, 14–15.
- Ramachandran, R., Radhan, P., Anand, R., 2014. CNS toxoplasmosis in an immunocompetent individual. *Radiol. Case Reports* 9, 10–13.

- Ranucci, D., Veronesi, F., Branciarri, R., Miraglia, D., Moretta, I., Fioretti, D.P., 2012. Evaluation of an immunofluorescence antibody assay for the detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in meat juice samples from finishing pigs. *Foodborne Pathog. Dis.* 9, 75–78.
- Remington, J.S., McLeod, R., Wilson, C.B., Desmonts, G., 2011. *Toxoplasmosis. V: Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant.* 7th ed. Elsevier, WB Saunders, Philadelphia, PA. 918-1041.
- Richomme, C., Aubert, D., Gilot-Fromont, E., Ajzenberg, D., Mercier, A., Ducrot, C., Ferté, H., Delorme, D., Villena, I., 2009. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from wild boar (*Sus scrofa*) in France. *Vet. Parasitol.* 164, 296–300.
- Riemann, H.P., Meyer, M.E., Theis, J.H., Kelso, G., Behymer, D.E., 1975. Toxoplasmosis in an infant fed unpasteurized goat milk. *J. Pediatr.* 87, 573–576.
- Robert-Gangneux, F., Darde, M.L., 2012. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 264–296.
- PЗС, (Републички завод за статистику) 2014, Број свиња. <http://webrzs.stat.gov.rs/WebSite/public/ReportView.aspx> (датум приступа: 31.08.2014)
- PЗС (Републички завод за статистику) 2015, Број стоке заклане током 2015. <http://www.stat.gov.rs/WebSite/Public/ReportResultView.aspx?rptKey=indId%3d1302020103IND01%26102%3dRS%262%3d%23last%233%26174%3d80001%2c80002%2c80003%2c80004%2c80005%2c80006%2c80007%2c80008%2c80009%2c80010%2c80011%2c80012%2c80013%2c80014%2c80015%2c80016%26sAreaId%3d1302020103%26dType%3dName%26IType%3dEnglish>. (датум приступа 01.12.2016.)
- Saari, M., Raisanen, S., 1974. The survival of trophozoites in human tears , saliva , and urine and in cow's milk. *Acta Ophthalmol.* 52, 847–852.
- Sabin, A.B., 1939. Biological and Immunological Identity of *Toxoplasma* of Animal and Human Origin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 41, 75–80.
- Sabin, A.B., 1941. Toxoplasmic encephalitis in children. *J. Am. Med. Assoc.* 116, 801–807.
- Sabin, A.B., Feldman, H.A., 1948. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). *Science.* 108, 660–663.
- Sacks, J.J., Roberto, R.R., Brooks, N.F., 1982. Toxoplasmosis Infection Associated With Raw Goat's Milk. *JAMA* 248, 1728–1732.
- Sacks, J.J., Delgado, D.G., Lobel, H.O., Parker, R.L., 1983. Toxoplasmosis Infection Associated with Eating Undercooked Venison. *Am. J. Epidemiol.* 118, 832–838.
- Samico-Fernandes, E.F.T., de Melo, R.P.B., de Cássia Peixoto Kim, P., de Almeida, J.C., De Barros, L.D., Garcia, J.L., Da Silva, J.C.R., Mota, R.A., 2015. First report of genotype #65 of *Toxoplasma gondii* in pigs. *Parasitol. Res.* 114, 3927–3930.
- Santana, L.F., Rossi, G.A.M., Gaspar, R.C., Pinto, V.M.R., Oliveira, G.P., Costa, A.J., 2013. Evidence of sexual transmission of *Toxoplasma gondii* in goats. *Small Rumin. Res.* 115, 130–133.

- Sasaki, S., Iida, T., Tsuchiya, Y., Omura, Y., Usui, K., Tsujioka, T., Suzuki, M., Kawarazaki, N., 1976. A Collective Outbreak of Toxoplasmosis in Swine. *J. Japan Vet. Med. Assoc.* 29, 77–82.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M., 2011. Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 7–15.
- Schlüter, D., Däubener, W., Schares, G., Groß, U., Pleyer, U., Lüder, C., 2014. Animals are key to human toxoplasmosis. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 917–929.
- Sepúlveda-Arias, J.C., Gómez-Marin, J.E., Bobić, B., Naranjo-Galvis, C.A., Djurković-Djaković, O., 2014. Toxoplasmosis as a travel risk. *Travel Med. Infect. Dis.*, 12(6), 592–601.
- Sergeant, ESG, 2016. Epitools epidemiological calculators. Ausvet Pty Ltd. Available at: <http://epitools.ausvet.com.au>. (датум приступа 01.12.2016.)
- Sheffield, H.G., Melton, M.L., 1970. *Toxoplasma gondii*: The Oocyst, Sporozoite, and Infection of Cultured Cells. *Science.* 167, 892–893.
- Shwab, E. K., Zhu, Xi.-Q., Majumdar, D., Pena, H. F. J., Gennari, S. M., Duney, J. P., Su, C., 2014. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitol.*, 141(4), 453–461.
- Sibley, L.D., Khan, A., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., 2009. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 2749–61.
- Simitch, T., Petrovitch, Z., Bordjochki, A., Savin, Ž., Mikovitch, Z., 1967. Infection naturelle du porc des environs de Beograd par *Toxoplasma gondii* et l'infection expérimentale des porcelets per os par le même parasitee, Y: Todorović, K. (уред.), Bulletin tome XXXVIII: classe des sciences medicales. Srpska akademija nauka i umetnosti, "Naučno delo," Beograd, стр. 97–98.
- Simon, A., Poulin, M.B., Rousseau, A.N., Ogden, N.H., 2013. Fate and transport of *Toxoplasma gondii* oocysts in seasonally snow covered watersheds: a conceptual framework from a melting snowpack to the Canadian arctic coasts. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 994–1005.
- Skariah, S., Mcintyre, M.K., Mordue, D.G., 2012. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitol. Res.* 107, 253–260.
- Slany, M., Reslova, N., Babak, V., Lorencova, A., 2016. Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* in pork meat from different production systems in the Czech Republic. *Int. J. Food Microbiol.* 238, 252–255.
- Smith, K.E., Zimmerman, J.J., Patton, S., Beran, G.W., Hill, H.T., 1992. The epidemiology of toxoplasmosis in Iowa swine farms with an emphasis on the roles of free-living mammals. *Vet. Parasitol.* 42, 199–211.
- Sobanski, V., Ajzenberg, D., Delhaes, L., Bautin, N., Just, N., 2013. Severe toxoplasmosis in immunocompetent hosts: Be aware of atypical strains. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187,

1143–1145.

- Soete, M., Camus, D., Dubremetz, J.F., 1994. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* in vitro. *Exp Parasitol.* 78, 361–370.
- Splendore, A., 1908. Un nuovo protozoa parassito de' conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il kala-azar dell'uomo. *Rev. Soc. Sci. São Paulo* 3: 109-112.
- Su, C., Dubey, J.P., 2009. *Toxoplasma*, V: Liu, D. (уред.), Molecular Detection of Foodborne Pathogens. Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, стр. 740–753.
- Su, C., Zhang, X., Dubey, J.P., 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. *Int. J. Parasitol.* 36, 841–848.
- Su, C., Shwab, E.K., Zhou, P., Zhu, X.Q., Dubey, J.P., 2010. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 137, 1–11.
- Su, E., Honda, A., Latkany, P., 2014. Ocular Disease due to *Toxoplasma gondii*, Second Edi. ed, *Toxoplasma gondii*. Elsevier Ltd. pp. 161-192.
- Sullivan, W.J., Jeffers, V., 2012. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 717–733.
- Suzuki, Y., Orellana, MA., Schreiber, R.D., Remington, J.S., 1988. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240, 516–518.
- Switaj, K., Master, A., Skrzypczak, M., Zaborowski, P., 2005. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 170–176.
- Šibalić, D., 1966. Prilog poznavanju učestalosti infekcije sa *Toxoplasma gondii* kod svinja. *Acta Vet. Brno.* 16, 193–196.
- Štajner, T., Vasiljević, Z., Vujić, D., Marković, M., Ristić, G., Mičić, D., Pašić, S., Ivović, V., Ajzenberg, D., Djurković-Djaković, O., 2013. Atypical strain of *Toxoplasma gondii* causing fatal reactivation after hematopoietic stem cell transplantation in a patient with an underlying immunological deficiency. *J. Clin. Microbiol.* 51, 2686–2690.
- Štajner, T., Bobić, B., Klun, I., Nikolic, A., Srbljanovic, J., Uzelac, A., Rajnpreht, I., Djurkovic-Djakovic, O., 2016. Prenatal and Early Postnatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis in a Setting With No Systematic Screening in Pregnancy. *Medicine (Baltimore).* 95, 1-8.
- Tait, E.D., Hunter, C.A., 2009. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 201–210.
- Tenter, A.M., 2009. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 364–369.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30, 1217–1258.

- Teutsch, S.M., Juranek, D.D., Sulzer, A., Dubey, J.P., Sikes, K.R., 1979. Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. *N. Engl. J. Med.* 300, 695–700.
- Thiptara, A., Kongkaew, W., Bilmad, U., Bhumibhamon, T., Anan, S., 2006. Toxoplasmosis in piglets. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1081, 336–338.
- Torrey, E.F., Yolken, R.H., 2013. *Toxoplasma* oocysts as a public health problem. *Trends Parasitol.* 29, 380–384.
- Torrey, E.F., Bartko, J.J., Yolken, R.H., 2012. *Toxoplasma gondii* and Other Risk Factors for Schizophrenia : An Update. *Schizophr. Bull.* 38, 642–647.
- Tsutsui, V.S., Freire, R.L., Garcia, J.L., Gennari, S.M., Vieira, D.P., Marana, E.R.M., Prudêncio, L.B., Navarro, I.T., 2007. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and mouse bioassay in commercial cuts of pork from experimentally infected pigs. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59, 30–34.
- Turčeková, L., Antolová, D., Reiterová, K., Spišák, F., 2013. Occurrence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in naturally infected pigs. *Acta Parasitol.* 58, 361–6.
- Van der Giessen, J., Fonville, M., Bouwknecht, M., Langelaar, M., Vollema, A., 2007. Seroprevalence of *Trichinella spiralis* and *Toxoplasma gondii* in pigs from different housing systems in The Netherlands. *Vet. Parasitol.* 148, 371–374.
- Van Wormer, E., Fritz, H., Shapiro, K., Mazet, J.A.K., Conrad, P.A., 2013. Molecules to modeling: *Toxoplasma gondii* oocysts at the human-animal-environment interface. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 217–231.
- Velmurugan, G. V., Su, C., Dubey, J. P., 2009. Isolate Designation and Characterization of *Toxoplasma gondii* Isolates from Pigs in the United States. *J. Parasitol.* 95, 95–99.
- Venturini, M.C., Bacigalupe, D., Venturini, L., MacHuca, M., Perfumo, C.J., Dubey, J.P., 1999. Detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in stillborn piglets in Argentina. *Vet. Parasitol.* 85, 331–334.
- Venturini, M.C., Bacigalupe, D., Venturini, L., Rambeaud, M., Basso, W., Unzaga, J.M., Perfumo, C.J., 2004. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sows from slaughterhouses and in pigs from an indoor and an outdoor farm in Argentina. *Vet. Parasitol.* 124, 161–165.
- Veronesi, F., Ranucci, D., Branciarri, R., Miraglia, D., Mammoli, R., Fioretti, D.P., 2011. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection on finishing swine reared in the Umbria region, central Italy. *Zoonoses Public Health* 58, 178–84.
- Veronesi, F., Ranucci, D., Papa, P., Branciarri, R., Miraglia, D., Moretta, I., Caporali, A., Pourquier, P., Piergili Fioretti, D., 2012. Comparazione tra un kit commerciale ELISA e IFAT per la determinazione di anticorpi anti-*Toxoplasma gondii* su siero e succo carneo di suino. *Large Anim. Rev.* 18, 65–70.
- Villari, S., Vesco, G., Petersen, E., Crispo, A., Buffolano, W., 2009. Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. *Vet. Parasitol.* 161, 1–8.
- Villena, I., Aubert, D., Gomis, P., Ferte, H., Ingland, J., Dondon, J., Pisano, E., Pinon, J., 2004. Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. *Appl. Environ.*

- Microbiol. 70, 4035–4039.
- Villena, I., Durand, B., Aubert, D., Blaga, R., Geers, R., Thomas, M., Perret, C., Alliot, A., Escotte-Binet, S., Thébault, A., Boireau, P., Halos, L., 2012. New strategy for the survey of *Toxoplasma gondii* in meat for human consumption. *Vet. Parasitol.* 183, 203–208.
- Vostalová, E., Literák, I., Pavlásek, I., Sedlák, K., 2000. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in finishing pigs in a large scale farm in the Czech Republic. *Acta Vet. Brno* 69, 209–212.
- Вујанић, М., 2012. Молекуларна детекција и генотипизација сојева паразита *Toxoplasma gondii* изолованих у Србији. Универзитет у Београду. Докторска дисертација.
- Vujanić, M., Ivočić, V., Kataranovski, M., Nikolić, A., Bobić, B., Klun, I., Villena, I., Kataranovski, D., Djurković-Djaković, O., 2011. Toxoplasmosis in naturally infected rodents in Belgrade, Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 1209–1211.
- Wallace, G.D., 1971. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii* by filth-flies. *Am. J. Trop. Medicine Hyg.* 20, 411–413.
- Wallace, G.D., 1972. Experimental Transmission of *Toxoplasma gondii* by Cockroaches. *J. Infect. Dis.* 126, 545–547.
- Wallander, C., Frössling, J., Dórea, F.C., Uggla, A., Vågsholm, I., Lundén, A., 2016. Pasture is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection in fattening pigs. *Vet. Parasitol.* 224, 27–32.
- Walsh, C.P., Hammond, S.E., Zajac, A.M., Lindsay, D.S., 1999. Survival of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites in Goat Milk: Potential Source of Human Toxoplasmosis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 73S–74S.
- Wang, H., Wang, T., Luo, Q., Huo, X., Wang, L., Liu, T., Xu, X., Wang, Y., Lu, F., Lun, Z., Yu, L., Shen, J., 2012. Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in pork from retail meat stores in Eastern China. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 393–397.
- Wang, Y., Zhang, D., Wang, G., Yin, H., Wang, M., 2013. Immunization with excreted-secreted antigens reduces tissue cyst formation in pigs. *Parasitol. Res.* 112, 3835–3842.
- Warnekulasuriya, M.R., Johnson, J.D., Holliman, R.E., 1998. Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. *Int. J. Food Microbiol.* 45, 211–215.
- Weigel, R.M., Dubey, J.P., Siegel, A.M., Kitron, U.D., Mannelli, A., Mitchell, M.A., Mateus-Pinilla, N.E., Thulliez, P., Shen, S.K., Kwok, O.C., 1995. Risk factors for transmission of *Toxoplasma gondii* on swine farms in Illinois. *J. Parasitol.* 81, 736–741.
- Weinman, D., Chandler, A.H., 1954. Toxoplasmosis in swine and rodents. Reciprocal oral infection and potential human hazard. *Exp. Biol. Med.* 87, 211–216.
- Weiss, L.M., Dubey, J.P., 2009. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int. J. Parasitol.* 39, 895–901.
- Weiss, L.M., Ma, Y.F., Takvorian, P.M., Tanowitz, H.B., Wittner, M., 1998. Bradyzoite development in *Toxoplasma gondii* and the hsp70 stress response. *Infect. Immun.* 66, 3295–3302.
- Wilson, I., Gardner, M., Rangachari, K., Williamson, D., 1993. Extrachromosomal DNA in the

-
- Apicomplexa*. У: Smith J.E. (уред.) *Toxoplasmosis*. NATO ASI Series (Series H: Cell Biology), vol 78. Springer, Berlin, Heidelberg, стр. 51-60.
- Wolf, A., Cowen, D., 1937. Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man. *Bull Neurol Inst NY* 6, 306–371.
- Wolf, A., Cowen, D., Paige, B., 1939. Human toxoplasmosis: Occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. *Science* 89, 226–227.
- Work, K., 1967. Isolation of *Toxoplasma gondii* from the flesh of sheep, swine and cattle. *Acta Pathol Microbiol Scand* 71, 296–306.
- Work, K., 1968. Resistance of *Toxoplasma gondii* encysted in pork. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 73, 85–92.
- Work, K., Hutchison, W.M., 1969. The new cyst of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 77, 414–424.
- Work, K., Eriksen, L., Fennestad, K., Moller, T., Siim, J., 1970. Experimental toxoplasmosis in pregnant sows. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B* 78, 129–139.
- Yilmaz, S.M., Hopkins, S.H., 1972. Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Parasitol.* 58, 938–9.
- Zhu, S., 2009. Psychosis may be associated with toxoplasmosis. *Med. Hypotheses* 73, 799–801.
- Živković, D., Perunović, D., 2012. Poznavanje mesa, praktikum. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun. стр. 56

9. ПРИЛОЗИ

ПРИЛОГ 1

Радни раствор 2-МЕ добијен је растварањем 14 ml концентрованог 2-МЕ (Sigma-Aldrich, Немачка) у 1l фосфатног пуфера (PBS). Због високе испарљивости, пред свако тестирање прављен је свеж раствор.

ПРИЛОГ 2

BABS, за прављење разређења антигена за МАТ:

NaCl	7,012g
H ₃ BO ₃	3,092g
NaN ₃	1,0g
BSA*	4,0g
dH ₂ O	do 1l
конц. NaOH	по потреби**

* Albumin bovine, fraction V, pH 7,0, чистоћа: 99% (ICN Biomedicals Inc., Калифорнија, САД)

** за дотеривање рН вредности до 8,95

ПРИЛОГ 3

Радни (0,25%) раствор трипсина за вештачку дигестију припремљен је према формули која је у употреби у Лабораторији за културу ћелија Завода за антирабичну заштиту, „Пастеров завод“, уз модификацију која је подразумевала избацивање версена:

NaCl	8g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1,44g
KH ₂ PO ₄	0,2g
Tripsin*	2,5g
H ₂ O**	do 1l

* Трипсин из свињског панкреаса (Sigma-Aldrich, Т4799 (10g)), 1000-2000 ВАЕЕ јединица/mg, лиофилизован, погодан за употребу на култури ћелија

** Коришћена је дејонизована вода

 Рецептатура за PBS (1X концентрован)

Направљен раствор трипсина аликвотиран је у пластичне епрувете од 50ml и чуван на -20°C до употребе.

ПРИЛОГ 4

Нуклеотидна секвенца региона 529 бп *T. gondii* (прајмери HO1 и HO2 за PCR у реалном времену су обележени плавом бојом, а проба HOFT црвеном бојом):

CTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTGTTTTTTTATTTTTTTTTCTTTTTGTTTTTCTGATT
 TTTGTTTTTTTTGACTCGGGCCCAGCTGCGTCTGTCGGGATGAGACCGCGGAGCCGA
 AGTGCCTTTTTCTTTTTTTGACTTTTTTTTTGTTTTTTCACAGGCAAGCTCGCCTGTGCTT
 GGAGCCACAGAAGGGACAGAAGTCGAAGGGGACTACAGACGCGATGCCGCTCCTC
 CAGCCGTCTTGGAGGAGAGATATCAGGACTGTAGATGAAGGCGAGGGTGAGGATGA
 GGGGGTGGCGTGGTTGGGAAGCGACGAGAGTCGGAGAGGGAGAAGATGTTTCCGG
 CTTGGCTGCTTTTCCTGGAGGGTGGAAAAAGAGACACCGGAATGCGATCCAGACG
 AGACGACGCTTTCTCGTGGTATGGCGGAGAGAATTGAAGAGTGGAGAAGAG
 GCGAGGGAGACAGAGTCGGAGGCTTGGACGAAGGGAGGAGGGGTAGGAGA
 GGAATCCAGATGCACTGTGTCTGCAG