

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Aleksandra B. Uzelac

Biološka i molekularna  
karakterizacija sojeva loze III  
*Toxoplasma gondii* izolovanih u  
Srbiji

Doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Aleksandra B. Uzelac

Biological and molecular  
characterization of lineage III strains  
of *Toxoplasma gondii* isolated in  
Serbia

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

## **Mentori**

-----  
Dr. Olgica Đurković-Đaković, naučni savetnik,  
Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu,  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

-----  
Dr. Dušanka Savić-Pavićević, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

## **Članovi komisije**

-----  
Dr. Đorđe Miljković, naučni savetnik,  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu,  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

-----  
Dr. Vera Nikolić, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

-----  
Dr. Ivana Klun, viši naučni saradnik,  
Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu,  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

## Zahvalnica

Eksperimentalni deo disertacije je u celosti urađen na Institutu za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu, u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za toksoplazmozu Centra izuzetnih vrednosti za Zoonoze prenošene hranom i vektorima.

Mojoj mentorki, dr. Olgici Đurković-Đaković dugujem ogromnu zahvalnost za mnoge prilike koje mi je pružila da se usavršavam, za dugogodišnju podršku, razumevanje, savetovanje i usmeravanje moje naučne karijere. Eksperimentalni deo i pisanje ove teze, kao i mnogih naučnih radova je bilo moguće prvenstveno zahvaljujući njenom ogromnom stečenom znanju i naučnom iskustvu. Motivisala me je da uvek razmišljam kritično, nezavisno i da ne odustajem dok ne postignem svoj cilj.

Mentorki dr. Dušanki Savić-Pavićević se zahvaljujem prvenstveno za razumevanje, lepe reči i osmeh u situacijama kada je to bilo potrebno. Takođe, želim da joj zahvalim na pomoći i trudu koji je uložila od samog početka, prijave doktorskog projekta, do završene i napisane doktorske disertacije.

Dr. Ivani Klun se zahvaljujem na vremenu za diskusije, za pomoć, za savete kao i izuzetnoj posvećenosti detaljima, a posebno sposobnosti da prepozna one detalje koji nekada čine suštinu.

Svim članovima laboratorije, posebno Vladimiru Ćirkoviću, Nedi Bauman i Mariji Stamenov-Đaković, dugujem zahvalnost na pomoći, podršci i podsticaju. Eksperimentalni deo teze, koji je bio pozamašan i tehnički zahtevan, je savladan sa lakoćom uz njihovu pomoć.

Mojoj porodici posvećujem ovu tezu u znak zahvalnosti na podsticaju i motivaciji da istrajem.

## Sažetak

### Biološka i molekularna karakterizacija sojeva loze III *Toxoplasma gondii* izolovanih u Srbiji

*Toxoplasma gondii*, protozoa iz filuma Apikompleksa, patogeni je endoparazit svih homeotermnih vrsta koji se prenosi ingestijom kontaminirane hrane i vode i uzročnik je toksoplazmoze. Na osnovu podataka o visokoj globalnoj prevalenciji i saznanju da patologija koju prouzrokuje infekcija može biti ozbiljna i kod imunokompetentne populacije, *T. gondii* je po značaju za javno zdravlje rangirana kao globalnom nivou na 4., a u Evropi na 2. mesto. Intenzitet patologije uslovljene specifičnim interakcijama sa imunskim ćelijama domaćina, velikim se delom zasniva na genotipu parazita, kojih ima preko 300 u globalnoj cirkulaciji. Iako su mnogi geni markeri virulencije identifikovani, fenotip virulencije je teško utvrditi isključivo genetikom, te se istraživanja fokusiraju na mehanizame virulencije. U ovom radu je ispitana virulencija četiri različita varijantna genotipa *T. gondii* loze III koja čini 25,3% populacione strukture *T. gondii* u Srbiji, na *in vivo* modelu Swiss Webster miševa, dok su mehanizmi ispitani *in vitro* u VERO ćelijama i kroz ekspresiju gena u mozgu i slezini u ranoj i kasnoj infekciji. Utvrđeno je da su genotipovi EQ40 i K1 intermedijarno virulentni dok su EQ39 (ToxoDB#54) i G13 nisko virulentni. Pokazano je da su mehanizmi virulencije stopa proliferacije i litički kapacitet, koji su posledica više metaboličke aktivnosti, pokazane kroz povišenu ekspresiju ENO2. Ovi mehanizmi uslovljavaju intenzivan proinflamatorni odgovor koji je u ranoj infekciji evidentan kroz povišen nivo IL-12p40 i IFN- $\gamma$  mRNK u mozgu i slezini. Uprkos različitim karakteristikama imunskog odgovora na genotipove intermedijarne i niske virulencije, imunizovani miševi preživljavaju re-infekciju RH (ToxoDB#10) sojem, što ukazuje na to da kvalitet imunskog odgovora ne zavisi od virulencije genotipa.

**Ključne reči:** *Toxoplasma gondii*, parazit, virulencija, genotip, imunski odgovor, domaćin, mortalitet, inflamacija, loza, populaciona struktura

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Molekularna biologija

**UDK broj:**

## Abstract

### **Biological and molecular characterization of lineage III strains of *Toxoplasma gondii* isolated in Serbia**

*Toxoplasma gondii*, the etiological agent of toxoplasmosis, is a food and waterborne Apicomplexan protozoan endoparasite of homeothermic species transmissible by ingestion. Due to a high global prevalence and the fact that infection can cause serious pathology in the immunocompetent individuals, *T. gondii* was ranked globally as the 4<sup>th</sup> and in Europe as the 2<sup>nd</sup> parasite of significance to public health. The severity of the pathology, which follows from specific interactions of the parasite with immune cells, depends on the parasite's genotype, over 300 of which circulate globally. While many virulence conferring genes have been identified, the virulence phenotype is difficult to predict by genetics alone, thus the focus is on discovering the underlying mechanisms. In this study, the virulence of four distinct lineage III variant genotypes, which constitute 25% of the population structure of *T. gondii* in Serbia, has been determined by cumulative mortality of Swiss Webster mice, while mechanisms were analyzed using VERO cells and through gene expression in the brain and the spleen in early and late infection. Genotypes EQ40 and K1 were found to be of intermediate, while EQ39 (ToxoDB#54) and G13 were of low virulence. Virulence mechanisms included high proliferation rate and lytic capacity, supported by enhanced metabolic activity, evident in sustained higher ENO2 expression. This results in an intense proinflammatory response in early infection, characterized by high levels of expression of IL-12p40 and IFN- $\gamma$  mRNA in the brain and spleen. However, despite distinct characteristics of the immune response to genotypes of different virulence, immunized mice survived RH (ToxoDB#10) challenge, which implies that the quality of the immune response is independent of virulence.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*, parasite, virulence, genotype, immune response, host, mortality inflammation, lineage, population structure

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Molecular biology

**UDC number:**

# Sadržaj

<b>Taksonomija, istorijat i značaj toksoplazmoze</b> .....	<b>1</b>
<b>Biologija parazita <i>Toxoplasma gondii</i></b> .....	<b>4</b>
1. Životni ciklus.....	4
1.1 Životni ciklus tahizoita—litični ciklus .....	4
1.2 Životni ciklus bradizoita .....	7
1.3 Gametogonija.....	9
2. Transmisija .....	10
2.1 Prevencija i kontrola transmisije.....	12
3. Patogeneza i imunski odgovor na infekciju.....	12
4. Populaciona genetika .....	17
4.1 Metode genotipizacije i genotipovi <i>T. gondii</i> .....	18
5. Virulencija .....	19
<b>Naučna osnova disertacije</b> .....	<b>24</b>
<b>Cilj disertacije</b> .....	<b>27</b>
<b>Materijali i metode</b> .....	<b>28</b>
1. Materijali.....	28
1.1 Uzorci tkiva srca divljih kanida .....	28
1.2 Sojevi <i>Toxoplasma gondii</i> .....	28
1.3 Swiss Webster laboratorijski miševi.....	28
1.3.1 Etička odobrenja.....	28
2. Metode .....	29
2.1 Izolacija sojeva <i>T. gondii</i> biološkim ogledom.....	29
2.2 Održavanje i propagacija sojeva <i>T. gondii</i> .....	29
2.2.1 Održavanje i propagacija cistogenih sojeva .....	29
2.2.2 Održavanje i propagacija soja RH .....	29
2.3 Kultura VERO ćelija i propagacija tahizoita <i>in vitro</i> .....	30
2.3.1 Održavanje i propagacija kultura VERO ćelija .....	30
2.3.2 Propagacija tahizoita <i>in vitro</i> u VERO ćelijama.....	30
2.3.3 Zamrzavanje VERO ćelija i tahizoita .....	30
2.4 Konverzija bradizoita u tahizoite .....	30
2.5 Analiza fenotipa tahizoita <i>in vitro</i> .....	31
2.5.1 Kinetika invazije .....	31
2.5.2 Utvrđivanje stope proliferacije.....	31
2.5.3 Analiza egresa .....	31
2.6 Ekstrakcija nukleinskih kiselina.....	32

2.6.1 Priprema suspenzija tkiva.....	32
2.6.2 Ekstrakcija gDNK iz mišije krvi i organa .....	32
2.6.3 Precipitacija i koncentrovanje izolovane gDNK.....	32
2.6.4 Ekstrakcija totalne RNK i gDNK.....	32
2.7 Genotipizacija sojeva <i>T. gondii</i> .....	33
2.7.1 Tabela sekvenca prajmera za genotipizaciju .....	33
2.8 Tipizacija alela gena markera virulencije.....	33
2.8.1 Tabela sekvenci prajmera markera virulencije.....	34
2.9 Detekcija <i>T. gondii</i> gDNK metodom PCR u realnom vremenu.....	34
2.10 Konverzija iRNK u cDNK .....	34
2.11 Kvantifikacija relativne ekspresije gena.....	35
2.8.1 Tabela sekvenci prajmera za analizu ekspresije.....	35
2.12 Test modifikovane aglutinacije (MAT).....	35
2.13 Utvrđivanje kumulativne smrtnosti.....	35
2.14 IGRA .....	36
2.15 Funkcionalna analiza zaštitnog imuniteta .....	36
2.16 Statistika .....	36
<b>Rezultati</b> .....	<b>38</b>
1. Populaciona struktura <i>T. gondii</i> .....	38
2. Biološka karakterizacija varijantnih genotipova loze III.....	40
2.1 Genotipovi izolata i tipizacija markera virulencije.....	40
2.2 Utvrđivanje virulencije in vivo i parametara morbiditeta.....	41
2.2.1 Kaplan-Meier krive preživljavanja .....	42
2.2.2 Kinetika preživljavanja i kumulativna smrtnost.....	43
2.2.3 Analiza parametara morbiditeta.....	44
2.3 Analiza fenotipa virulencije <i>in vitro</i> .....	44
2.3.1 Kinetika invazije.....	45
2.3.2 Proliferacija.....	45
2.3.3 Analiza egresa.....	47
2.4 Analiza ekspresije tahizoitske enolaze .....	48
3. Imunski odgovor domaćina nakon infekcije.....	49
3.1 Analiza imunskog odgovora domaćina u ranoj infekciji.....	49
3.2 Analiza imunskog odgovora u kasnoj infekciji .....	51
4. IGRA test.....	53
5. Preživljavanje i analiza imunskog odgovora domaćina nakon re-infekcije .....	54
<b>Diskusija</b> .....	<b>57</b>
1. Populaciona struktura parazita <i>T. gondii</i> u prelaznim domaćinima .....	57



2. Biološka karakterizacija varijantnih genotipova loze III.....	62
3. Imunski odgovor domaćina nakon infekcije varijantnim genotipovima loze III .....	69
<b>Zaključci.....</b>	<b>76</b>
<b>Literatura.....</b>	<b>78</b>
<b>Prilozi.....</b>	<b>93</b>
1. Spisak skraćenica.....	93
2. Biografija .....	96
3. Izjave .....	97

# Uvod

## Taksonomija, istorijat i značaj toksoplazmoze

*Toxoplasma gondii* je obligatno intracelularna parazitska protozoa iz filuma Apikompleksa, porodice Sarkocistida, koja je uzročnik toksoplazmoze. Genus *Toxoplasma* čini samo jedna vrsta, *gondii*, primećena po prvi put u tkivima gundija 1908. godine u Tunisu (Nicolle i Manceaux, 1908), a iste godine i kod zeca u Brazilu (Splendore, 1908). Iako je ubrzo nakon identifikacije ove vrste u kliničkoj praksi nastala sumnja da je zoonotska, zbog prisustva parazita kod dece rođene sa hidrocefalusom, retinohoroiditisom i encefalitisom, tek 1938. godine je nedvosmisleno potvrđeno da je *T. gondii* uzročnik patologije kod ljudi, kada je konstatovano da su glodari koji su bili inokulisani homogenatima očnog i moždanog tkiva u kojima je primećen ovaj parazit, razvili encefalitis (Weiss i Dubey, 2009; Halonen i Weiss, 2013). Tkiva su uzeta pri autopsiji jednomesečnog novorođenčeta koje je ubrzo nakon rođenja razvilo neurološke simptome (napade), a pregled je pokazao lezije u makulama i u mozgu. Klinički slučajevi toksoplazmoze kod dece i novorođenčadi su pokazali ne samo da je parazit neurotropan, uzrokujući encefalomijelitis ili horioretinitis, pa i fatalan ishod, već su uputili i na kongenitalnu tj. vertikalnu transmisiju infekcije kod čoveka, koja je kasnije utvrđena i kod mnogih drugih životinjskih vrsta (Wolf i Cowen, 1937; Wolf et al., 1940; Paige et al., 1942; Dubey, 2009; Halonen i Weiss, 2013). Ubrzo nakon što su Nicolle i Manceaux primetili tahizoite, brzodeleći životni oblik parazita, kod gundija, Levaditi i sar. su 1928. objavili da *T. gondii* može da egzistira više meseci u obliku ciste u različitim tkivima, što je vremenom potvrđeno od strane nekoliko grupa naučnika i zapravo predstavljalo otkriće drugog životnog oblika, sporodelećih bradizoita (Levaditi et al., 1928; Frenkel i Friedlander, 1951; Frenkel, 1973; Dubey, 2014). Formacija intraćelijskih cista je odlika i drugih protozoa genusa Apikompleksa kao što su *Besnoitia*, *Sarkocystis*, *Globidium*, *Hammondia*, *Cystoisospora*, *Frenkelia*, i *Kariospora* (Mehlhorn, 2016).

Deceniju kasnije, 1939., Albert Sabin je izolovao *T. gondii* iz dvoje dece sa encefalitisom, a jedan od tih sojeva, RH, od tada se propagira *in vivo* u eksperimentalnim životinjama, a nešto kasnije i *in vitro*, u laboratorijama širom sveta (Sabin, 1941). Danas se zna da je ovo arhetip loze I, najvirulentniji do sada izolovan genotip, a njegov značaj je neizmerno porastao 1948. godine kada su Sabin i Feldman napravili prvi serološki test za toksoplazmozu, test neutralizacije poznat kao Sabin-Feldman test (SFT) ili test bojenja, *dye test* (DT), koji je ubrzo zatim postao i zlatni standard, zbog svoje visoke osetljivosti i specifičnosti (Sabin i Feldman, 1948). DT je vremenom izašao iz upotrebe, najvećim delom iz razloga što zahteva korišćenje vijabilnih tahizoita i to visoko virulentnog RH soja. Fulton i Turk su 1959. uveli test direktne aglutinacije, takođe baziran na antigenu pripremljenom od RH soja, ali od tahizoita inaktiviranih formalinom, i pokazali da tahizoiti ne gube svojstvo antigena čak i nakon inaktivacije (Fulton i Turk, 1959). Dobijanje tahizoita u količinama koje su potrebne za dijagnostičke testove je bio problem do 1980. godine kada su Desmonts i Remington predstavili metodu gajenja RH soja u sarkomskim ćelijama kultivisanim u laboratorijskim miševima i sem toga uveli dodatak  $\beta$ -merkaptetanola serumu radi destabilizacije vezivanja antitela IgM klase, čime je dobijen test specifičan za antitela IgG klase koja su prisutna u svim fazama infekcije (Fulton i Turk, 1959; Desmonts i Remington, 1980). Ove inovacije su promovisale široku upotrebu direktne aglutinacije u istraživanjima i dijagnostici *T. gondii* infekcije, a tahizoiti RH soja se još od 1948. pa do danas koriste kao antigen u većini modernih dijagnostičkih testova. Nazive tahizoit i bradizoit je uveo Frenkel 1973. godine, a kasnije je utvrđeno da se oba oblika razmnožavaju aseksualno, dok je specifičan način deobe, koji podrazumeva da se odigrava interno u ćeliji majci, dok se ne stvore dve jedinice koje se zatim razdvajaju, nazvan endodiogenija, primećen samo još kod genusa *Frenkelia* (Goldman et al., 1958; Scholtyseck, 1973; Frenkel, 1973; Halonen i Weiss, 2013).

Iako je vertikalna transmisija, čije je posledica kongenitalna toksoplazmoza, klinički izuzetno značajan oblik bolesti, bila poznata od ranije, tokom pedesetih godina prošlog veka je nastala hipoteza da je glavni način transmisije ingestija parazita, i to iz sirovog ili termički nedovoljno obrađenog mesa. Ova hipoteza je praktično potvrđena 1965. godine na osnovu drastičnog porasta incidence toksoplazmoze u sirotištu u Parizu gde su godinu dana štíćenicima servirani obroci od nedovoljno termički obrađenog mesa (Desmonts i Couvreur, 1974). Ali, u istoj dekadi se rodila sumnja da postoji i treći značajan put transmisije, jer je kod striktnih vegetarijanaca u Indiji utvrđena prevalencija infekcije koja je bila slična kao i kod ne vegetarijanaca, što je bila jasna indikacija da meso nije jedini izvor parazita. Po osnovu bioloških karakteristika otkrivenih do sedamdestih, *T. gondii* je klasifikovana kao kokcidija, kao i većina pripadnika filuma Apikomplexa, a životni ciklus je konačno utvrđen tek nakon što je potvrđeno da su definitivni domaćini parazita samo životinje iz porodice *Felidae* (Dubey i Frenkel, 1970; Frenkel, 1973; Dubey, 2009). Nizom tehnički zahtevnih ispitivanja tkiva i ćelija gastrointestinalnog trakta izolovanog iz mačića domaće mačke nakon eksperimentalnih infekcija sa *T. gondii* je utvrđeno da u enterocitima *Felidae* dolazi do šizogonije pa zatim i do gametogonije (seksualne reprodukcije) i stvaranja zigota, koje oblaže specifična višeslojna ćelijska membrana, te nastanka oocista koje se izbacuju sa fecesom u spoljašnju sredinu u enormnom, višemilionskom, broju (Dubey i Frenkel, 1970; Frenkel, 1973). Nakon sporulacije u spoljašnjoj sredini, procesa koji traje do 7 dana, formira se i treći infektivni životni oblik, sporozoit (Dubey et al., 1998; Halonen i Weiss, 2013, Freppel et al., 2020). Kasnija istraživanja su pokazala da oociste dugo ostaju vijabilne u spoljašnjoj sredini jer ih proteinski sastav i biohemijska svojstva zida čine izuzetno otpornim na širok spektar fizičkih i hemijskih uslova (Freppel et al., 2019). Iako je posumnjano da postoji i treći način transmisije, radi se zapravo takođe o ingestiji ali ovoga puta sporuliranih oocista, koje značajno pospešuju i šire puteve prenosa. Naime, sem u zemljištu, gde mogu direktno da inficiraju životinje koje pasu i ptice koje se hrane sa zemlje, vijabilne oociste mogu da se nađu i u vodi, kao posledica spiranja kontaminiranog zemljišta, i to uglavnom ne pri dnu, već blizu površine (Shapiro et al., 2019). Ukoliko se kontaminirana voda iz površinskih izvora koristi za irigaciju, oociste dospevaju u lanac ishrane kroz povrće i voće, ali kada je ustanovljeno da su oociste u izvoru pijaće vode izazvale jednu od najznačajnijih hidričnih epidemija u SAD, potvrđeno je ne samo da oociste poseduju ogroman kapacitet za širenje parazita, već je prepoznat i epidemijski način izbijanja toksoplazmoze (Benenson et al., 1982; Bowie et al., 1997).

Toksoplazmoza se tokom osamdesetih godina za vreme HIV pandemije, istakla kao oportunistička infekcija, koja se najčešće manifestuje kao encefalitis sa mogućim fatalnim ishodom (Luft i Remington, 1992). Stanje imunosupresije dovodi do reaktivacije latentne infekcije, što se kod HIV pacijenata dešava nakon što broj CD4<sup>+</sup> limfocita u perifernoj krvi padne ispod 200 po  $\mu$ l (Luft i Remington 1992, Đurković-Đaković, 1998). Sem toga, primećeno je da za vreme *T. gondii* infekcije kod imunokompetentnih ljudi dolazi do ekspanzije CD8<sup>+</sup> populacije (Luft et al., 1984). Ova saznanja su ukazala na ključni značaj T-limfocita u kontekstu imunske zaštite domaćina, ali i proširila rizične grupe za reaktivaciju infekcije na sve osobe kod kojih su geneza ili održavanje T-limfocita defektni, kompromitovani ili suprimirani iz različitih razloga. Od mnogo ranije je bilo poznato da je kod imunokompetentnih osoba infekcija najčešće asimptomatska, a tek u 10% do 20% slučajeva se može razviti bolest koja se uglavnom manifestuje kao limfadenopatija praćena opštim infektivnim sindromom (Remington, 1974, Weiss i Dubey, 2009). Kliničko iskustvo u kombinaciji sa saznanjima iz eksperimentalnih infekcija prevashodno u mišjim modelima, postepeno je dovelo do identifikacije ključnih koraka u patogenezi kao i inicijaciji i održavanju imunskog odgovora domaćina na infekciju. Naime, parazit vrlo brzo nakon ingestije tkivne ciste ili oociste dolazi u kontakt sa ćelijama intestinalnog epitela ali i urođenog imunskog sistema i izaziva transkripciju i sekreciju raznih citokina i hemokina, među kojima se ističu IL-12 (interleukin 12), TNF (engl. *tumor necrosis factor*), IFN- $\gamma$  (engl. *interferon*  $\gamma$ ) i MCP-1 (engl. *monocyte chemotactic protein 1*). IL-12 i IFN- $\gamma$  su osnova za diferencijaciju CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocita u Th-1 tip, što podrazumeva sekreciju velikih količina proinflamatornih citokina, a prevashodno omogućava kontinuitet sekrecije IFN- $\gamma$ , koji ima

mnoštvo raznih funkcija ne samo u sklopu odbrane domaćina od infekcije, već i u uslovljavanju incistacije parazita. Parazit selektivno aktivira mehanizme odbrane domaćina tako da imunski odgovor domaćina omogućava preživljavanje u ranoj fazi infekcije, kada parazit brzo prolifериše i diseminuje se po organizmu, a zatim pospešuje incistaciju i održava parazita u incistiranoj formi kao vid stabilne koegzistencije koja može da traje i do kraja životnog veka domaćina. Inflamacija koja je delimično izazivana aktivnostima parazita i burnim imunskim odgovorom domaćina u ranoj fazi infekcije se vremenom smiruje sekrecijom anti inflamatornih citokina kao što su IL-10 i TGF- $\beta$  (engl. *transforming growth factor  $\beta$* ).

Već sedamdesetih godina prošlog veka je primećeno da u izuzetno retkim slučajevima imunokompetentne osobe sa simptomatskom infekcijom mogu da razviju i komplikacije kao što su miokarditis, pneumonitis, hepatitis i encefalitis, pa čak i diseminovanu toksoplazmozu (Remington, 1974; Greenlee et al., 1975; Cunningham, 1982; Montoya et al., 1997). Nedavno je nedvosmisleno dokazano da je ovaj teški oblik bolesti posledica infekcije virulentnim genotipovima, jer je pokazano da su genotipovi koji su izazvali klinički najteži oblik bolesti kod imunokompetentnih ljudi, koji se opisuje kao novi klinički entitet, Amazonska toksoplazmoza, prouzrokovali smrt mnogih laboratorijskih miševa (Simon et al., 2019). Demonstracija virulencije određenih genotipova kroz smrtnost laboratorijskih miševa, kao i indicija za gensku komponentu virulencije, datiraju još iz 90ih godina prošlog veka, ali je tek sa razvojem adekvatnih metodologija i sve boljih tehnika za izolaciju, kultivaciju i genotipizaciju parazita otkriven potencijalni spektar virulencije (Sibley i Boothroyd, 1992; Howe i Sibley, 1995; Darde, 2008; Ajzenberg et al., 2010; Su et al., 2010). Naime, utvrđeno je da vrstu *T. gondii* predstavlja populacija od 231 genotipova koji su pohranjeni u bioinformatičkoj bazi podataka ToxoDB ([www.toxodb.org](http://www.toxodb.org)) i da je na južnoj hemisferi prisutan visok diverzitet, posebno u južnoj Americi, dok je na severnoj hemisferi nizak (Su et al., 2012; Shwab et al., 2014). Sem ovoga, filogenetskim analizama je utvrđeno da je većina genotipova na severnoj hemisferi u bližem srodstvu i potiče iz samo tri loze (označene kao tipovi I, II i III), dok na južnoj hemisferi kruže genotipovi koji potiču iz loza koje su evolutivno udaljene od onih na severnoj (Su et al., 2012). Posebno je relevantno da su svi genotipovi koji izazivaju Amazonsku toksoplazmozu čak evolutivno udaljeni i od onih koji su učestali u južnoj Americi (Carme et al., 2009; Shwab et al., 2014; Pena et al., 2008). Sem geografske raznolikosti diverziteta, što se tiče prelaznih domaćina, u koje se ubrajaju sve toplokrvne vrste, najmanji diverzitet je prisutan kod ljudi, nešto veći kod domaćih životinja, a najveći kod divljih životinja (Dubey et al., 2014; Jiang et al., 2018). Za sada je virulencija malog broja genotipova laboratorijski ispitana, ali je značajan podatak da genotip koji sa najvećom učestalošću kruži u Evropi kod ljudi i domaćih životinja, zapravo nisko virulentan. Ipak, pojava Amazonske toksoplazmoze je upozorenje koje ne treba ignorisati, jer je ona posledica infekcije čoveka genotipovima *T. gondii* koji kruže u silvatičnoj sredini. Iako je preostao mali broj divljina poput Amazonije na planeti, prisustvo virulentnih genotipova u silvatičnim sredinama na svakom kontinentu nije isključeno, jer je populaciona struktura *T. gondii* u tim sredinama još uvek nedovoljno istražena. Činjenicu da toksoplazmoza dobija iznova na značaju u eri eksplozije stanovništva i nemilosrdnog širenja antropogene teritorije, globalizacije hrane i turizma, popularnosti mesa životinja iz slobodnog uzgoja, kao i eksploatacije svih dostupnih izvora vode za irigaciju, potvrđuje plasman na 4. mesto od 24 globalno najznačajnijih parazitskih bolesti prenošenih hranom i vodom (FAO/WHO, 2014), i na čak 2. mesto u Evropi (Bouwknegt et al., 2018; Van der Giessen et al., 2021).

# Biologija parazita *Toxoplasma gondii*

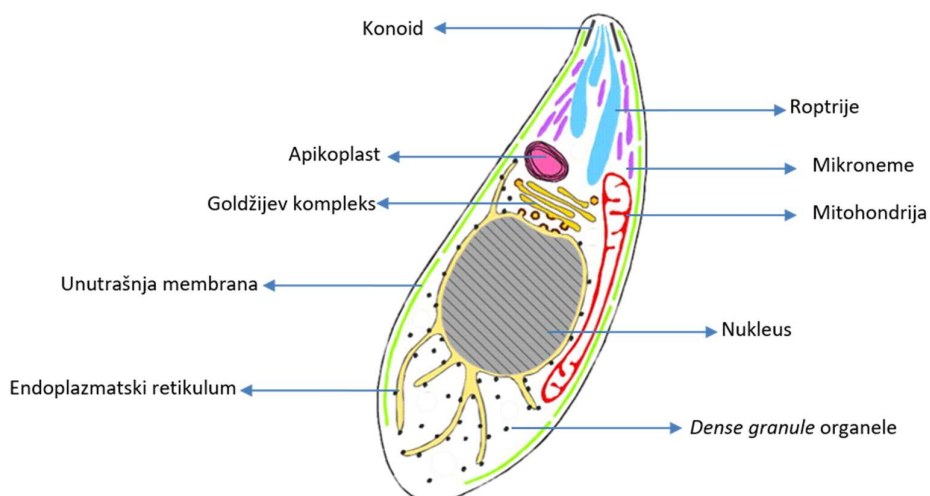
## 1. Životni ciklus

*T. gondii* ima dva različita životna ciklusa—aseksualno razmnožavanje koje podrazumeva litični ciklus, koji se odigrava kod svih domaćina, ali uključuje i šizogoniju, koja je moguća isključivo kod definitivnih domaćina; i seksualno razmnožavanje koje podrazumeva gametogoniju i rezultira u formiranju oocista, a odigrava se samo kod definitivnih domaćina. Samo su *Felidae* definitivni domaćini dok su sve ostale vrste prelazni domaćini. Ovaj parazit je neobičan jer prolaz kroz definitivnog domaćina nije neophodan za dugoročno održavanje potpuno intaktnih infektivnih životnih oblika, već izuzetno širok spektar prelaznih domaćina omogućava gotovo beskonačnu aseksualnu ili klonalnu propagaciju (Dubey, 1995). *T. gondii* se pojavljuje u tri infektivna životna oblika: tahizoit, bradizoit i sporozoit, i u nekoliko prelaznih oblika kao što su šizont tipa A do E, merozoit, mikro i makrogamont, koji predstavljaju razvojne faze (Dubey et al., 1998). Litični ciklus i šizogonija su naučno ispitani i definisani kod oblika tahizoit, u koji se i bradizoit i sporozoit spontano konvertuju *in vivo*, dok ciklus gametogonije zahteva prelaz kroz prelazne životne oblike od kojih se konačno stvaraju mikro- i makro-gamonti čijem spajanjem (fertilizacija) se dobija zigot (Dubey et al., 1998; Attias et al., 2020). Sporozoiti se formiraju tek nakon sporulacije oociste koja sadrži zigot u spoljašnjoj sredini. Sva tri infektivna životna oblika imaju sposobnost da invadiraju sve nukleisane ćelije kao i sposobnosti interkonverzije, i to iz sporozoita i bradizoita u tahizoite, kao i iz tahizoita u bradizoite kod svih domaćina, a iz bradizoita u gamonte isključivo kod definitivnih domaćina. Dok tahizoite karakterišu brz metabolizam i brza deoba u parazitofornim vakuolama, bradizoiti imaju atenuiran metabolizam, ali se takođe dele endodiogenijom unutar tkivnih cista, mada sporo. Merozoiti su produkt gametogonije i ne prolaze deobu, već diferencijaciju u primarni sporoblast, koji prolazi kroz mejozu a zatim i mitozu da bi se formirali haploidni konačni životni oblici, sporozoiti (Freppel et al. 2019).

### 1.1 Životni ciklus tahizoita: litični ciklus

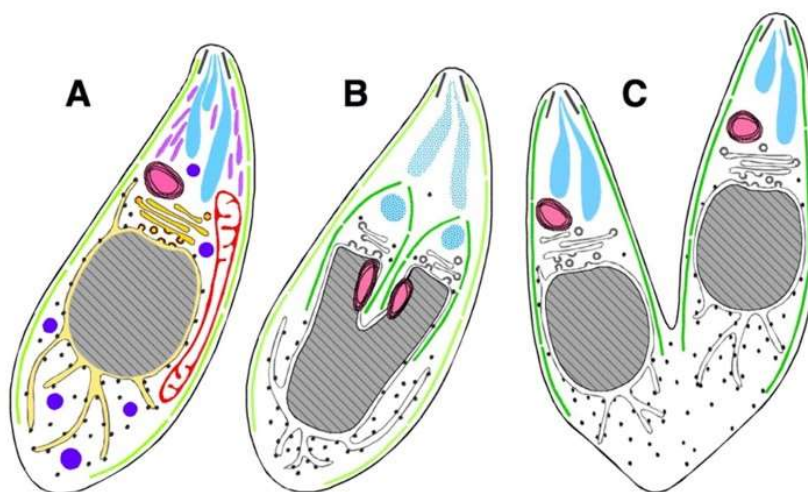
Litični ciklus, koji je integralni deo patogeneze kod svih domaćina, odigrava se unutar ćelija domaćina, u posebnoj parazitofornoj vakuoli. Način infekcije ćelija koje nemaju sposobnost fagocitoze je aktivna invazija, koja zahteva kliznu motilnost tahizoita, jedinstvenu sposobnost organizama iz genusa Apikompleksa, i sledi nakon serije reverzibilnih kontakata, a zatim čvrstog vezivanja tahizoita za ćelijsku membranu i formaciju suženog prstena adhezije, takozvanog pokretnog spoja (engl. *moving junction*) (Besteiro et al., 2009; Sibley, 2010; Besteiro et al., 2011). Sva tri životna oblika *T. gondii* imaju vrlo specifičnu raspodelu organela, naime većina se nalazi u konoidnom delu, koji učestvuje u kontaktu sa ćelijom domaćina, i čini apikalni kompleks (Slika 1).

U apikalnom kompleksu su lokalizovane sekretorne organele roptrije, mikroneme i guste granule (*dense granule*). Ove organele luče raznovrsne proteine kao što su oni iz porodica ROP (kinaze i pseudokinaze) i GRA, od kojih većina učestvuje u formiranju pokretnog spoja, biogenezi i stabilizaciji parazitoforne vakuole, dok proteini iz porodica MIC (adhezini, šaperoni) i SAG (engl. *surface antigen*), kao i laminini u ćelijskoj membrani tahizoita, koji uz nespecifične elektrostatične interakcije omogućavaju inicijalno ostvarivanje kontakta sa ćelijom domaćina (Smith, 1995; Black i Boothroyd, 2000; Besteiro et al., 2009; Tonkin i Boulanger 2015). Ključni proteini za ostvarivanje kontakta su prema nekim saznanjima MIC1 i RON4 (engl. *roptry neck protein 4*), dok AMA1 (engl. *apical membrane antigen 1*), esencijalni adhezin koji promovise stabilan kontakt sa ćelijom domaćina i služi za korektnu orijentaciju tahizoita, olakšava pristup pokretnom spoju (Alexander et al., 2005; Bargieri et al., 2013, Kato, 2018).

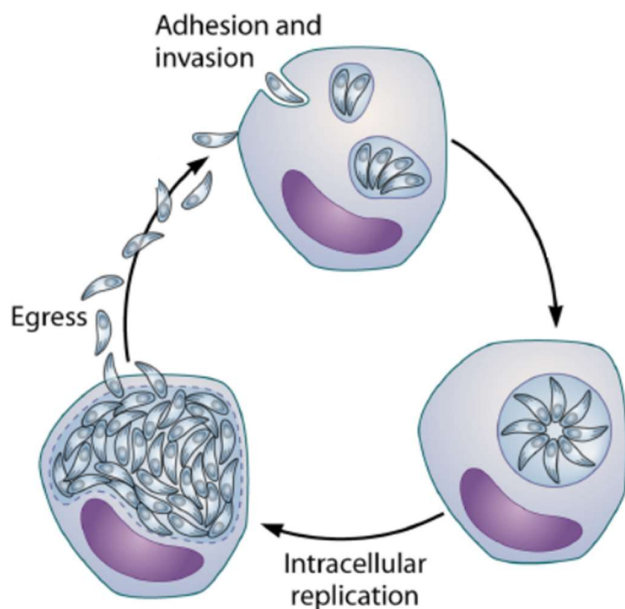


**Slika 1.** Šematski prikaz tahizoita. Konoid, u apikalnom delu jedinke, mesto je formiranja pokretnog spoja, dok su organele koje čine apikalni kompleks, roptrije, mikroneme i guste granule, izvor proteina neophodnih za invaziju ćelije domaćina. Apikoplast je organela slična plastidu, specifična za genus Apikompleksa, koja je otkrivena 70ih godina prošlog veka. Apikoplast *T. gondii* poseduje sopstvenu DNK u kojoj se nalaze sekvence ribozomalne i transfer RNK, što implicira mogućnost translacije endogenih proteina.

Klizna motilnost koja se zasniva na internom aktin-miozinskom motornom kompleksu parazita omogućava invaziju, dok interakcija između parazitskog receptora, RON2 (*rhoptry neck protein 2*), koji se luči u ćeliju domaćina, i AMA1, promovišu prolaz kroz pokretni spoj (Alexander et al., 2005; Takemae et al., 2013; Kato, 2018). Imajući u vidu da tahizoit za ulaz u ćeliju upotrebljava mehaničku silu koju stvara klizna motilnost, neophodno je čvrsto vezivanje za ćelijsku membranu, u vidu proteinskog „sidra“ koje formira kompleks RON proteina, a „sidro“ se vezuje za aktinski skelet ćelije domaćina, u koju tahizoiti za vreme kontakta i invazije luče aktinski depolimerizator, toksofilin (Delorme-Walker et al., 2012; Bichet et al., 2014; Krishnamurthy et al., 2016). Dok se probija kroz aktinski skelet i ulazi u citosol, tahizoit za sobom povlači i ćelijsku membranu, koja se selektivno modifikuje integrisanjem parazitskih proteina i ekscizijom domaćinskih proteina da bi se postepeno formirala membrana parazitoforme vakuole. Ova vakuola ima selektivnu permeabilnost i sprečava acidifikaciju lizozoma, što štiti tahizoite i omogućava proliferativni ciklus u ćeliji (Morisaki et al., 1995; Charron i Sibley, 2004; Besteiro et al., 2011). Oko parazitoforme vakuole se lokalizuju mitohondrije i endoplazmatski retikulum ćelije domaćina, dok se sama vakuola pozicionira u blizini jedra (Sinai et al., 1997; Attias et al., 2020). Invazija tahizoita i održavanje parazitoforme vakuole između ostalog zahteva kontrolu odbrambenih mehanizama ćelije kao što je apoptoza, koja se sprečava inhibicijom kaspaza (Denkers, 2003). Tahizoiti kultivisani *in vitro* se dele sinhronizovano, endodiogenijom (Slika 2, A-C), koja zahteva između 6 h i 8 h u proseku za tahizoite arhetipa I, genotip koji ima najvišu stopu proliferacije, dok je *in vivo* moguća asinhrona deoba (Smith, 1995; Dubey, 1998; Black i Boothroyd, 2000). Zapremina parazitoforme vakuole raste sa svakim ciklusom deobe i zauzima sve više prostora u ćeliji domaćina, da bi nakon postizanja kritične zapremine, posle 6-7 deoba, došlo do izlaska tahizoita (engl. *egress*) iz vakuole i citolize koja uzrokuje smrt ćelije domaćina (Slika 3) (Black i Boothroyd, 2000; Schultz i Carruthers, 2018).



**Slika 2.** Deoba tahizoita endodiogenijom: A) početak deobe, B) deoba jezdra i postepeno stvaranje novih organela, C) kraj deobe, formiranje dve jedinice i razdvajanje. Interesantno je da se tokom celog procesa ne menja organizacija organela, već se postepeno sintetišu pre razdvajanja jedinici, što omogućava novoformiranoj jedinici da odmah nakon razdvajanja bude sposobna da inficira ćeliju domaćina.

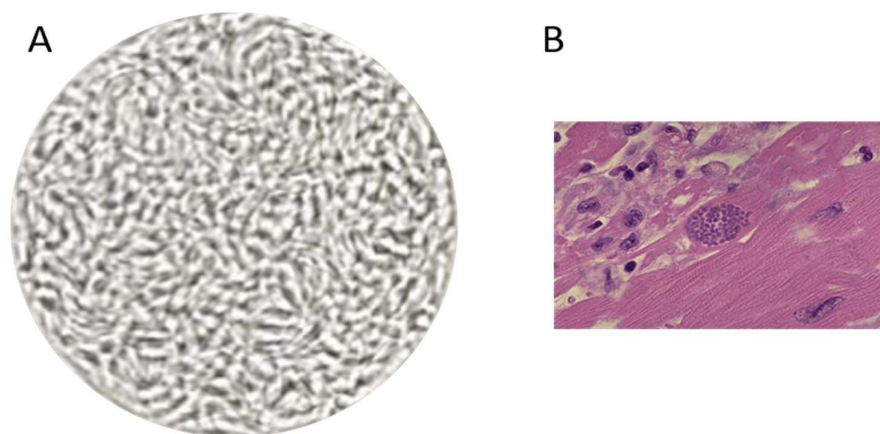


**Slika 3.** Litični ciklus. Litični ciklus započinje invazijom ćelije domaćina i simultanim formiranjem parazitoforme vakuole, čiju membranu čini preuzeta membrana ćelije domaćina u koju se integrišu parazitski proteini. U parazitoformnoj vakuoli se odigrava deoba tahizoita, a novoformirane jedinice se vrlo često prostorno organizuju u geometrijsku formaciju rozete. Proliferacija tahizoita uslovljava rast parazitoforme vakuole koja nakon određenog broja deoba gubi integritet, puca zajedno sa membranom ćelije domaćina i oslobađa tahizoite u međucelijski prostor. Preuzeto iz: Zhang M, Joyce BR, Sullivan WJ Jr., Nussenzweig V. Translational Control in Plasmodium and Toxoplasma Parasites. *Eukaryotic Cell*. 2013, 12(2):161

Imajući u vidu da su tahizoiti dužine 4-8  $\mu\text{m}$  i širine 2-6  $\mu\text{m}$ , pakovanje 64-128 jedinki u vakuolu zahteva efikasno iskorištavanje prostora, što se postiže specifičnim strukturama (Smith, 1995; Halonen i Weiss, 2013). Konformacija koja je prirodna posledica sinhrona endodiogenije i često karakteriše virulentne genotipove ili sojeve parazita koji su adaptirani na *in vitro* proliferaciju je rozeta, za koju se smatra i da pospešuje egres (Slika 3). S druge strane, asinhronu proliferaciju karakterišu raznolike konformacije (Dubey et al., 1998; Attias et al., 2020). Egres tahizoita indukuju razni stimulusi, uključujući i influks jona kalcijuma u vakuolu, a protein koji je ključan za perforaciju membrane parazitoforme vakuole je mikronemski protein PLP1 (engl. *perforin-like protein 1*), dok je za rupturu ćelijske membrane neophodna katalitički aktivna LCAT (lecitin-holesterol acetiltransferaza) (Schultz i Carruthers, 2018; Attias et al., 2020). Činjenica da tahizoiti ali i bradizoiti tokom gotovo celog procesa endodiogenije zadržavaju citoskeletnu strukturu kao i specifičnu organizaciju organela ih osposobljava da odmah nakon egresa iz parazitoforme vakuole ili tkivne ciste invadiraju obližnje ćelije, čime se i objašnjava infektivnost ovih životnih oblika (Black i Boothroyd, 2000).

### 1.2 Životni ciklus bradizoita

Diferencijacija i konačna konverzija tahizoita u bradizoite je reakcija na određene kombinacije internih i eksternih signala izazvanih uslovima stresa, koji može biti posredovan nedostatkom nutrijenata, posebno aminokiselina, ili faktorima imunskog odgovora domaćina, koji indukuju promene na ekspresionom i transkripcionom nivou (Dubey et al., 1998; Dzierzinski et al., 2011; Sullivan i Jeffers, 2012; Jeffers et al., 2018; Augusto et al., 2019; Christiansen et al., 2021). Morfološke razlike između tahizoita i ekscistiranih bradizoita su suptilne, ali postoje razlike u površinskim antigenima integrisanim u ćelijsku membranu, kao što je BAG1 (engl. *bradyzoite antigen 1*) umesto tahizoitskog SAG1 (engl. *surface antigen 1*), i metaboličkim enzimima kao što su enolaze—ENO1 kod bradizoita, a procesivniji enzim, ENO2, kod tahizoita (Lunde i Jacobs, 1983; Dzierzinski et al., 2011; Sullivan i Jeffers, 2012). Bradizoiti se sporo i asinhrono dele u parazitoformnoj vakuoli, takođe endodiogenijom, i ujedno modifikuju membranu parazitoforme vakuole, tako što u nju integrišu glikoproteine kao što je CST1 (engl. *cyst wall protein 1*), čime se postepeno formira robustni zid ciste, a i stvaraju zrnastu matricu od granula amilopektina, koja ispunjava njenu unutrašnjost (Slika 4 A, B) (Smith, 1995; Weiss i Kim, 2008; Weiss i Dubey, 2009; Halonen i Weiss, 2013; Christiansen et al., 2021).



**Slika 4.** Tkivne ciste, *ex vivo* i *in situ*. A) Tkivna cista izolovana iz mozga sa bradizoitima; B) Tkivna cista *in situ* u miocitima

Tkivne ciste se u proseku kod većine genotipova *T. gondii* počinju da formiraju 7 do 10 dana nakon infekcije domaćina najčešće u lokalitetima u centralnom nervnom sistemu, kao što su



mozak i oči, i u mišićima, skeletnim i srčanom, ali je pokazano da mogu da se nađu i u drugim organima (Dubey et al., 1998; Black i Boothroyd, 2000; Mendez i Koshy, 2017). Eksperimentalno je pokazano da promene optimalnih uslova za proliferaciju *in vitro* usled varijacije temperature i pH, ograničenja esencijalnih aminokiselina, kao i hemijske inhibicije funkcije mitohondrija, mogu da indukuju diferencijaciju i konverziju tahizoita u bradizoite (Lindsay et al., 1991; Denton et al., 1996; Dubey et al., 1998; Sullivan i Jeffers, 2012; Christiansen et al., 2021). Terminalno diferencirani tipovi ćelija kao što su neuroni i miociti, u kojima se konverzija tahizoita u bradizoite odigrava spontano, posebno su podobni za održavanje tkivnih cista, koje su u zavisnosti od tipa ćelije sferičnog (Slika 4 A) ili ovalnog oblika (Slika 4 B) (Dubey et al., 1998; Lüder i Rahman, 2017). Zapremina tkivnih cista se vremenom dramatično uvećava kao posledica deobe bradizoita, kao što pokazuju merenja promera cista u odnosu na vreme posle infekcije, koji može da varira od 5  $\mu\text{m}$ , kod mladih cista sa samo dva bradizoita, do 70  $\mu\text{m}$  u neuronima ili čak 100  $\mu\text{m}$  u miocitima kod starijih cista (Dubey et al., 1998). Tokom dugogodišnjeg iskustva izolacije sojeva i njihovog održavanja *in vivo* u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za toksoplazmozu, raspon promera tkivnih cista sojeva različitih genotipova izolovanih iz mozga Swiss Webster miševa u hroničnoj infekciji od najmanje 3 meseca je iznosio od 13,21  $\mu\text{m}$  (soj EQ40) do 120  $\mu\text{m}$  (soj BGD1).

Opservacija da nisko virulentni genotipovi *in vivo* stvaraju tkivne ciste sa prosečno većim brojem bradizoita nego visoko virulentni, implicira određenu naklonost ka incistiranju, što je i indicija da postoji i genska komponenta koja reguliše diferencijaciju i konverziju (Smith, 1995; Dubey et al., 1998). Energetski metabolizam i njegova homeostatička regulacija, koji se intenzivno istražuju u cilju pronalaza mesta intervencije za eliminaciju tkivnih cista i izlečenje latentne infekcije, fundamentalno se razlikuju između bradizoita i tahizoita (Denton et al., 1996; Christiansen et al., 2021). Metabolizam bradizoita se zasniva na katabolizmu amilopektina u laktat i fermentaciju laktata, dok su doprinosi Krebsovog ciklusa i mitohondrijskog respiratornog lanaca niži u odnosu na tahizoite, koji se oslanjaju na katabolizam glukoze ali stvaraju i značajne količine laktata čak i u aerobnim uslovima (Denton et al., 1996). Specifičnosti metabolizma donekle objašnjavaju načine za eksperimentalnu indukciju konverzije u *in vitro* uslovima, pa čak možda i predilekciju tahizoita za neurone i miocite *in vivo*.

Za razliku od egresa tahizoita, koji je integralni deo litičnog ciklusa što podrazumeva da do egresa mora doći, uslovi i signali koji izazivaju egres bradizoita su manje poznati. Jasno je da mora postojati striktna regulacija sa visokim stepenom kontrole, jer je potvrđeno da tkivne ciste opstaju mesecima pa i godinama u eksperimentalno inficiranim životinjama, verovatno i doživotno kod mnogih domaćina (Dubey et al., 1998). Nedavno je doživotna perzistencija pojedinačnih tkivnih cista dovedena u pitanje jer je pokazano da specifične populacije CD8<sup>+</sup> limfocita kod miša i čoveka imaju sposobnost da eliminišu tkivne ciste citotoksičnim dejstvom, te je vrlo moguće da je neka vrsta lokalizovane reaktivacije, ekscistacije bradizoita i konverzije u tahizoite, zatim nekoliko ciklusa proliferacije i re-incistacije zapravo način za dugoročno održavanje tkivnih cista (Tiwari et al., 2019; Suzuki, 2021). Nasuprot lokalizovanoj reaktivaciji, eksperimentalno je pokazana motilnost bradizoita pa i sposobnost spontanog egresa ponekih jedinki iz tkivne ciste, čak i iz inficirane ćelije domaćina i stvaranje novih „mladih“ cista u istoj ili obližnjim ćelijama (Dzierzinska et al. 2004). Ovaj fenomen je zabeležen isključivo kod bradizoita indukovanih *in vitro*, te se postavlja pitanje da li su ovi životni oblici, uprkos ekspresiji bradizoitskih proteina, zaista „zreli“ bradizoiti ili neka vrsta prelaznog oblika, što bi moglo da objasni motilnost i kapacitet prodora kroz ćelijske membrane.

Zbog prisustva laktata unutar tkivne ciste sumnja se da je pH vrednost daleko niža u odnosu na pH citosola ćelije domaćina, što može biti povoljno za održavanje cista (Denton et al., 1996). Moguće je da je zapravo razlika u pH vrednostima između citosola ćelije domaćina i tahizoita ključna za inicijaciju konverzije u bradizoit, jer se incistiranje *in vitro* rutinski postiže kultivisanjem ćelija u alkalnim uslovima (pH 8,0) pre ili nakon infekcije, ali i pretretmanom ili inkubacijom samih tahizoita u alkalnom rastvoru (Skariah et al., 2010). Ovo takođe implicira da

promena razlike u pH vrednostima usled metaboličke aktivnosti ili razmene jona sa ćelijom domaćina može da stvori i uslove pogodne za ekscistaciju (Denton et al., 1996). U *in vivo* uslovima su pak komponente imunskog sistema važan deo regulatornog mehanizma za održavanje tkivnih cista, jer je primećeno da do reaktivacije toksoplazmoze kod HIV+ pacijenata dolazi usled niskog broja CD4<sup>+</sup> limfocita, a kasnije je i eksperimentalno pokazano da imunosupresija, kao i neutralizacija citokina IFN- $\gamma$  i TNF, kod miševa deluju kao pozitivni signali za ekscistaciju i egres bradizoita (Gazinelli et al., 1993). Nasuprot tome, kod mnogih imunokompetentnih vrsta domaćina je utvrđena i spontana reaktivacija infekcije, što jeste indicija da parazit kontroliše regulatorni mehanizam za incistaciju, dok domaćin značajno učestvuje u održavanju uslova koji pogoduju incistiranom obliku parazita, ali i da je broj tkivnih cista sinergistički regulisan od strane parazita i domaćina (Dubey et al., 1998; Black i Boothroyd, 2000; Suzuki et al., 2021).

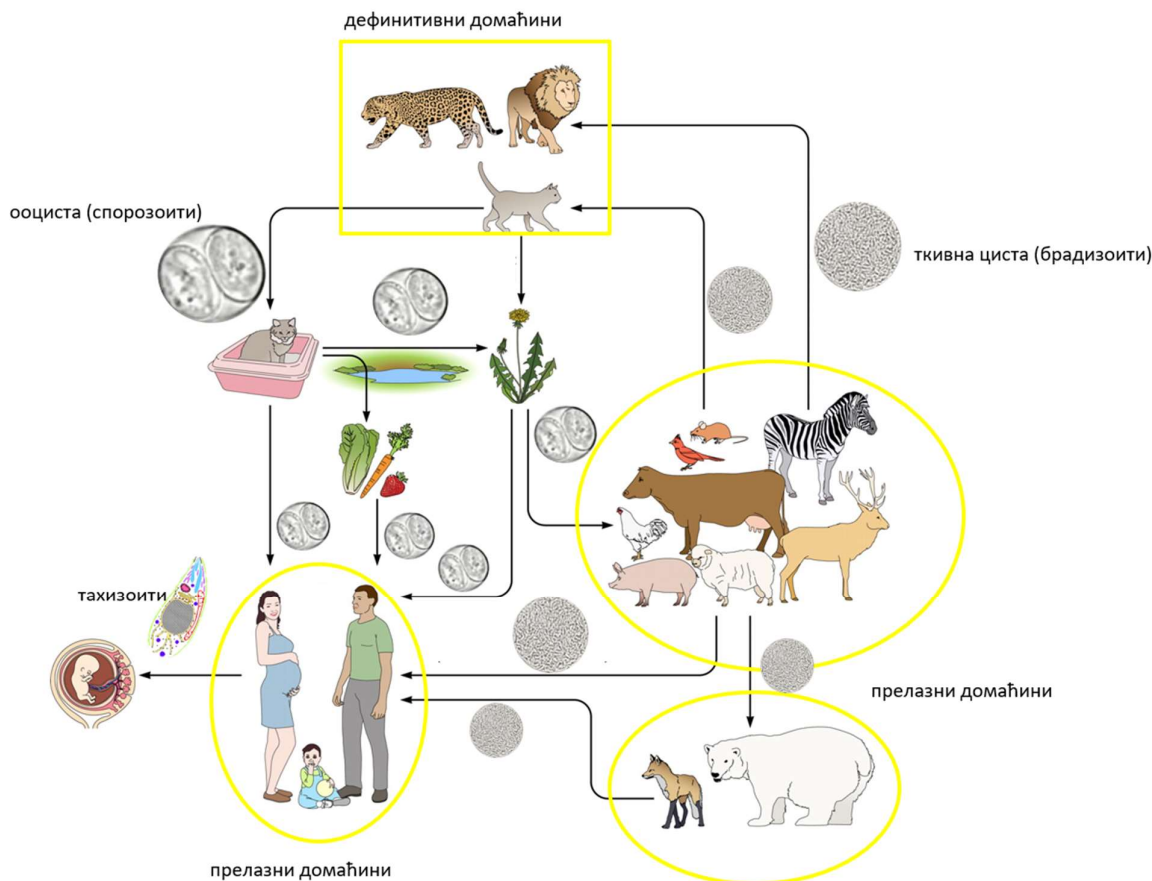
### 1.3 Gametogonija

Iako postoje kulture primarnih maćijih enterocita, ćelija u kojima se kod prirodno inficiranih definitivnih domaćina odigrava gametogonija, seksualno razmnožavanje *T. gondii* za sada i dalje nije moguće u celosti uspešno replicirati *in vitro*, mada jeste nedavno uspešno replicirano *in vivo* u laboratorijskim miševima koji nisu prirodni definitivni domaćini nakon inhibicije delta-6-desaturaze i dodatka linoleične kiseline u ishranu (Martorelli di Genova et al., 2019). Ovo implicira da je ćelijski metabolizam enterocita značajan za postizanje seksualnog razmnožavanja parazita, ali su i dalje nedovoljno poznati dodatni uslovi koji podstiču mejozu. Većina saznanja o odvijanju gametogonije potiče iz rezultata morfoloških i molekularnih ispitivanja različitih oblika parazita iz gastrointestinalnog trakta domaćih maćića nakon eksperimentalnih infekcija *in vivo* tkivnim cistama koje su rađene pre mnogo godina (Dubey et al., 1970; Dubey i Frenkel, 1970; Frenkel, 1973; Dubey et al., 1998; de Assis Moura et al., 2009). Kod *Felidae*, gametogonija počinje nakon invazije bradizoita, koji se oslobađaju iz tkivnih cista kao posledica proteolize u želucu i crevima domaćina, u enterocite, gde umesto konverzije u tahizoite, dolazi do diferencijacije u različite tipove (A-E) šizonta koji prolaze kroz nekoliko ciklusa razmnožavanja pre formiranja merozoita (Dubey i Frenkel, 1970; de Assis Moura et al., 2009). Utvrđeno je da je sistemsko prisustvo visoke koncentracije linoleične kiseline, koje je posledica između ostalog i nedostatka funkcionalne delta-6-desaturaze u crevima, što je jedinstveno za *Felidae*, vrlo verovatno ključan signal za inicijaciju diferencijacije tahizoita u šizonte (Martorelli di Genova et al., 2019). Šizogonija kod tipa D, za koji se smatra da je zajedno sa tipom E izvor merozoita koji formiraju mikro- i makro-gamonte, dosta se razlikuje u odnosu na šizogoniju kod drugih kokcidija i nije dovoljno detaljno istražena, a sem toga, ultrastrukture tipova šizonta A, B i C, do sada nisu analizirane (Dubey et al., 1998; de Assis Moura et al., 2009; Attias et al., 2020). Utvrđeno je da se mnoštvo (10-21) motilnih izduženih mikrogamonta, koji uglavnom sadrže samo jedra, formira od jednog elipsastog mikrogamonta, dok se jedan merozoit diferencira u samo jedan, nemotilan subsferičan makrogamont (Dubey et al., 1998; Attias et al., 2020). Zigot nastaje nakon fertilizacije makrogamont od strane mikrogamonta, a zatim se oko zigota stvara prvo membrana nalik velu, a onda postepeno i robustni zid oociste koji će konačno činiti dva sloja i omogućiti budućim sporozoitima visok stepen mehaničke i hemijske zaštite u spoljašnjoj sredini (Dubey et al., 1998; Freppel et al., 2019). Nejasno je pak da li do fertilizacije dolazi u istoj ćeliji ili se mikrogamonti oslobađaju iz inficiranih ćelija pa prateći određene signale odlaze do ćelija koje sadrže makrogamonte i zatim ih invadiraju (Attias et al., 2020). Imajući u vidu da je primećeno da većina enterocita sadrži više parazitofornih vakuola, daleko je veća verovatnoća da ista ćelija sadrži i mikro i makrogamonte, što gotovo garantuje fertilizaciju (Attias et al., 2020). Nezrele oociste, čiji promer je između 10 i 12  $\mu$ m, nakon ruptуре ćelije u kojoj se nalaze dospevaju u intestinalni lumen, a zatim zajedno sa fecesom u spoljašnju sredinu (Dubey et al., 1970; Dubey et al., 1998; Freppel et al., 2019). Uslovi koji dovode do ruptуре ćelije i način oslobađanja nezrelih oocista nisu razjašnjeni, ali se smatra da uobičajeni proces obnavljanja intestinalnog epitela, što podrazumeva apoptozu mnogih enterocita, može biti jedan od

mehanizama, jer potencijalno nudi objašnjenje za ogroman broj, više od  $10^7$ , oocista koje jedna inficirana mačka može da izbaci u toku 7 do 15 dana koliko obično traje ovaj proces (Freppel et al., 2019; Attias et al., 2020). U spoljašnjoj sredini se tokom 7 dana na temperaturi od 20°C do 25°C odigrava sporulacija, koja podrazumeva formiranje četiri haploidna sporozoita unutar oocista, nakon kojeg ove sporulisane oociste postaju visoko infektivne za sve domaćine (Hutchinson, 1965; Frenkel et al., 1970; Dubey et al., 1970). Smatra se da je neophodno da primarni sporoblast u oocisti prođe kroz mejozu pa zatim i mitozu da bi se formirali sporozoiti, koji su morfološki slični bradizoitima i tahizoitima, što možda nudi objašnjenje za njihovu infektivnost. Zid oociste je struktura koja sporozoitima omogućava dugoročnu, višemesečnu ili čak višegodišnju, vijabilnost na temperaturama od -20°C do 37°C, u vodi ili zemljištu visokog saliniteta, kao i otpornost na tretman jakim kiselinama, deterdžentima, rastvorima hipohlorita i hlora, ozonom pa i UV zracima (Jones i Dubey, 2010; Freppel et al., 2019). Ekscistacija sporozoita je proces koji je izuzetno teško replicirati *in vitro* za razliku od egresa tahizoita iz parazitoforne vakuole ili ekscistacije bradizoita iz tkivnih cista, te je nedovoljno dobro definisan, izuzev što je poznato da su neophodni hemijski i fizički uslovi prisutni u želucu i digestivnom traktu inficiranog domaćina (Freppel et al., 2019).

## 2. Transmisija

Transmisija *T. gondii* se odvija između prelaznih domaćina, svih homeotermnih vrsta, i definitivnih domaćina, životinja iz porodice *Felidae*, ali imajući u vidu da postoje tri infektivna životna oblika, moguća je, u odsustvu definitivnih domaćina, i dugotrajna transmisija isključivo između prelaznih domaćina, ili pak transmisija isključivo između definitivnih domaćina u odsustvu prelaznih domaćina, što je manje verovatno (Slika 5) (Tenter et al., 2000). Primarni prirodni način prenosa je ingestija, uglavnom jednog od dva infektivna oblika parazita, bradizoita u tkivnim cistama ili sporozoita u oocistama, preko kontaminirane hrane ili vode (Dubey et al., 1970; Benenson et al., 1982; Tenter et al., 2000; Hill i Dubey, 2002; Montoya i Liesenfeld, 2004; Halonen i Weiss, 2013). Manje zastupljen ali klinički najznačajniji put širenja je vertikalna transmisija, koja je suštinski takođe posledica ingestije tkivnih cista ili oocista, a podrazumeva prenos tahizoita, u koje su se konvertovali bradizoiti ili sporozoiti, putem krvi sa gravidne jedinice na plod. U matematičkim modelima značaja pojedinih puteva transmisije vertikalna transmisija bila je značajna u kontekstu održavanja parazita u prirodi i transmisije na definitivnog domaćina kroz miševе, koji su otuda važan prirodni rezervoar, dok je retka kod samih definitivnih domaćina (Sakamoto et al., 2009; Deng et al., 2020). Načini transmisije koji nisu prirodni ali su od velikog kliničkog značaja su prenos tahizoita transfuzijom ili transplantacijom ćelija krvi, ili prenos tkivnih cista sa bradizoitima transplantacijom organa, a moguć je i slučajni prenos nekog infektivnog oblika u laboratorijskim uslovima (Montoya i Liesenfeld, 2004; Halonen i Weiss, 2013). Voda kontaminirana oocistama predstavlja jedini put sa epidemijским potencijalom za širenje i transmisiju parazita, bilo kroz direktnu konzumaciju, što je daleko češći slučaj globalno, ili konzumaciju voća i povrća na kojima su deponovane oociste kroz irigaciju, pa čak i pojedinih vrsta morskih školjki, koje nastanjuju slankastu vodu blizu ušća reka, u kojima su se oociste našle kao posledica hranjenja filtracijom vode (Benenson et al., 1982; Shapiro et al., 2019; Nayeri et al., 2021). Kontaminiranoj vodi su najviše izložene životinje, pretežno divlje, dok je u slučaju čoveka, izloženost višestruko veća u zemljama ili regionima gde je manje dostupna ili sasvim nedostupna adekvatno hemijski i mehanički tretirana pijaća voda. Smatra se da je veliki broj infekcija u južnoj Americi upravo posledica konzumacije vode kontaminirane oocistama (Keenihan et al., 2002; Bahia-Oliveira et al., 2003; Djurković-Djaković et al., 2019). Oocistama u zemljištu su najviše izložene životinje koje se hrane direktno sa zemlje, kao što su određeni herbivori, ptice i glodari (Tenter et al., 2000; Hassan et al., 2018; Freppel et al., 2019). Domaće slobodnoživeće kokoške su se istakle kao važan indikator za kontaminiranost sredine oocistama zbog specifičnog načina hranjenja (Dubey et al., 1993 i 2020).



**Slika 5.** Šematski prikaz različitih puteva transmisije. Za *T. gondii* dominantan način prenosa je ingestija, dok je vertikalna transmisija manje zastupljena. Putevi širenja parazita su hrana (prvenstveno meso, zatim povrće koje raste na ili pod zemljom, voće ili začinsko bilje niskog rasta) i voda. Tri životna oblika parazita: tahizoit, bradizoit i sporozoit, infektivni su za sve domaćine, ali sporulisane oociste imaju najveći prenosni potencijal, dok tahizoiti imaju najmanji. Preuzeto iz Tenter et al. (2000) i modifikovano.

Kod čoveka postoji mogućnost direktne ingestije oocista nakon feko-oralnog prenosa posle kontakta sa fecesom definitivnog domaćina, ali imajući u vidu da lučenje oocista traje svega dve nedelje, a da je za infektivnost neophodan proces sporulacije u spoljašnjoj sredini koji traje i do 7 dana, verovatnoća za ovaj put zaražavanja je niska—pogotovo u slučaju kućnih mačaka koje se ne hrane živim mesom i nemaju pristup spoljašnjoj sredini (Elmore et al., 2010). Ingestija tkivnih cista koje sadrže bradizoite je značajan način prenosa parazita kod svih životinja koje se hrane mesom, uključujući i ljude (Dubey et al., 1970; Tenter et al., 2000; Montoya i Liesenfeld, 2004; Halonen i Weiss, 2013). Imajući u vidu da je zbog efikasne interkonverzije životnih oblika *T. gondii* izuzetno teško precizno identifikovati izvor infekcije, gotovo je nemoguće odrediti koji su putevi transmisije kritični u određenim oblastima i predstavljaju priliku za intervencije u cilju smanjenja transmisije (Tenter et al., 2000; Hill i Dubey, 2002; Deng et al., 2020). U većini zemalja u Evropi i u svetu je potvrđeno prisustvo oocista u površinskim vodama (ponajviše rekama), što je indicija da su i vode značajan rezervoar parazita ne samo u južnoj Americi (Benenson et al., 1982; Aubert i Villena, 2007; Ćirković et al., 2020). Takođe, prevalenca infekcije kod domaćih životinja može biti visoka, u zavisnosti od vrste ali i od načina uzgoja—slobodnog ili zatvorenog, dok su divlje životinje i dalje nedovoljno ispitane (Tenter et al., 2000; Klun et al., 2006; Kuruca et al., 2017).

## 2.1 Prevencija i kontrola transmisije

Otpornost tri infektivna životna oblika na različite fizičke i hemijske uslove, od koje zavisi vijabilnost pa i transmisija, vrlo je različita. Najotporniji oblik *T. gondii* je sporulisana oocista (Jones i Dubey, 2010; Freppel et al., 2019). Oociste je izuzetno teško inaktivisati ili uništiti hemijskim tretmanima, ostaju vijabilne u širokom temperaturnom opsegu, a otklanjanje iz površinske vode ili zemljišta je za sada gotovo nemoguće, što čini kontrolu transmisije vrlo neefikasnom (Shapiro et al., 2019). Odavno je prepoznato da će se značajna kontrola transmisije postići samo vakcinacijom, a dugogodišnji cilj naučnih istraživanja na globalnom nivou je upravo razvoj efikasnih vakcina, koji za sada i dalje ostaje neostvaren iz mnogih razloga, iako je bilo delimičnih uspeha u životinjskim modelima, te je prevencija jedini izbor (Buxton i Innes, 1995; Innes et al., 2009; Djurković-Djaković, et al., 2019; Bonačić-Marinović et al., 2019). Način prevencije transmisije oocista je, što se domaćih životinja tiče, isključivo zatvoren uzgoj, striktna kontrola i ograničenje pristupa mačkama kao i izbegavanje korišćenja netretiranih površinskih voda za napajanje (Deng et al., 2020). Što se čoveka tiče, glavni vid prevencije je adekvatno tretirana pijaća voda, a zatim i izbor podzemne vode ili kišnice za irigaciju voća i povrća (Shapiro et al., 2019). Iako fizički i hemijski tretmani vode u cilju stvaranja pijaće vode globalno nisu isti, samo zagrevanje vode na preko 60°C je pokazalo visoku efikasnost za inaktivaciju oocista, takođe, ispitivanja su pokazala da u većini slučajeva nisu prisutne u podzemnim vodama (Freppel et al., 2019). Sledeći relativno otporan oblik je tkivna cista koja sadrži bradizoite. S obzirom na to da ne postoji nijedan lek koji deluje na bradizoite, kontrola transmisije se ističe kao jedina mogućnost. Način kontrole transmisije infekcije tkivnim cistama ljudima (i kućnim ljubimcima), koji je i tehnički sasvim moguć, ali za sada nije ni praktičan niti isplativ, bilo bi testiranje domaćih životinja na prisustvo *T. gondii* i otklanjanje inficiranih životinja iz lanca ishrane. Umesto toga, i u ovom slučaju ostaje prevencija, što podrazumeva inaktivaciju tkivnih cista u mesu adekvatnom termičkom obradom, kuvanjem ili pečenjem kojim se postiže temperatura mesa preko 60°C ili zamrzavanjem na -20°C. Primenom prevencije se uveliko smanjuje rizik za vertikalnu transmisiju. Tahizoiti su najosetljiviji životni oblik, kratko ostaju vijabilni izvan ćelije domaćina, termolabilni su, osetljivi na osmotski pritisak i gotovo sva sredstva za dezinfekciju. Prevencija transmisije transfuzijom je sasvim moguća adekvatnim testiranjem i izbegavanjem korišćenja krvi donora u akutnoj infekciji, koja je kratkotrajna, te je verovatnoća za ovaj vid transmisije minimalna.

## **3. Patogeneza i imunski odgovor na infekciju**

Koevolucija parazita i domaćina podrazumeva specifične interakcije čija je svrha da omogućuje koegzistenciju, koja u slučaju *T. gondii* može da traje dugi niz godina, u zavisnosti od životnog veka domaćina. Infekcija i imunski odgovor domaćina na infekciju, koji čine mehanizmi rezistencije i mehanizmi tolerancije, pažljivo su izbalansirani upravo da bi omogućili opstanak i optimalne uslove za transmisiju parazita, što podrazumeva izazivanje relativno blage patologije koja omogućava dugoročno preživljavanje domaćina (Hunter et al., 2012; Gazinelli et al., 2014; Melchor i Ewald, 2019). Infekcija započinje ingestijom tkivne ciste ili oociste, čija membrana ili zid se u gastrointestinalnom traktu svih domaćina narušava proteolizom i oslobađaju se bradizoiti ili sporozoiti koji zatim inficiraju enterocite ili zahvaljujući kliznoj motilnosti, prolaze epitel i inficiraju razne imunske ćelije u kriptama *laminae propriae* (Buzoni-Gatel et al., 2006). Inficirani enterociti i druge ćelije luče hemokine koji navode ćelije urođenog imunskog sistema do žarišta gde se nalaze paraziti, a imajući u vidu da egres tahizoita iz inficirane ćelije uslovljava smrt te ćelije, stvaraju se i uslovi za lokalnu inflamaciju, koja takođe promovira regrutaciju imunskih ćelija. Efektorske ćelije urođenog imunskog sistema, dendrične ćelije (DC), NK ćelije, makrofazi (MF), inflamatorni monociti i neutrofili, ključni su za preživljavanje domaćina u ranoj fazi infekcije i za kontrolu akutne infekcije dok su aktivirani CD8<sup>+</sup> limfociti, koji deluju citotoksično i uništavaju inficirane ćelije, glavni posrednici mehanizama rezistencije i tolerancije

adaptivnog imunskog sistema (Bhadra et al., 2014; Suzuki, 2021). Aktivirani CD4<sup>+</sup> limfociti i njihove posebne subpopulacije, T-regulatorne ćelije (T<sub>reg</sub>), primarno regulišu mehanizme tolerancije, jer su značajan izvor anti-inflamatornog citokina IL-10 u kasnoj infekciji i služe kao ispomoć za diferencijaciju i održavanje CD8<sup>+</sup> populacija (Denkers, 2003; Wilson et al., 2005; Khan et al., 2019). Iako infekcija indukuje sintezu specifičnih antitela različitih klasa, uključujući IgA, IgM, IgG, IgE, i to značajnih nivoa u ponekim slučajevima, pokazano je da je ćelijski imunitet esencijalan za preživljavanje domaćina (Denkers i Gazzinelli, 1998; Zaretsky et al., 2012).

Nakon infekcije ili samo kontakta sa proteinima *T. gondii*, DC sintetišu velike količine IL-12, koji se sastoji od subjedinića IL-12p40 i IL-12p35, a neutrofil i NK ćelije sintetišu IFN- $\gamma$ , koji zajedno promoviraju diferencijaciju limfocita u Th-1 (engl. *T-helper*) fenotip i na taj način se pokreće proinflamatorni imunski odgovor karakterističan za *T. gondii* infekciju, a neophodan za preživljavanje domaćina. Kod miša, produkcija IL-12 se inicira na dva načina, naime signalizacijom kroz TLR11 i TLR12 (engl. *Toll-like receptor*), intraćelijske endozomalne receptore u DC i MF, čiji je ligand TgPRF (*T. gondii* profilin), ili kroz ligaciju hemokinskog receptora CCR5 (engl. *C-C chemokine receptor 5*) na ćelijskoj membrani sa ciklofilinom, što je značajan mehanizam indukcije sinteze IL-12 kod CD8 $\alpha^+$  DC u slezini (Aliberti et al., 2000; Yarovinsky et al., 2006; Denkers, 2003, Shortman i Heath, 2010). Dok su DC odgovorne za gotovo sav IL-12 koji se sintetiše nakon infekcije, pokazano je da je rezultat većine interakcija parazita sa MF, koji imaju sposobnost uništavanja tahizoita, zapravo sabotaza njihove funkcije (Leng et al., 2009; Tosh et al., 2016). Signalizacija koja aktivira transkripciju poreklom od TLR11, 12, ali i 2 i 4, koji su odgovorni za TNF, većinski zavisi od adaptera MyD88 (engl. *Myeloid differentiation primary response 88*) koji konačno aktivira transkripcioni faktor (TF) NF- $\kappa$ B (engl. *Nuclear factor  $\kappa$  light chain enhancer of activated B cells*), dok signalizacija kroz CCR5 između ostalog, konačno aktivira TF STAT3 (engl. *Signal transducer and activator of transcription 3*), STAT6, FoxP3 (engl. *Forkhead box P3*), T-bet (engl. *T-box expressed in T cells*), koji imaju važne regulatorne funkcije u kontekstu imunskog odgovora na infekciju (Saeij et al., 2005; Butcher et al., 2005; Butcher et al., 2011; Bonfa et al., 2014).

Imajući u vidu da su oba proteina koja stimulišu produkciju IL-12 sekretorna, kod miša, ni fagocitoza celih tahizoita od strane leukocita, niti aktivna invazija nisu esencijalni za inicijaciju imunskog odgovora (Tosh et al., 2016). TLR11 je kod čoveka pseudogen, dok TLR12 gen nije uopšte prisutan u genomu, tako da dugi niz godina nije bio poznat mehanizam za indukciju IL-12 niti tipovi ćelija značajni za njegovu produkciju (Tosh et al., 2016). Danas se smatra da je za efikasnu indukciju IL-12 kod čoveka neophodna fagocitoza celih tahizoita i proteoliza usled acidifikacije endozoma da bi došlo do stvaranja liganda za intraćelijske receptore, endozomalne ili citosolne, koji prenose signale za inicijaciju transkripcije. Prema eksperimentalnim podacima, ključni fagociti su CD1c<sup>+</sup> DC i CD16<sup>+</sup> monociti, a parazitske nukleinske kiseline se smatraju potencijalnim ligandima koji okidaju transkripciju, što implicira signalizaciju kroz endozomalne receptore TLR7, 8 i 9 (Tosh et al., 2016, Sher et al., 2017). U slučaju aktivne invazije fagocita ili bilo kojih drugih ćelija, *T. gondii* stvara parazitoformu vakuolu koja ne podleže acidifikaciji, inhibira apoptozu inficirane ćelije, a i pojedini genotipovi suprimiraju transkripciju zavisnu od TF NF- $\kappa$ B, koji pored IL-12 i TNF, indukuje i IFN- $\gamma$  (Butcher i Denkers, 2002; Shapira et al. 2004; Rosowski et al., 2011). Ali, i u slučaju internalizacije tahizoita fagocitozom, na primeru aktiviranih i neaktiviranih mišjih MF je pokazano da čak i nakon stvaranja fagozoma, pojedini nisko virulentni genotipovi ipak efikasno blokiraju acidifikaciju i vrše invaziju ćelije iz samog fagozoma, dok su virulentni genotipovi rezistentni na fagocitozu (Zhao et al., 2014). Interesantno je da su kod čoveka i miša, različiti tipovi DC i inflamatornih monocita glavni izvori IL-12, naime mišjim CD8 $\alpha^+$  DC kod čoveka odgovara CD141<sup>+</sup>, ili cDC1 u krvi i tkivima, a ne CD1c<sup>+</sup> DC, ili cDC2-A i B samo u krvi, koje su glavni izvor IL-12 (Sher et al., 2017; Rhodes et al., 2019). Mišjim inflamatornim monocitima CD115<sup>+</sup>/Ly6C<sup>hi</sup> odgovaraju klasični inflamatorni monociti CD16<sup>-</sup>/CD14<sup>+</sup> kod čoveka, a ne CD16<sup>+</sup> „patrolirajući“ monociti koji su glavni izvor IL-

12 (Sher et al., 2017). Vrlo je verovatno da različiti mehanizmi indukcije sinteze IL-12, kao i različiti mehanizmi invazije leukocita, zapravo rane determinante konačnog ishoda infekcije, predstavljaju specifične evolutivne adaptacije parazita na različite domaćine. U ovom slučaju miševe, koji su značajan rezervoar parazita u prirodi sa visokim kapacitetom za transmisiju ali su relativno osetljivi na posledice infekcije, te su predisponirani za transmisiju i održavanje nisko virulentnih genotipova, i čoveka, koji je domaćin sa minimalnim kapacitetom za transmisiju, takozvani *dead-end host*, ali relativno rezistentan na posledice infekcije.

Odavno je pokazano da je IFN- $\gamma$  apsolutno neophodan za preživljavanje u ranoj fazi infekcije i održavanje hroniciteta (Suzuki et al., 1996). U ranoj fazi infekcije, ovaj citokin luče NK ćelije i neutrofili, a kasnije primarno Th-1 diferencirani CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfociti (Sturge et al., 2013). IFN- $\gamma$  je plejotropan, ali među važnim doprinosima mehanizmima rezistencije u kontekstu *T. gondii* infekcije se kod miša i čoveka izdvajaju polarizacija MF u klasičan fenotip (M1) signalizacijom kroz IFN- $\gamma$  receptor i aktivacijom TF STAT1, što stimuliše produkciju NO<sup>-</sup> i drugih reaktivnih kiseoničkih vrsta koje imaju antimikrobno dejstvo. Takođe se stimuliše produkcijaIDO (indolamin dioksigenaze), koja vrši katalizu triptofana, amino kiseline za koju je *T. gondii* prirodan auktotrof, što usporava proliferaciju tahizoita (Pfefferkorn et al. 1984; Fox et al., 2004; Hunter i Sibley, 2012). Takođe, IFN- $\gamma$  stimuliše aktivaciju transkripcionog faktora Tbet u limfocitima, koji je odgovoran za diferencijaciju u Th-1 fenotip i indukuje i sintezu familija IRG (engl. *immunity related GTPases*) i GBP (engl. *guanylate binding protein*) proteina, koje destabilizuju integritet parazitoforme vakuole u mijeloidnim i nemijeloidnim ćelijama i na taj način omogućavaju destrukciju novoformiranih tahizoita u citosolu (Szabo et al., 2000; Hunter i Sibley, 2012; Gazinelli et al., 2014; Saeij i Frickel, 2017). Imajući u vidu da su kod čoveka prisutni samo IRGM i IRGC, čiji je doprinos imunskom odgovoru na infekciju nejasan, iako postoje indicije da IRGM ima imunološku funkciju u odgovoru na pojedine patogene bakterije, mehanizmi rezistencije koji su posredovani IRG proteinima verovatno predstavljaju evolutivnu adaptaciju kod miša (Behnke et al., 2012). Kod čoveka je nedostatak IRG proteina nadomešten GBP proteinima, te se dodatno ističe značaj fagocitoze kao mehanizma rezistencije, jer se GBP regrutuju na fagozomalnu membranu i to od strane proteina koji učestvuju u autofagiji, što upućuje na potencijalan značaj autofagije i aktivacije inflamazoma (Vestal i Jeyaratman, 2011; Gazinelli et al., 2014; Saeij i Frickel., 2017). Interesantno je da funkcionalni TLR11 i 12 nisu prisutni kod mnogih vrsta, izuzev glodara i nekih sitnih sisara (zečevi, ježevi, rovčice), a da pored čoveka, ni definitivni domaćini ne poseduju ni TLR11 i 12 niti IRG proteine, koji su pak prisutni u genomima drugih vrsta sisara i kod riba, ali ne kod ptica (Gazinelli et al., 2014).

Tahizoiti se iz gastrointestinalnog trakta vrlo brzo diseminuju u limfne čvorove (LČ), slezinu, jetru, pluća, srce i ostala tkiva. Imajući u vidu da su ekstracelularni tahizoiti izuzetno osetljivi, važan način diseminacije je putem inficiranih imunskih ćelija, posebno mijeloidne loze, koje služe kao svojevrсни trojanski konj za diseminaciju tahizoita (Barragan i Sibley, 2003, Feustel et al. 2012; Sanecka i Frickel, 2012; Hunter i Sibley, 2012). Pokazano je da inficirana ćelija koja služi kao trojanski konj ne mora da napušta krvotok da bi tahizoiti dospeli u organe, već sama adhezija leukocita na ćelije endotela izaziva rani egres tahizoita, verovatno zbog influksa jona kalcijuma, što omogućava invaziju i razmnožavanje u ćelijama endotela, a zatim i paracelularnu diseminaciju (Lachenmeier et al., 2011; Feustel et al., 2012; Konradt et al., 2016; Baba et al., 2017). Invazija i kolonizacija endotela su instrumentalni za prodor parazita u centralni nervni sistem kao i kroz druge biološke barijere, kao što je placenta (Konradt et al., 2016; Baba et al., 2017). Adaptivni imunski odgovor započinje u LČ i slezini, koje infiltriraju profesionalne antigen prezentujuće ćelije (pAPC) i prezentuju antigen naivnim limfocitima kroz MHC-I, MHC-II (engl. *Major histocompatibility complex class I, II*), dok u kasnijim fazama infekcije, nakon diseminacije tahizoita, prezentacija može da se odvija i u ostalim tkivima jer i drugi tipovi ćelija, kao što su astrociti i neuroni, mogu da deluju kao APC, ali prezentuju isključivo kroz MHC-I CD8<sup>+</sup> limfocitima (Dzierszinski et al., 2007; Merritt et al., 2020; Rahman et al., 2020). Infekcija slezine u ranoj fazi infekcije prema nekim podacima dovodi do apoptoze ćelija, atrofije

bele pulpe, lipofuscinoze i kolagenopatije, zapravo progresivnog gubitka strukture tkiva, što tada uslovljava i smanjenje produkcije antitela (Zaretsky et al., 2012; Lee et al., 2019; Pereira et al., 2019). Struktura tkiva se vremenom postepeno regeneriše sa smanjenjem inflamacije, ali uprkos tome je pokazano da doprinos slezine za sintezu anti *T. gondii* antitela u kasnijoj fazi infekcije nije značajan, jer su tada nivoi antitela kod inficiranih miševa kojima je slezina hirurški odstranjena i kod onih kojima nije, gotovo jednaki (Zaretsky et al., 2012). Ovo implicira doprinos slezine u ranoj fazi infekcije, ali ne i ključni značaj za inicijaciju ili održavanje humoralnog imunskog odgovora, nego upućuje na važnost LČ u ovom kontekstu.

Uz prezentaciju antigena od strane pAPC bilo kroz MHC-I ili MHC-II, za aktivaciju limfocita u efektorski fenotip neophodan je sekundarni signal, koji se dobija interakcijom ko-stimulatornih receptora i liganda, i konačno tercijarni signal, koji ispoljava odgovarajuće citokinsko okruženje (Gigley et al., 2011). Sem toga, mogućnost prezentacije antigena od strane neprofesionalnih APC, implicira da se uspeh dugoročnog imunskog odgovora na infekciju u velikoj meri zasniva na funkciji antigen specifičnih CD8<sup>+</sup> limfocita, bilo efektor ili memorijskih ćelija, koji deluju citotoksično i sintetišu proinflamatorne citokine, dok CD4<sup>+</sup> limfociti podržavaju diferencijaciju, proliferaciju i funkciju CD8<sup>+</sup> populacije (Khan et al., 2019). CD4<sup>+</sup> doprinose prezentaciji antigena, indukuju ko-stimulatorne receptore na pAPC i sintezu IFN- $\gamma$  u NK ćelijama, sintetišu proinflamatorne citokine i IL-2, koji je pozitivan signal za ekspanziju limfocitne populacije, a T<sub>reg</sub>, posebna populacija CD4<sup>+</sup> limfocita, doprinose diferencijaciji CD8<sup>+</sup> efektor u memorijske ćelije i suprimiraju inflamaciju (Denkers i Gazinelli, 1998; Bhadra et al., 2011; Khan et al., 2019). Za održavanje memorijskih CD8<sup>+</sup> ćelija visokog aviditeta, ključnu populaciju koja uništava inficirane ćelije i tkivne ciste u kasnoj fazi infekcije, neophodni su IL-7 i IL-15 koje sintetišu uglavnom leukociti, dok IL-12 deluje kao pozitivan signal za diferencijaciju u efektorski ili efektor memorijski fenotip, koji zadržava citotoksičnu funkciju i ima predispoziciju za periferne limfoidne organe (Wilson et al., 2010; Grigley et al., 2011). Nasuprot tome, IL-12 takođe suprimira diferencijaciju u centralno memorijski fenotip, koji nema citotoksičnu funkciju, već uglavnom sintetiše citokine i ima predispoziciju za sekundarne limfoidne organe (Wilson et al., 2010). Pokazano je da je lokalizacija efekorskog memorijskog i memorijskog fenotipa zavisna od afiniteta T-ćelijskog receptora za MHC, naime da se limfociti sa visokim afinitetom lokalizuju u pojedinim tkivima i da osnivaju populacije koje trajno borave u tim tkivima (engl. *tissue resident*), dok ćelije sa niskim afinitetom ostaju na periferiji, što objašnjava značaj CD8<sup>+</sup> limfocita visokog aviditeta za dugoročnu toleranciju infekcije (Sanecka et al., 2018; Tsitsiklis et al., 2019; Merritt et al., 2020; Suzuki, 2021).

Iako inflamacija, koja je delimično posledica aktivnosti samog parazita ali i prisustva proinflamatornih citokina, doprinosi smanjenju broja tahizoita u ranoj fazi infekcije kroz razne mehanizme, postoji rizik od prekomerne nekroze tkiva, posebno u ranoj infekciji, ukoliko intenzitet proinflamatornog odgovora nije kontrolisan mehanizmima tolerancije (Gazinelli et al., 1996). Sem toga, smatra se da snažno antiparazitsko dejstvo Th-1 odgovora negativno utiče na transmisiju, jer ne pogoduje razvoju tkivnih cista, iako inflamacija promoviše prodor kroz biološke barijere, jer ujedno uzrokuje i patologiju koja može biti fatalna za domaćina već u ranoj infekciji, što implicira mogućnost da je glavni mehanizam tolerancije, supresija Th-1, evolutivna adaptacija parazita na domaćina ili obrnuto (Neyer et al., 1997; Denkers i Gazinelli, 1998; Rosowski et al., 2011). Eksperimentalno je utvrđeno da se supresija Th-1 većinski postiže efektima anti-inflamatornog citokina IL-10, koji je plejotropan, a sintetiše se već u ranoj fazi infekcije primarno od strane inficiranih MF i inhibira transkripciju IL-12 u ovim ćelijama i indukciju IFN- $\gamma$  u NK ćelijama, dok su u kasnijoj fazi infekcije CD4<sup>+</sup> limfociti glavni izvor IL-10 (Gazinelli et al., 1996; Wilson et al., 2005). Sem inhibicije IL-12 u MF od strane IL-10, što je vid autoregulacije, pokazano je da sam parazit aktivno inhibira transkripciju IL-12 i TNF kroz aktivaciju STAT3, koji reguliše ćelijsku signalizaciju zavisnu od IL-10 (Ihle, 2001; Butcher et al., 2005).



Inhibicija IL-12 i IFN- $\gamma$  u ranoj fazi infekcije ima dalekosežne posledice jer suprimira polarizaciju MF u M1 fenotip kao i Th-1 diferencijaciju limfocita zavisnu od IFN- $\gamma$ , dok u kasnijoj fazi infekcije, IL-10 suprimira inflamaciju zavisnu od IFN- $\gamma$  i sintezu IL-2 (Denkers i Gazinelli, 1998). Ali, iako ima antagonističko dejstvo u kontekstu Th-1 imunskog odgovora, u odsustvu endogenog IL-10 (IL10<sup>-/-</sup>) miševi ne preživljavaju akutnu fazu infekcije, a patologija koja dovodi do smrti je posledica visokih nivoa proinflamatornih citokina koji uslovljavaju intenzivnu inflamaciju (Gazinelli et al, 1996; Neyer et al., 1997; Denkers i Gazinelli, 1998). Ista patologija je pokazana i kod miševa koji nemaju funkcionalan STAT3 (STAT3<sup>-/-</sup>), što implicira da je zapravo kontrola aktivacije STAT3 u MF od strane parazita esencijalna protivmera za domaćinove mehanizme rezistencije (Takeda et al., 1999; Leng et al., 2009).

Zaštitna funkcija IL-10 je takođe pokazana i u hroničnoj infekciji, na mišjem modelu toksoplazmatskog encefalitisa (TE), gde je moguće da ima sinergistički efekat u redukciji inflamacije sa TGF- $\beta$  kojeg luče mijeloidne ćelije, i ima direktnu neuroprotektivnu funkciju (Wilson et al., 2005; Cekanaviciute et al., 2014). Sintezu IL-10 u CD4<sup>+</sup> limfocitima promoviše IL-27, citokin koji se sastoji od subjedinica p28 i EB13 (engl. *Epstein-Barr virus induced gene 3*), kojeg sintetišu različite subpopulacije CD4<sup>+</sup> limfocita. U kontekstu infekcije *T. gondii* pokazano je da je ovaj interleukin takođe ključan za razvoj populacije T<sub>reg</sub> ćelija koje specifično kontrolišu inflamaciju povezanu sa Th-1 (T-bet<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>), dok su TGF- $\beta$  i IL-2 neophodni za održavanje T<sub>reg</sub> populacije (O'Hara Hall et al., 2012). U kontekstu ovih saznanja se objašnjava reaktivacija infekcije i TE specifična patologija kod HIV<sup>+</sup> pacijenata, koja nastaje u kasnim fazama nelečenog AIDS-a, kada deplecija gotovo cele CD4<sup>+</sup> populacije uslovljava i smanjenje CD8<sup>+</sup> populacije sa kapacitetom za uništavanje inficiranih ćelija, dok sinergistički efekat proliferacije tahizoita i smanjenja nivoa antiinflamatornih citokina intenzivira inflamaciju koja prouzrokuje lokalizovanu nekrozu tkiva, što pospešuje prodor tahizoita kroz biološke barijere i diseminaciju. Sem gubitka limfocitne populacije, pokazan je i gubitak efektorske funkcije kod C57B6 soja inbred miševa, kod kojih se spontano razvija TE, između ostalog i zbog fenomena iscrpljivanja (engl. *exhaustion*), koji podrazumeva indukciju TF Blimp1 (engl. *B Lymphocyte induced maturation protein 1*) kod CD4<sup>+</sup> i inhibitornog receptora PD-1 (engl. *Programmed cell death protein 1*) kod CD8<sup>+</sup>, što može delimično da objasni spontanu reaktivaciju infekcije i kod drugih imunokompetentnih domaćina (Tsitsiklis et al., 2019).

Regulacijom indukcije gena za IL-12 i IL-10, ključnih antagonista mehanizama rezistencije i tolerancije, *T. gondii* omogućava preživljavanje domaćina i striktno kontrolišu patologiju tokom procesa infekcije tkiva i diseminacije po organizmu, što je preduslov za efikasnu incistaciju i dugoročno preživljavanje u cilju transmisije. Jedan od mehanizama kojim se postiže regulacija je kontrola transkripcije kod MF aktivacijom različitih TF—NF- $\kappa$ B ili STAT3/6—u zavisnosti od genotipa parazita (Saeij et al., 2006; Butcher et al., 2011). Incistacija, koja predstavlja tipičan ishod patogeneze kod velike većine inficiranih domaćina, posledica je kombinacije imunološkog pritiska, ali i genske regulacije u okviru životnog ciklusa parazita, koja je specifična za svaki genotip (Luder i Rahman, 2017; Jeffers et al., 2018). Odavno je poznato da proinflamatorno okruženje koje čini Th-1 odgovor indukuje konverziju tahizoita u bradizoite, ali je na primeru MF polarizovanih *in vitro* u M1 fenotip i aktiviranih lipopolisaharidom (LPS) pokazano da je ključan i stupanj aktivacije, jer deoba tahizoita u inficiranim ćelijama ne sme da bude kompletno obustavljena da bi došlo do incistacije. Ovo objašnjava postojanje više načina aktivacije različitih leukocita kod miša i kod čoveka, koji upravo predstavljaju različite vidove kontrole mehanizama rezistencije *in vivo* (Bohne et al., 1993). Sem ovoga, u neuronima i miocitima, kao terminalno diferenciranim, dugoživećim ćelijama predilekcionih tkiva, konverzija tahizoita u bradizoite i formiranje tkivnih cista se odvija i spontano, u uslovima bez imunološkog pritiska, što ukazuje na gensku regulaciju kontrole incistacije kod parazita, ali implicira i postojanje specifičnih odlika ovih tipova ćelija za promovisanje konverzije i incistacije (da Fonseca Ferreira-da-Silva et al., 2009; Luder i Rahman, 2017). Činjenica da se „mlade“ ciste, koje se stvaraju u ranijoj fazi infekcije, mogu razlikovati od „starijih“ po zapremini, koja se uvećava sa

proliferacijom bradizoita, kao i po debljini membrane, navodi na zaključak da tkivne ciste nisu inertne, iako je upravo to bila dugogodišnja dogma (Dubey et al., 1998; Suzuki, 2021). Proliferacija je zavisna od metaboličke aktivnosti, koja je značajno niža kod bradizoita u odnosu na tahizoite, ali ipak zahteva razmenu materijala sa ćelijom domaćina, što implicira i postojanje parazitskih proteina koji se nalaze unutar ćelije domaćina ili se eksportuju u međućelijski prostor i mogu da posluže kao antigen, a pokazano je da i inficirani neuroni sami mogu da prezentuju antigen molekulima MHC I klase (Sa et al., 2017; Salvioni et al., 2019; Suzuki, 2021). U poslednjih nekoliko godina, eksperimentalna istraživanja su takođe pokazala da su CD8<sup>+</sup> ćelije u mozgu miša lokalizovane u neposrednoj blizini inficiranih neurona, a utvrđeno je da je posebna populacija CD8<sup>+</sup> limfocita sa Vβ8.1 i 8.2 receptorom sposobna da prepozna epitop *T. gondii* sekretornog proteina GRA6 od 106 amino kiselina koji se nalazi u N-terminalnom regionu (ak44-152) (Sa et al., 2017; Merritt et al., 2020). Ovo za posledicu ima aktivaciju citotoksične funkcije ove CD8<sup>+</sup> populacije, što podrazumeva penetraciju inficirane ćelije a zatim i tkivne ciste, bilo „mlade“ ili „stare“, mehanizmima koji zavise od perforina, i konačno sekreciju proteaze granzim B koja uništava bradizoite (Tiwari et al., 2019; Suzuki, 2021). Svi ovi podaci pokazuju da je i hronična faza infekcije imunološki vrlo aktivna, što implicira revolucionarnu mogućnost za kompletnu eradikaciju incistiranih parazita kod svih domaćina odgovarajućom imunoterapijom, što se nije moglo postići dosadašnjim terapijskim mogućnostima.

#### 4. Populaciona genetika

Mnoge protozoe i drugi eukarioti, koji mogu da se razmnožavaju mejozom, imaju “klonalnu” populacionu strukturu, što se zaključuje na osnovu dokazane dugoročne dominacije pojedinih genotipova u populacijama koje su prostorno udaljene kao i prisustva ne slučajne povezanosti alela na različitim lokusima (engl. *linkage disequilibrium*) (Tibayrenc et al., 1991; Tibayrenc i Ayala, 2002; Darde, 2008). Klonalnost ne znači odsustvo seksualne reprodukcije, već ukazuje na nisku frekvenciju rekombinacije genoma, što vremenom dovodi do stvaranja klonskih loza koje međusobno mogu biti i vrlo divergentne ako evoluiraju u različitim okolnostima, kao što su geografske oblasti koje karakteriše različita klima ili, u slučaju parazita, različite vrste domaćina (Ayala, 1998; Tibayrenc i Ayala, 2002). Kod vrsta sa klonalnom populacionom strukturom utvrđivanje diverziteta je otežano, jer zahteva analizu daleko veće populacije sojeva nego što je slučaj kod panmiktičnih vrsta, da bi se obuhvatio adekvatan broj postojećih klonskih loza (Ayala, 1998). *T. gondii* poseduje poliklonalnu populacionu strukturu koja se sastoji od loza I, II, III koje su globalno rasprostranjene i najfrekventnije u severnoj Americi i Evropi, zatim loza koje su geografski lokalizovane, ali vrlo frekventne kao što su BrI-BrIV u Brazilu, *Africa 3* u zapadnoj Africi, i *China 1* u Kini, i loza koje su visoko frekventne ali u određenim populacijama, kao što je haplotip 12 (ili loza IV, tip X) kod divljači u severnoj Americi (Dubey et al., 2007; Pena et al., 2008; Khan et al., 2011; Su et al., 2012; Wang et al., 2013; Shwab et al., 2014; Mercier et al., 2010; Galal et al., 2019). Sem ovih postoje i klonske loze koje su vrlo nisko frekventne u nekim regionima, a visoko frekventne u drugim, čija geografska distribucija iz tih razloga nije precizno određena, kao što su *Africa 1*, koja je prisutna u zapadnoj i severnoj Africi ali i u južnoj Evropi, što podstiče sumnju da je globalna, ali i loze koje su frekventne, mada u izuzetno specifičnim geografskim oblastima kao što je Amazonija (Pena et al., 2008; Mercier et al., 2010; Doškaya et al., 2013; Can et al., 2014; Galal et al., 2019; Hamidović et al., 2021). Na osnovu ovih saznanja očigledno je da se diverzitet vrste *T. gondii* dosta razlikuje po geografskoj osnovi—zapravo nizak diverzitet na ogromnoj teritoriji severne hemisfere, koje čini severna Amerika, Evropa i Kina, u odnosu na visok diverzitet prisutan na relativno maloj teritoriji južne hemisfere, koju čine centralna Amerika, Brazil i Kolumbija—što se prema nekim tvrdnjama u evolutivnom kontekstu može objasniti kao posledica ko-migracija sa mnogim vrstama definitivnih domaćina i trajnim nastanjivanjem na južnoj hemisferi (Johnson et al., 2006; Khan et al., 2011; Su et al., 2012; Shwab et al., 2014). Ali, obzirom da su utvrđene i značajne razlike u diverzitetu populacija genotipova izolovanih ili detektovanih u ljudima i domaćim životinjama u odnosu na divlje

životinje na gotovo svim kontinentima, kao i diverziteta populacije u okviru različitih loza, jasno je da postoje i drugi faktori sa manje ili više značajnim uticajem na diverzitet (Howe i Sibley, 1995; Howe et al., 1997; Mercier et al., 2011; Jiang et al., 2018; Galal et al., 2019).

Smatra se da postojanje klonskih loza kod *T. gondii* nije posledica rekombinacija brojnih drevnih genotipova koje su vremenom izrodile uspešne genotipove, koji su se zatim u specifičnim uslovima razvili u različite loze i brzo diseminovali širom sveta, već je zapravo rekombinacija genoma uvek bila relativno nefrekventna, dok se ubikvitarnost malog broja srodnih genotipova objašnjava epidemijskim širenjem u određenom vremenskom periodu (Grigg et al., 2001; Grigg i Suzuki, 2003). Činjenica da je potencijal za epidemijsko širenje vrste povezan sa sporulisanim oocistama implicira zavisnost od definitivnog domaćina, što podrazumeva značaj mejoze, ali ne i rekombinacije genoma, koja je moguća samo u slučaju ko-infekcija sa dva različita genotipa, da bi tahizoiti oba mogli da učestvuju u gametogoniji. Sem transmisije oocistama, prema nekim tvrdnjama, kredibilitetu epidemijskog scenarija ide u prilog i nalaz povišenog kapaciteta transmisije putem tkivnih cista kod mnogih frekventnih genotipova, uključujući i najfrekventniji na severnoj hemisferi, arhetip II (ToxoDB#1) (Su et al., 2003). Ovim se ne isključuje mejoza kao evolutivni pokretač vrste već se implicira da je rekombinacija genoma bila izuzetno uspešna, jer visoka filogenetska bliskost genotipova iz tri dominantne klonske loze I, II i III svedoči o tome da su one rezultat rekombinacija relativno malog broja drevnih genotipova, čiji genomi se smatraju delimično sačuvanim kod "atipičnih" genotipova (Grigg et al., 2001; Grigg i Suzuki, 2003, Su et al., 2003; Boyle et al., 2006).

#### 4.1 Metode genotipizacije i genotipovi *T. gondii*

Metoda zlatnog standarda za genotipizaciju sojeva *T. gondii* je MnPCR-RFLP (engl. *Multiplex nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) koja obuhvata 9 genomskih lokusa na 7 od ukupno 14 hromozoma i jedan lokus u apikoplastnoj DNK (Khan et al., 2005; Su et al., 2006; Su et al., 2010). Metoda je razvijena na osnovu referentnih genotipova koji predstavljaju loze I, II i III i zasniva se na detekciji SNP (engl. *single nucleotide polymorphisms*) prisutnih u sekvencama na različitim lokusima, restrikcijom odgovarajućim endonukleazama nakon koje se dobijaju fragmenti različitih dužina koje predstavljaju različite tipove alela (Sibley i Boothroyd, 1992; Howe i Sibley, 1995). Referentne genotipove za loze I, II i III, takozvane arhetipove, definiše identičan tip alela na svim lokusima, dok kombinacija različitih tipova alela definiše varijantne genotipove, a dominantan tip alela u genotipu, koji zapravo predstavlja obrazac tipova alela na 9 lokusa, klasifikuje genotip u određenu klonsku lozu. Imajući u vidu da se apikoplastna DNK nasleđuje isključivo od makrogamonta, tip alela na tom lokusu, ukoliko se razlikuje od dominantnog tipa alela u genomskoj DNK, definiše rekombinantne genotipove (Ferguson et al., 2005). Iako su lokusi podobni za genotipizaciju odabrani na osnovu ukrštanja tri arhetipa, što podrazumeva da detektuju polimorfizme koji karakterišu samo alele tipa 1, 2 i 3, koji su visoko frekventni i razlikuje ih u mnogim slučajevima samo po jedan SNP, postoje i relativno nisko frekventni aleli u-1, u-2 i najređi, u-3, koji su detektovani na pojedinim lokusima (www.toxodb.org; Khan et al., 2005; Su et al., 2010). Za sada je na osnovu PCR-RFLP genotipizacije sojeva iz celog sveta zvanično definisan 231 genotip koji su pohranjeni u elektronskoj bazi podataka ToxoDB, iako je nezvaničan broj identifikovanih genotipova preko 300. Iako postoji šest tipova alela, za sada su i dalje prepoznata samo tri arhetipa ToxoDB#10, arhetip loze I, ToxoDB#1, arhetip loze II i ToxoDB#2, arhetip loze III, dok su referentni genotipovi za sve ostale loze varijantni (Tab. 1) (www.toxodb.org). Filogenetskom analizom je do sada identifikovano 15 globalnih haplogrupa (HG), od kojih svaka ima svoj referentni genotip i koje su po osnovu srodnosti svrstane u šest klada (A-F) (Su et al., 2012). Analizom polimorfizama apikoplastne DNK 35 različitih genotipova utvrđeno je da su haplogrupe 1, 2, 4 i 8 potomci jedne drevne matične loze, dok su 3, 6 i 9 potomci druge drevne matične loze, te se smatra da su četiri moguće ancestralne loze od kojih su potekli svi genotipovi HG2, HG4, HG6 i HG9 (Boyle et al., 2006; Khan et al., 2011).

**Tabela 1.** Referentni genotipovi globalne populacione strukture *T. gondii*. Prikazani su referentni genotipovi za 15 HG. Samo prva tri genotipa su arhetipovi; HG 1, 2, 3 i 6 predstavljaju geografski najšire rasprostranjene loze. Genotipovi ToxoDB#28 (CAST), ToxoDB#66 (TgCgCa01) i ToxoDB#40 (TgCtCo05) su označeni kao atipični, dok HG 7, 11 i 13 nisu uvršteni u klade zbog nedovoljnog broja srodnih genotipova.

Referentni soj	Haplogrupa (HG), klada (A-F)	Lokusi korišćeni za genotipizaciju PCR-RFLP metodom											Genotip	
		SAG1	SAG2	AltSAG2	SAG3	BTUB	GRA6	C22-8	C29-2	L358	PK1	APICO		
GT1 (Arhetip I)	HG1, A	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	ToxoDB#10
ME49 (Arhetip II)	HG2, D	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	ToxoDB#1
VEG (Arhetip III)	HG3, C	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	ToxoDB#2
FOU (Africa 1)	HG6, A	I	I	I	III	I	II	U-1	I	I	I	I	I	ToxoDB#6
ARI (Loza IV)	HG12, D	U-1	II	II	II	II	II	II	II	I	II	I	I	ToxoDB#5
TgCatPRC2 (China 1)	HG13	U-1	II	II	III	III	II	II	III	II	II	I	I	ToxoDB#9
DOM2 (Africa 3)	HG14, A	I	I	II	III	III	I	III	I	III	III	I	I	ToxoDB#16
MAS (BrIV)	HG4, B	U-1	I	II	III	III	III	U-1	I	I	III	I	I	ToxoDB#17
RUB (Amazonian)	HG5, F	I	I	II	I	III	III	II	III	I	III	III	III	ToxoDB#96
CAST (Atipičan)	HG7	I	I	I	I	I	I	II	I	III	I	III	III	ToxoDB#28
TgCatBR05 (BrI)	HG8, B	I	III	III	III	III	III	I	I	I	U-1	I	I	ToxoDB#19
P89 (BrIII)	HG9, E	I	III	III	III	III	III	II	III	III	III	III	III	ToxoDB#8
VAND (Amazonian)	HG10, F	I	I	II	I	III	III	III	I	III	III	I	I	ToxoDB#60
TgCgCa01 (Atipičan)	HG11	I	II	II	III	II	II	II	U-1	I	U-2	I	I	ToxoDB#66
TgCtCo05 (Atipičan)	HG15, F	U-1	I	II	III	III	III	III	III	I	III	I	I	ToxoDB#40

Sem MnPCR-RFLP metode, razvijena je i metoda za multilokusnu tipizaciju zasnovana na analizi dužina sekvenci 15 odabranih mikrosatelita (MS) koji su kod *T. gondii* najčešće tandemski ponovci dva nukleotida (Ajzenberg et al., 2010; Su et al., 2010). Prednost MS je relativno visoka frekvencija mutacija u odnosu na SNP, što omogućava razlikovanje vrlo srodnih genotipova koje MnPCR-RFLP ne razlikuje (Su et al., 2010). Sem ovih metodologija, uvedeno je i multilokusno sekvenciranje kao vid genotipizacije sa najvećom rezolucijom, ali se iz praktičnih razloga retko upotrebljava, već predstavlja metodologiju koja se koristi isključivo za filogeniju u okviru specifičnih istraživanja iz oblasti populacione genetike.

## 5. Virulencija

Istraživanja virulencije parazita *T. gondii* su se odvijala gotovo paralelno sa istraživanjima populacione genetike, kada je ustanovljeno da arhetipovi loza I, II i III, (ToxoDB#10, 1 i 2) koji su među prvim izolovanim i okarakterisanim genotipovima, razlikuju u intenzitetu virulencije koju ispoljavaju kod različitih sojeva laboratorijskih miševa (Sibley i Boothroyd, 1992; Darde, 2008). Sem toga, identifikacija arhetipa loze II (ToxoDB#1) kao najfrekventnijeg uzročnika toksoplazmoze kod ljudi, kao i povezanosti pojedinih genotipova sa specifičnom kliničkom patologijom, doprinela je jačanju hipoteze da je genotip povezan sa virulencijom i da utiče na patogenezu i posledice infekcije kod domaćina (Sibley i Boothroyd, 1992; Howe i Sibley, 1995; Howe et al., 1997; Darde, 2008; Ajzenberg et al., 2009; Carne et al., 2009). Eksperimentalna procena virulencije se zasniva na procentu mortaliteta različitih sojeva laboratorijskih miševa nakon *in vivo* infekcije (Saraf et al., 2017). Utvrđeno je da se arhetipovi, koji se najčešće koriste kao modeli, razlikuju u odnosu na letalnu dozu (LD) za 50% (LD<sub>50</sub>) ili 100% (LD<sub>100</sub>) životinja, i vreme preživljavanja, tako da je za arhetip I (ToxoDB#10) LD<sub>100</sub>=1 i preživljavanje od maksimalno 10 dana nakon infekcije sa < 10 tahizoita, dok su za arhetipove II i III (ToxoDB#1 i ToxoDB#2) LD<sub>50</sub>=10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup> tahizoita, a vreme preživljavanja je neodređeno (Sibley i Boothroyd, 1992; Darde et al., 2008; Khan et al., 2009; Saraf et al., 2017). Imajući ove podatke u vidu, jasno je da je virulencija dozno nezavisna kod arhetipa I (ToxoDB#10) za razliku od arhetipova II i III

(ToxoDB#1 i ToxoDB#2), što upućuje na to da je za validnost procene virulencije neophodno sagledati kumulativni mortalitet miševa nakon infekcija sa više različitih doza, ali takođe ukazuje na to da se mehanizmi koji doprinose virulenciji arhetipa I (ToxoDB#10) fundamentalno razlikuju od mehanizama kod arhetipova II i III (ToxoDB#1 i ToxoDB#2). Analiza prve generacije potomaka nakon ukrštanja virulentnog arhetipa I (ToxoDB#10) sa nisko virulentnim arhetipom III (ToxoDB#2) pokazala je tri različita fenotipa virulencije *in vivo* koji su definisani na sledeći način: akutna ili visoka virulencija, koju karakteriše 100% mortaliteta, srednja ili intermedijarna virulencija, sa visokim mortalitetom ali i preživljavanjem pojedinih životinja, i niska virulencija sa niskim mortalitetom i visokim procentom preživljavanja, (Su et al., 2002; Darde, 2008). Ista analiza nakon ukrštanja nisko virulentnih arhetipova II (ToxoDB#1) i III (ToxoDB#2) je pak pokazala većinski nisku virulenciju *in vivo*, kod 14 od 16 analiziranih potomaka, što je očekivano, ali i dva potomka visoke virulencije (Grigg et al., 2001). Rezultati ukazuju na multilokusnu regulaciju virulencije, ali i postojanje bifazičnih lokusa, što u evolutivnom kontekstu upućuje na rezultat rekombinacije samo dve ancestralne loze od kojih su potekle sve klonske loze i potvrđuje nalaze populacione genetike.

Za sada je identifikovano pet QTL (engl. *quantitative trait locus*), multigenskih regiona u genomu povezanih sa fenotipom virulencije, koji su označeni kao VIR1 (hromozom XII), VIR2 (hromozom X), VIR3 (hromozom VIIa), VIR4 (hromozom VIIb) i VIR5 (hromozom XII). Ovih pet QTL zajedno obuhvataju oko 1230 gena, što implicira postojanje diskretnih biomarkera ili regulatora virulencije, ali je interesantno da ne samo što je taj relativno mali broj gena potencijalno odgovoran za vrlo različite fenotipove, već i da se po dva VIR regiona nalaze na istom hromozomu (Su et al., 2002; Saeij et al., 2006). Geni kandidati sa najvećim potencijalom i kredibilitetom za biomarkere ili regulatore virulencije unutar QTL su ROP5 i SAG3 (VIR1), GRA35 (VIR2), ROP16 (VIR3) i ROP18 (VIR4), dok se pretpostavlja da je jedna od adenzin kinaza mogući kandidat u VIR5 (Saeij et al., 2006). Svi kandidati iz VIR1-4 su sekretorni proteini koji se luče iz apikalnog kompleksa tahizoita pre i u toku procesa invazije ćelije i formiranja parazitoforme vakuole, procesa ključnih za proliferaciju parazita i patogenezu kod domaćina (Saij et al., 2006; Sibley et al., 2009; Selleck et al., 2013). Sem signalne sekvence, proteine iz porodica ROP, GRA i SAG karakteriše visok polimorfizam i pozitivna selekcija, što uslovljava i visok nivo ekspresije u jednom od infektivnih životnih oblika parazita, iako je inaktivacija gena CRISPR metodom pokazala da većina, koja uključuje i gene kandidate, nije esencijalna za vijabilnost (Minot et al., 2012; Lorenzi et al., 2016; www.toxodb.org). Ovo znači da gotovo svi geni koji čine porodice sekretornih proteina ROP, GRA, MIC, SAG (engl. *surface antigen*) ili SRS (engl. *SAG related sequence*) mogu biti povezani sa virulencijom, bilo da se nalaze u okviru QTL regiona ili ne, što je i eksperimentalno utvrđeno za pojedine kao što su ROP17 (hromozom II) i GRA15 (hromozom X, izvan VIR2) (Tab. 2) (Rosowski et al., 2011; Gold et al., 2015; Lorenzi et al., 2016).

Eksperimentalno je pokazano je da se razmenom tri različita alela ROP18—ROP18<sub>I</sub> (1), ROP18<sub>II</sub> (2) i ROP18<sub>III</sub> (3)—prvobitno okarakterisanih kod arhetipova, postiže intenziviranje (1) ili smanjenje (2,3) *in vivo* virulencije, dok ROP5, koji kodira nefunkcionalnu pseudokinazu, alosterično reguliše katalitičku funkciju ROP18, u zavisnosti od tipa alela ROP5, kojih prema nekim nalazima ima 8, jer mnogi genotipovi poseduju više kopija ROP5 (Saeij et al., 2006; Khan et al., 2009; Behnke et al., 2012). Grupa alela prisutna kod arhetipova I (ToxoDB#10) i III (ToxoDB#2) povezana je sa višom virulencijom, dok je suprotno utvrđeno za alele prisutne kod arhetipa II (ToxoDB#1) (Etheridge et al., 2014; Shwab et al., 2016). Sinergistička aktivnost ROP18/ROP5 kod virulentnih genotipova pojačava stepen fosforilacije IRG proteina što blokira njihovu akumulaciju na parazitoformnoj vakuoli i štiti integritet vakuole, što i objašnjava visoku virulenciju kod miševa. Međutim, postoje i podaci da mogu da blokiraju pojedine članove GBP familije, kao što je Gbp1, što ukazuje na mogućnost učešća ROP18/ROP5 u regulaciji virulencije i kod čoveka (Hunter i Sibley, 2012; Behnke et al., 2012; Selleck et al., 2013). Imajući u vidu da svi aleli ROP18 kodiraju katalitički funkcionalne kinaze, utvrđeno je da je nivo ekspresije takođe

povezan sa virulencijom (Khan et al., 2009). Naime, dok je kodirajuća sekvenca vrlo slična, region izvan kodirajuće sekvence na 5' kraju se drastično razlikuje, tako što ROP18<sub>III</sub> poseduje jedinstvenu UPS (engl. *upstream sequence*) sekvencu od oko 2kb, koja nije prisutna kod ROP18<sub>I</sub> i ROP18<sub>II</sub>, a smatra se da je odgovorna za nizak nivo ili odsustvo ekspresije ROP18, dok je odsustvo UPS sekvence povezano sa visokim nivoom ekspresije (Khan et al., 2009). Pored uticaja na funkciju ROP18, ROP5 takođe reguliše kataličku funkciju ROP17 kinaze koja primarno reguliše permeabilnost membrana parazitoforme vakuole i tkivne ciste, što utiče na preživljavanje tahizoita i bradizoita (Etheridge et al., 2014; Paredes-Santos et al., 2019). Pokazano je da slično kao ROP18, i ROP17 može da blokira akumulaciju IRG proteina na parazitoformnoj vakuoli, te se smatra da je sinergistički efekat ROP5, ROP18 i ROP17 izuzetno snažna kontramera protiv IRG posredovanog uništenja parazitoformnih vakuola kod miša (Etheridge et al., 2014; Zhao i Yap, 2014).

Pokazano je da tip alela GRA15—GRA15<sub>V/III</sub> (1) i GRA15<sub>II</sub> (2)—antagonistički regulišu translokaciju NF- $\kappa$ B, što utiče na transkripciju gena koje indukuju TLR kaskade (Rosowski et al., 2011). Alel 1, koji je prisutan kod arhetipova I (ToxoDB#10) i III (ToxoDB#2) povezan je sa niskim nivoom translokacije dok je alel 2, koji je prisutan kod arhetipa II (ToxoDB#1), povezan sa visokim nivoom (Rosowski et al., 2011). Imajući u vidu da NF- $\kappa$ B kontroliše transkripciju IL-12, genotipovi sa alelom 1 slabije indukuju IFN- $\gamma$ , što objašnjava i slabiju indukciju mehanizama rezistencije za uništavanje tahizoita, i posledično intenzivniju proliferaciju *in vivo* u ranoj infekciji kao i povišenu virulenciju (Rosowski et al., 2011). ROP16, koji je uz GRA15 još jedan primer bifazičnog lokusa, vrši direktnu fosforilaciju STAT3, koji reguliše indukciju IL-12 zavisnu od CCR5 kaskade i signalizaciju posredovanu IL-10 kod MF, ali i STAT6, koji inače aktivira signalna kaskada posredovana IL-4/IL-13, glavnim citokinima koji karakterišu Th-2 tip ćelijskog imunskog odgovora (Ihle, 2001; Robben et al., 2004; Saeij et al., 2006; Leng et al., 2010; Butcher et al., 2011). Alel ROP16<sub>V/III</sub> (1) za razliku od ROP16<sub>II</sub> (2), fosforilacijom uslovljava konstitutivnu aktivaciju TF STAT3/6 i dovodi do smanjenja IL-12 produkcije kod MF, ali i do indukcije ARG1 (arginaze 1) koja je antagonist NOS2 (engl. *Nitric oxide synthase 2*), i vrši katalizaciju arginina (Tuladhar et al., 2019). Rezultat je smanjenje proinformatornih efekata u ranoj infekciji ali i polarizacija MF u alternativni, M2, fenotip povezan sa mehanizmima tolerancije i regeneracije tkiva (Butcher et al., 2011; Tuladhar et al., 2019). Interesantno je da indukcija ARG1 ima negativan efekat na proliferaciju parazita, jer je *T. gondii* auksotrof za arginin, a nedostatak arginina je utvrđen pozitivan signal za incistaciju, ali je moguće da je ovaj vid autokontrole proliferacije i ubrzane incistacije kod visoko virulentnih genotipova neophodan za omogućavanje transmisije (Fox et al., 2004; Jeffers et al., 2018).

Uz sekretorne proteine, pokazano je u nekim studijama da je i membranski protein (TgME49\_205490), koji je prvobitno identifikovan kao polimorfni marker koji se razlikuje kod tri arhetipa, CS3 (engl. *circumsporozoite protein 3*), takođe koristan za predikciju virulencije kod brazilskih genotipova, što upućuje na njegovu moguću prediktivnu vrednost i kod drugih genotipova (Khan et al., 2005; Pena et al., 2008; Silva et al., 2014; Fernandez-Escobar et al., 2020). Utvrđeno je da su aleli CS3<sub>I</sub> i CS3<sub>II</sub> većinski prisutni kod virulentnih, a alel CS3<sub>III</sub> kod nisko virulentnih sojeva (Khan et al., 2005; Pena et al., 2008; Silva et al., 2014; Silva et al., 2017). Ovaj marker je odnedavno uvršten u standardizovani režim za genotipizaciju (www.toxodb.org). Iako funkcija proteina koji kodira gen CS3 nije utvrđena, zbog lokacije u VIR4 regionu u neposrednoj blizini ROP18, postoje indicije za povezanost lokusa CS3 i ROP18, što je i moguće objašnjenje za povezanost CS3 sa virulencijom (Silva et al., 2014).

**Tabela 2.** Klasifikacija virulencije i identifikacija alela gena markera virulencije referentnih genotipova globalne populacione strukture *T. gondii*. Na osnovu dostupnih podataka, bilo je moguće određivanje samo dva fenotipa virulencije *in vivo* za referentne genotipove 15 HG. Za pojedine, kao što su HG12 (ToxoDB#5), HG14 (ToxoDB#16), HG8 (ToxoDB#19) i HG15 (ToxoDB#40), nisu utvrđeni aleli svih markera virulencije koji se najčešće koriste. Primeri lokusa sa bifazičnim alelima su ROP16 i GRA15.

Ref. genotip	Virulencija <i>in vivo</i>	ROP5	ROP18	ROP16	ROP17	GRA15	Geografska distribucija
Arhetip I, HG1, klada A	Virulentan	1	1	1	1	1	Globalna
Arhetip II, HG2, klada D	Ne-virulentan	2	2	2	2	2	Globalna
Arhetip III, HG3, klada C	Ne-virulentan	3	3	1	2	1	Globalna
Africa 1, HG6, klada A	Virulentan	3	1	1	1	1	Globalna
Loza IV, HG12, klada D	Ne-virulentan	2	2	2	-	2	Severna Amerika
China 1, HG13	Ne-virulentan	5	2	2	2	2	Kina
Africa 3, HG14, A	Virulentan	3	3	1	1	-	Afrika
BriV, HG4, B	Virulentan	4	4	1	4	1	Južna Amerika
Amazonian, HG5, F	Virulentan	6	4	1	3	1	Amazonija
Atipičan, HG7	Virulentan	1	4	1	1	1	Centralna/Južna Amerika
Bri, HG8, E	Virulentan	4	4	1	4	-	Južna Amerika
BrIII, HG9, E	Virulentan	3	3	1	4	1	Severna/Južna Amerika
Amazonian, HG10, F	Virulentan	6	4	1	3	1	Amazonija
Atipičan, HG11	Virulentan	5	2	2	3	2	Severna Amerika
Atipičan, HG15, F	Virulentan	3	4	1	4	-	Južna Amerika

Eksperimentalna saznanja o funkciji mnogih gena markera virulencije upućuju na to da se mehanizmi koji doprinose virulenciji većinski aktiviraju tokom litičnog ciklusa, što omogućava analizu intrinzične virulencije parazita *in vitro* u odgovarajućem ćelijskom modelu. Fenotip intrinzične virulencije se *in vitro* ispoljava gotovo odmah, dok se *in vivo* ispoljava virulencija u kontekstu mehanizama rezistencije i tolerancije različitih vrsta domaćina, što implicira mogućnost modulacije intrinzične virulencije i nesklad između *in vitro* i *in vivo* fenotipa u ponekim slučajevima (Darde, 2008). *In vitro* analiza arhetipa I (ToxoDB#10) pokazala je da su sa fenotipom akutne virulencije povezani brza invazije ćelija domaćina, visoka stopa proliferacije kao i visoka stopa smrtnosti inficiranih ćelija nakon egresa, dok je suprotno pokazano za nisko virulentan arhetip III (ToxoDB#2) (Saeij et al., 2005). Arhetip I (ToxoDB#10) kod miševa je *in vivo* demonstrirao veću motilnost i sposobnost za diseminaciju od arhetipova II (ToxoDB#1) i III (ToxoDB#2), što ukazuje i na efikasniji prodor kroz biološke barijere i u skladu je sa rezultatima dobijenim *in vitro* (Darde et al., 2008). Ali, takođe, arhetip I (ToxoDB#10) koji je letalan za većinu laboratorijskih sojeva miševa, nije letalan za *M. musculus castaneus* niti za pacove, što ističe značaj domaćina u kontekstu virulencije (Darde et al., 2008; Hassan et al., 2019). Važan primer takođe predstavljaju dva najčešće korišćena *inbred* soja laboratorijskih miševa različitih MHC haplotipova, C57B6 (H-2<sup>b</sup>) koji su osetljivi, i BALB/c (H-2<sup>d</sup>) koji su relativno rezistentni na infekciju nisko virulentnim genotipom ToxoDB#1 (Tsitsiklis et al., 2016). Naime, zbog razlika u MHC haplotipu, C57B6 soj nije u mogućnosti da prezentuje određen imunodominantan epitop GRA6 CD8<sup>+</sup> limfocitima, što dovodi do sniženog kvaliteta zaštitnog efekta posredovanog tim ćelijama, te infekcija nije dobro kontrolisana i dolazi do razvoja patologije, najčešće encefalitisa, te smrtnog ishoda jedinki inficiranih čak i niskim dozama tahizoita (Tsitsiklis et al., 2019).

Suprotno ovome, BALB/c dugoročno preživljavaju infekciju visokim dozama parazita istog genotipa. Domaće kokoške, *G. gallus domesticus*, koje su značajne kao bioindikator za kontaminiranost sredine oocistama, izuzetno su rezistentne na posledice infekcije čak i visoko

virulentnim genotipovima, te zapravo predstavljaju domaćina iz kojeg je izolovano najviše sojeva u južnoj Americi (Dubey et al., 1993 i 2020). Na osnovu ovih primera jasno je da je širok spektar prelaznih domaćina taj koji omogućava evolutivno održavanje visoko virulentnih genotipova *T. gondii*, dok je širenje intermedijarno virulentnih genotipova dodatno potstaknuto selekcijom jedinki unutar iste vrste koju vrši parazit po osnovu preživljavanja infekcije (Kennard et al., 2021). Imajući u vidu da je frekvencija rekombinacije genoma izuzetno niska, a da se virulencija uprkos tome uspešno evolutivno održava, čini se da virulencija trpi pozitivnu selekciju, što i jeste slučaj za većinu potencijalnih gena markera virulencije, ali i da se intermedijarna ili čak visoka virulencija može očekivati i kod izvesnog broja potomaka rekombinacije različitih nisko virulentnih genotipova, što je i pokazano (Grigg et al., 2001; Minot et al., 2012; Kennard et al., 2021). Iako se vremenom atenuira kao rezultat ko-evolucije sa domaćinima, potreba za održavanjem virulencije, koja je vrlo verovatno drevna odlika vrste *T. gondii*, može se razumeti upravo u kontekstu evolucije homeotermnih vrsta, kao težnja ka širenju spektra prelaznih domaćina radi opstanka, što je nedavno pokazano na primeru južnih morskih vidri i HG12 (Kennard et al., 2021).



## Naučna osnova disertacije

Rezultati istraživanja iz oblasti populacione genetike u Evropi pokazali su visoku frekvenciju arhetipa loze II (ToxoDB#1), nešto nižu frekvenciju arhetipa loze III (ToxoDB#2) i nisku frekvenciju varijantnih genotipova obe loze (Peyron et al., 2006; DeCraye et al., 2011; Su et al., 2012; Hermann et al., 2012; Can et al., 2014; Vilares et al., 2014; Marković et al., 2014; Calero-Bernal et al., 2015; Vilares et al., 2017; Kuruca et al., 2019; Fernandez-Escobar et al., 2020). Arhetip loze I (ToxoDB#10) kao i varijantni genotipovi ove loze su izuzetno retki, sa svega nekoliko primera (Ajzenberg et al., 2009; Turčekova et al., 2014, Calero-Bernal et al., 2015). Na osnovu ovih podataka, diverzitet populacije genotipova je nizak. Interesantno je da se nizak diverzitet povezuje globalno sa genotipovima *T. gondii* izolovanim ili detektovanim kod ljudi i domaćih životinja, dok je diverzitet kod divljih životinja viši (Turčekova et al., Jiang et al., 2018). Primećeno je sem toga da je diverzitet genotipova kod svih domaćina koji žive u antropogenim sredinama niži u odnosu na diverzitet genotipova kod domaćina u divljim sredinama, što implicira da samo prisustvo čoveka u životnoj sredini negativno utiče na diverzitet vrste *T. gondii* (Lehmann et al., 2006; Jiang et al., 2018; Schwab et al., 2018; Galal et al., 2019; Uzelac et al., 2019).

Selekcija genotipova koji dominiraju u antropogenim sredinama nije nasumična, već su to nisko virulentni genotipovi, što i objašnjava najčešće blagu kliničku sliku toksoplazmoze u ovim sredinama. Nasuprot tome, intermedijarno virulentni pa čak i visoko virulentni genotipovi su frekventniji u južnoj Americi, te su kod ljudi, pogotovo onih koji žive na obodima antropogenih sredina, daleko učestalije teže kliničke slike i patološke posledice toksoplazmoze (Demar et al., 2007; Carme et al., 2009, Mercier et al., 2011; Simon et al., 2019). Takođe je pokazano i da haplotip 12 ili tip X, loza genotipova koja kruži u divljoj sredini u severnoj Americi, izaziva teže kliničke slike i patologiju kod ljudi (Schumacher et al., 2020; Kennard et al., 2021). Akumulacija nisko ili intermedijarno virulentnih genotipova u odnosu na visoko virulentne generalna je posledica koevolucije parazita i domaćina, ali je kod *T. gondii*, koja inficira sve homeotermne vrste, fenotip virulencije vrlo relativan u odnosu na vrstu domaćina. Uprkos ovome, eksperimentalno se pokazalo da su laboratorijski miševi, bilo *inbred* ili *outbred*, dobri indikatori za virulenciju genotipova *T. gondii*, jer je i kućni miš, *M. musculus*, kao i sve njegove podvrste, iz kojih su i izvedeni laboratorijski sojevi, važan prirodni rezervoar ovog parazita (Tenter et al., 2000; Hassan et al., 2018).

Značajno je pomenuti da se kod različitih sojeva laboratorijskih miševa i podvrsta *M. musculus*, relativna osetljivost ili rezistencija na infekciju razlikuje, što ne podrazumeva promenu intrinzične virulencije genotipa parazita od strane domaćina, već modulatorni efekat koji proizlazi iz konstitucije imunskog sistema domaćina (Hassan et al., 2018; Tsitsiklis et al., 2019). Na primeru laboratorijskih miševa je pokazano da je arhetip loze I (ToxoDB#10) visoko virulentan, arhetip loze II (ToxoDB#1) intermedijarno virulentan i arhetip loze III (ToxoDB#2) nisko virulentan (Sibley i Boothroyd, 1992; Darde et al., 2008; Khan et al., 2009). U eksperimentalnim *in vivo* modelima se virulencija procenjuje dozno zavisno, sa samo jednim od tri infektivna životna oblika parazita i na osnovu kumulativne smrtnosti kao jedinog parametra, što uzima u obzir i prevazilazi modulatorni efekat domaćina, ali ne dozvoljava uvid u mehanizme koji doprinose virulenciji (Saraf et al., 2017). Eksperimentalna saznanja o virulenciji arhetipova impliciraju postojanje genske komponente virulencije, što je i usmerilo istraživanja ka otkrivanju gena markera virulencije, a samim tim i biohemijskih puteva i procesa u kojima učestvuju produkti tih gena, koji mogu biti deo mehanizama koji doprinose virulenciji.

Uprkos uspešnoj identifikaciji čak 5 QTL regiona povezana sa virulencijom kod visoko virulentnog arhetipa I (ToxoDB#10), kao i mnogih gena kandidata, koji većinski kodiraju

sekretorne proteine, za vrlo mali broj je do sad pokazana značajna prediktivna vrednost (Saeij et al., 2005; Saeij et al., 2006; Shwab et al., 2016). Uz to, arhetipovi, koji su najčešće korišćeni genotipovi parazita u različitim eksperimentalnim modelima, predstavljaju sasvim mali deo diverziteta vrste *T. gondii*. Arhetipovi su specifični jer je u njihovim genomima na mnogim lokusima zastupljen samo po jedan tip alela, 1, 2 ili 3 u zavisnosti od loze, dok su svi ostali za sada identifikovani i priznati genotipovi, kojih ima oko 300, varijantni ili rekombinantni, što podrazumeva različite tipove alela na različitim lokusima uključujući i nisko frekventne alele u-1, u-2, i u-3 koji uopšte nisu zastupljeni kod arhetipova ([www.toxodb.org](http://www.toxodb.org)). Imajući u vidu da *T. gondii* može gotovo večno da se propagira aseksualno u svim domaćinima, a da je rekombinacija genoma prilikom mejoze izuzetno retka i dešava se samo u enterocitima definitivnih domaćina, *Felidae*, u slučajevima ko-infekcije različitim genotipovima, činjenica da trenutno poznatu globalnu populacionu strukturu vrste čine loze srodnih genotipova, ili takozvane "klonske" loze, nije iznenađujuća, kao što nije ni postojanje bifazičnih lokusa (Ayala, 1998; Grigg et al., 2001; Su et al., 2002; Tibayrenc i Ayala, 2002; Grigg i Suzuki, 2003).

Zbog ovih odlika, gotovo je nemoguće proceniti virulenciju varijantnih ili rekombinantnih genotipova samo na osnovu analize genske komponente virulencije, te je *in vivo* utvrđivanje virulencije na laboratorijskim miševima nužno (Su et al., 2002; Saraf et al., 2017). Zbog opisane modulacije virulencije od strane domaćina, intrinzičnu virulenciju genotipova moguće je proceniti samo u odsustvu komponenti imunskog sistema, što je odlika nekih mišjih modela, modifikacijom imunskog odgovora specifičnom intervencijom ili *in vitro*. Imajući u vidu da sva tri životna oblika *T. gondii* inficiraju sve nukleisane ćelije, a incistirani oblici, bradizoiti i sporozoiti, imaju kapacitet konverzije u tahizoite, jedini ne-incistirani oblik, *in vitro* kultivacija *T. gondii* moguća je u različitim ćelijskim linijama (Dubey, 1998). *In vitro* se pokazalo da je razlika u intrinzičnoj virulenciji arhetipova u skladu sa *in vivo* nalazima, a da su među odlikama koje arhetip I (ToxoDB#10) čine visoko virulentnim brzina invazije ćelije domaćina, stopa proliferacije u parazitoformnim vakuolama kao i smrtnost ćelija domaćina kao posledica egresa tahizoita, koja se ogleda u broju plakova u ćelijskom pokrivaču (Saeij et al., 2005). Uz ove parametre, arhetip I (ToxoDB#10) se od arhetipova II i III (ToxoDB#1, ToxoDB#2) dodatno razlikuje po osnovu smanjene tendencije za konverziju u sporodeleće bradizoite, što *in vivo* doprinosi konačnom smrtnom ishodu infekcije kod većine laboratorijskih sojeva miševa ubrzo nakon inokulacije. Konverzija tahizoita u bradizoite podrazumeva između ostalog i promene na nivou transkripcije, koje je moguće analizirati *in vitro* i *in vivo* (Dubey et al., 1998; Dzierzinski et al., 2011; Jeffers et al., 2018; Augusto et al., 2019).

Kombinacijom *in vivo* i *in vitro* pristupa se dobija daleko širi uvid u mehanizme koji doprinose virulenciji, što je od značaja ne samo za identifikaciju uzroka patologije kod pojedinih domaćina, već i ključnih interakcija parazita i domaćina koji predstavljaju potencijalna mesta intervencije u cilju sprečavanja težih oblika bolesti. Uprkos činjenici da je *T. gondii* model organizam koji se dugo godina eksperimentalno proučava i o čijim se biološkim karakteristikama izuzetno mnogo zna, toksoplazmoza je i dalje neizlečiva, epidemiološka kontrola širenja infekcije je gotovo nemoguća ili nepraktična, a vakcina, osim jedne kratkoživeće i ograničene efektivnosti namenjene ovčama, nije dostupna (Buxton i Innes, 1995; Innes et al., 2009). Iako je kod ljudi svega 10-20 % infekcija simptomatsko i dominiraju blaži oblici bolesti, slučajevi težih kliničkih slika i daleko ozbiljnije patologije, čak i smrtnih ishoda, govore o tome da je spektar virulencije parazita dosta širok (Remington, 1974; Weiss i Dubey, 2009; Demar et al., 2007; Carme et al., 2009; Schumacher et al., 2020). Geografski regioni poput centralne Amerike i Mediteranskog basena su izuzetno podobni u kontekstu razmene genotipova sa različitim kontinenta, jer predstavljaju kopnenu vezu južne i severne hemisfere, na kojima cirkulišu genotipovi različitih loza. Prodor virulentnih genotipova u sredine u kojima dominiraju nisko virulentni je stoga uvek moguć, a značajno je da sporulisane oociste, koje imaju izuzetno hemijski i fizički rezistentnu biološku membranu radi zaštite sporozoit, dugo ostaju vijabilne u zemljištu i vodi i imaju epidemijski potencijal za širenje parazita (Freppel et al., 2020). U Mediteranskom delu Turske

već su izolovani genotipovi srodni lozi *Africa 1*, a nalaz atipičnog genotipa u Srbiji pre nekoliko godina, koji je prema dužinama mikrosatelita vrlo sličan *Africa 1* lozi, moguća je indicija za prisustvo genotipova poreklom iz Afrike i u Srbiji (Döşkaya et al., 2013; Štajner et al., 2013). Značajno je da je eksperimentalno pokazano da su genotipovi loza *Africa 1* i *Africa 3* virulentni (Mercier et al., 2011). Prevalenca toksoplazmoze kod ljudi u Srbiji se procenjuje na 30-35 %, što je i u skladu sa procenjenom globalnom prevalencom, te je utvrđivanje populacione strukture i ispitivanje virulencije genotipova koji kruže u domaćoj i silvatičnoj sredini u Srbiji, neophodno (Montoya i Liesenfeld, 2004; Bobić et al., 2007; Bigna et al., 2020).

## Cilj disertacije

Ciljevi ove disertacije bili su: 1) identifikacija populacione strukture parazita *T. gondii* kod prelaznih domaćina iz domaće i divlje sredine u Srbiji, kao i 2) biološka karakterizacija, 3) utvrđivanje virulencije i 4) identifikacija mogućih mehanizama virulencije genotipova koji kruže u Srbiji.

Da bi ciljevi bili postignuti, izvršeni su sledeći zadaci:

Za postizanje cilja (1) rađena je genotipizacija sojeva iz različitih ljudskih i životinjskih uzoraka primenom MnPCR-RFLP metode, i izvršena identifikacija pripadnosti određenoj lozi.

Ostali ciljevi su postignuti kombinacijom *in vitro* i *in vivo* pristupa na primeru sojeva koji predstavljaju pet različitih genotipa, jedan arhetip loze II, izolovan iz ljudske krvi, i četiri međusobno različita varijantna genotipa loze II, izolovani iz životinjskih tkiva. Biološka karakterizacija (2) obuhvatila je ispitivanje kinetike invazije, stope proliferacije i litičnog kapaciteta *in vitro*, u modelu infekcije VERO ćelija. Virulencija (3) je određena *in vivo* u modelu infekcije miševa Swiss Webster soja, na osnovu kumulativne smrtnosti i utvrđivanja LD<sub>50</sub>, vremena preživljavanja i parametara morbiditeta (brojnost i promer tkivnih cista) (4). Sem toga, analiziran je profil citokina IL-12, IFN- $\gamma$  i IL-10 u mozgu i slezini miševa u ranoj i kasnoj infekciji utvrđivanjem relativne ekspresije, utvrđen je nivo specifičnih IgG antitela u kasnoj infekciji kao i ekspresija IFN- $\gamma$  u re-stimulisanim perifernim limfocitima (4). Konačno, ispitana je efikasnost imunske zaštite od letalnog ishoda nakon re-infekcije visoko virulentnim arhetipom I (ToxoDB#10), a kod preživelih životinja je takođe analiziran profil citokina i utvrđen nivo specifičnih IgG antitela 30 dana nakon re-infekcije (4).

# Materijali i metode

## 1. Materijali

### 1.1 Uzorci tkiva srca divljih kanida: zlatnih šakala (*Canis aureus*), lisica (*Vulpes vulpes*) i sivih vukova (*Canis lupus*)

Analizirani su uzorci tkiva srca divljih kanida legalno odstreljenih u periodu između 2013. i 2016. godine. Ukupan broj uzoraka je bio 110, od kojih je 72 poticalo od zlatnih šakala (*C. aureus*), 28 od lisica (*V. vulpes*) i 10 od sivih vukova (*C. lupus*). Tkiva su na terenu zamrznuta u 70% etanolu i hladan lanac je očuvan do transporta u laboratoriju gde su tkiva skladištena na temperaturi od -80°C.

### 1.2 Sojevi parazita *T. gondii*

Eksperimentalno su analizirana četiri soja: G13, EQ39, EQ40 i K1. Soj G13 je izolovan iz srca gradskog goluba u Beogradu 2013. godine (Marković et al., 2014), zatim su sojevi EQ39 i EQ40 izolovani iz srca konja poreklom iz zapadne Srbije namenjenih za ljudsku ishranu 2016. godine (Klun et al., 2017), dok je soj K1 je izolovan iz srca domaće slobodnoživeće kokoške poreklom iz beogradske opštine Surčin 2017. godine (Uzelac et al., 2019 i 2020). Sojevi koji su upotrebljeni kao kontrolni su nisko virulentan soj BGD18, izolovan 2016. godine u Beogradu, arhetip loze II ili ToxoDB#1 kao i RH, izolovan 1947. godine u Severnoj Americi, koji je primer najvirulentnijeg do sada poznatog genotipa, arhetipa loze I ili ToxoDB#10.

Svi sojevi su izolovani u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za toksoplazmozu u Institutu za medicinska istraživanja.

### 1.3 Swiss Webster laboratorijski miševi

Swiss Webster su albino *outbred* laboratorijski miševi koji su često korišćen eksperimentalni model infekcije *T. gondii*. Swiss Webster miševi preživljavaju infekcije relativno visokim dozama parazita *T. gondii*, u odnosu na druge često korišćene vrste *outbred* (CD1) kao i sojeve *inbred* miševa (C57B6), što je jedan od glavnih razloga za njihovu upotrebu kod izolacije kao i propagacije i održavanja sojeva parazita *in vivo*. Swiss Webster miševi koji su korišćeni za ove eksperimente su nabavljani sa Vojnomedicinske akademije, a držani u vivarijumu Instituta za medicinska istraživanja. Miševi su nakon transporta prebačeni u kaveze namenjene za 20 životinja, u kojima su boravili tokom aklimatizacionog perioda od trajanju od najmanje 7 dana, sa hranom i vodom dostupnom *ad libitum*, pre nego što su korišćeni u eksperimentalne svrhe. Za vreme trajanja aklimatizacije kao i eksperimenata, miševi su bili izloženi prirodnom svetlosnom ciklusu. Tokom eksperimenata, boravili su u kavezima namenjenim za 5 životinja, hrana i voda je bila dostupna *ad libitum*, a šuška je menjena i kavezi čišćeni tri puta nedeljno.

#### *1.3.1 Etička odobrenja za upotrebu laboratorijskih miševima u eksperimentalne i dijagnostičke svrhe*

Sve eksperimentalne procedure sa laboratorijskim miševima su odobrene od strane etičke komisije na Institutu za medicinska istraživanja kao i nadležnog ministarstva: trajno odobrenje za izolaciju biološkim ogledom kao i propagaciju i održavanje cistogenih sojeva *in vitro* O245-1 (19.9.2014.), trajno odobrenje za propagaciju RH soja *in vivo* kao i pripremu antigena za dijagnostičke testove O245-2 (19.9.2014.), odobrenje za reinfekciju (engl. *challenge*) hronično inficiranih miševa O161 (10.7.2019.), odobrenje za testiranje virulencije sojeva *T. gondii in vivo* testom preživljavanja O164 (10.7.2019.).

## 2. Metode

### 2.1 Izolacija sojeva biološkim ogledom u Swiss Webster miševima

Izolacija sojeva iz ljudske krvi i životinjskih tkiva je rađena biološkim ogledom u ženka Swiss Webster miševa. Za izolaciju soja BGD18, oko 1 ml pune krvi dobijene na porođaju iz pupčanika novorođenčeta sa kongenitalnom toksoplazmozom je dodat rastvor gentamicina (Galenika, Beograd, Srbija) kojim se postiže doza od 1,8 mg/kg, a zatim je po 500 µl suspenzije inokulisano intraperitonealno insulinskim špricem i iglom od 18 G u dve Swiss Webster ženke težine od oko 20 g. Za izolaciju soja K1, apeks kokošijeg srca veličine oko 2 cm<sup>3</sup> odstranjen je sterilnim hirurškim skalpelom i isečen na manje delove. Parčići tkiva su uz dodatak 1 ml fiziološkog rastvora (Hemofarm AD, Vršac, Srbija) prebačeni u 2 mikrotubice zapremine od 2 ml u kojima su se nalazile keramičke kuglice prečnika 1.4 mm (Omni International, Kenesov, Džordžija, SAD) i procesuirani u Bead Ruptor instrumentu (Omni International, Kenesov, Džordžija, SAD) za mehaničku homogenizaciju sa tri ciklusa od po 30 sek na maksimalnoj brzini. Suspenzija je prebačena u mikrotubice od 1.5 ml i kratko centrifugirana da bi se prikupili veći parčići tkiva, a supernatant je prebačen u sterilnu epruvetu od 4 ml. Dobijenoj suspenziji je dodat rastvor gentamicina (Galenika, Beograd, Srbija) i po 500 µl je inokulisano u četiri Swiss Webster ženke kao što je prethodno opisano. Nakon šest nedelja, miševi su žrtvovani radi utvrđivanja prisustva parazitskih cista u mozgu kao i održavanja i propagacije soja po metodologiji opisanoj ispod (2.2.1). Izolacija soja G13 je opisana u Marković et al. (2013), dok je izolacija sojeva EQ39 i EQ40 opisana u Klun et al. (2017).

### 2.2 Održavanje i propagacija sojeva *T. gondii* in vivo

#### 2.2.1 Održavanje i propagacija cistogenih sojeva

Ženke Swiss-Webster miševa inficirane cistogenim sojevima su nakon 3 do 6 meseci žrtvovane cervikalnom dislokacijom. Mozak žrtvovanih životinja je izolovan, ispran fiziološkim rastvorom i zatim prebačen u sterilne epruvete zapremine od 4 ml uz dodatak 1ml fiziološkog rastvora. Suspenzija mozga je pripremljena provlačenjem tkiva kroz hipodermalnu iglu od 18 G na insulinskom špricu do postizanja homogenizacije. Četiri kapi od po 25 µl homogenata je stavljeno na mikroskopske pločice, koje su pregledane radi određivanja broja tkivnih cista. Ukupan broj je dobijen množenjem zbira tkivnih cista sa sva četiri preparata sa 10. Suspenzija za propagaciju sojeva sadržala je od 3 do 10 tkivnih cista po mišu u fiziološkom rastvoru ukupne zapremine od 500 µl, i data je peroralnom gavažom zdravim ženka Swiss-Webster miševa.

#### 2.2.2 Održavanje i propagacija soja RH

Ženke Swiss-Webster miševa inficirane RH sojem su žrtvovane kao što je prethodno opisano tri dana nakon infekcije. Krzno je sterilisano 70% etanolom, zatim je hirurškim makazama vertikalno isečena koža od abdomena do toraksa, razdvojena hirurškim pincetama i fiksirana sa obe strane životinje radi pristupa peritoneumu. Peritoneum je ispiran injekcijom 1 ml fiziološkog rastvora iglom od 18 G na špricu od 5 ml, a zatim je suspenzija izvučena. U intraperitonealnoj suspenziji se nalaze slobodni tahizoiti soja RH, kao i inficirane i neinficirane imunske ćelije. Radi određivanja koncentracije vijabilnih tahizoita, odvojeno je 20 µl suspenzije kojoj je dodata ista zapremina *Trypan blue* rastvora (ThermoFisher Scientific, Voltham, Massachusetts, SAD), a zatim je prebačena u Bürker-Türk komoru u kojoj su tahizoiti prebrojavani, i određivana koncentracija po ml suspenzije. Infektivna smeša za propagaciju soja sadržala je  $2 \times 10^6$  tahizoita, 1.8 mg/kg rastvora gentamicina i fiziološki rastvor u zapremini od ukupno 500 µl koja je inokulisana intraperitonealno insulinskim špricem i iglom naivnim Swiss-Webster miševima. Za reinfekcije hronično inficiranih miševa pripremana je infektivna doza od 100 tahizoita RH

soja serijskim razblaženjima peritonealne suspenzije, dok je infektivna smeša bila ista kao i za propagaciju soja.

### 2.3 Kultura VERO ćelija i propagacija tahizoita in vitro

#### *2.3.1 Održavanje i propagacija kultura VERO ćelija*

VERO ćelije su održavane i propagirane u flaskovima T25 i T75 za adherentne ćelije u *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) medijumu sa visokom koncentracijom glukoze, (engl. *Hi-glucose*) (Thermofisher Scientific, Voltham Masačusets, SAD) suplementiranim sa 10% telećeg seruma, (Sigma-Aldrich, St. Luis, Mizuri, SAD), rastvorom 1 jedinice/ml penicilina i 0,5 jedinica/ml streptomicina (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA), rastvorom 2mM/ml L-glutamina (Thermofisher Scientific, Voltham, Masačusets, SAD) i 10mM/ml HEPES pufera (Thermofisher Scientific, Voltham, Masačusets, SAD). Inicijalna koncentracija ćelija koje su inokulisane u T25 flaskove iznosila je  $0,7 \times 10^6$  ćelija ili  $2,1 \times 10^6$  za T75, što predstavlja 25% konfluentnosti. Pasaža ćelija je obavljena po postizanju 100% konfluentnosti, što je 3 do 5 dana nakon inkubacije na 37°C u atmosferi koja sadrži 5% CO<sub>2</sub>. Nakon odbacivanja medijuma, ćelijama je dodavano 3 do 5 ml 0.6 mM EDTA rastvora i inkubirane su na 37°C u trajanju od 5 do 7 min da bi se odvojile od zidova flaska. Zatim je suspenzija prikupljena u sterilne epruvete zapremine 10 ml i centrifugirana na brzini od 280 g 5 min. Tečni deo suspenzije je odbacivan, a ćelije su ispirane rastvorom *Dulbecco Phosphate Buffered Saline* (DPBS) (Thermofisher Scientific, Voltham, Masačusets, SAD) koji ne sadrži jone kalcijuma i magnezijuma. Posle još jednog (istovetnog) centrifugiranja, ćelije su inokulisane u odnosu 1:4 u odgovarajuće flaskove koji su zatim inkubirani.

#### *2.3.2 Propagacija tahizoita in vitro u VERO ćelijama*

Ćelije koje se pripremaju za propagaciju tahizoita su inokulisane u DMEM medijum koji sadrži 2% telećeg seruma uz dodatak ostalih prethodno opisanih suplemenata. Nakon postizanja 40-50% konfluentnosti, ćelije su inficirane tahizoitima, a zatim inkubirane na 37°C sa atmosferom koja sadrži 5% CO<sub>2</sub>. Pasaže tahizoita su obavljane u intervalima od 5 do 10 dana, u zavisnosti od brzine proliferacije individualnih sojeva. Za pasažu, ćelije su strugane sa zidova flaskova direktno u medijum, zatim je suspenzija centrifugirana pri brzini od 280 g 5 min. Tečni deo suspenzije je odbacivan, dodavan je 1 ml DPBS rastvora i suspenzija je provlačena kroz insulinsku iglu i špic nekoliko puta radi oslobađanja intraćelijskih tahizoita. Suspenzija je konačno inokulisana u pripremljene kulture VERO ćelija.

#### *2.3.3 Zamrzavanje VERO ćelija i tahizoita*

VERO ćelije i tahizoiti su zamrzavani u rastvoru koji sadrži 90% telećeg seruma i 10% DMSO (Sigma-Aldrich, St. Luis, Mizuri, SAD). Minimalna koncentracija VERO ćelija koja obezbeđuje visoku vijabilnost (>90%) iznosila je od  $10^5$  ćelija/ml, dok je minimalna koncentracija tahizoita  $10^7$ /ml. Postepeno zamrzavanje na -80°C je postignuto korišćenjem *Mr. Frosty* komore (Thermofisher Scientific, Voltham, Masačusets, SAD), a nakon stabilizacije na minimalnoj temperaturi, uzorci su prebacivani u tečni azot za dugoročno čuvanje. Odmrzavanje je vršeno kratkoročnom inkubacijom na 37°C u trajanju od 1 do 2 min, zatim dodavanjem do 1 ml prethodno zagrejanog DMEM medijuma direktno u uzorak. Nakon toga, uzorci su prebacivani u sterilne epruvete od 10 ml, dodato je 5 ml DMEM medijuma i centrifugirani su na 280 g 5 min. Tečni deo suspenzije je odbacivan nakon centrifugiranja, a talog je inokulisana u pripremljene flaskove (u slučaju VERO ćelija) ili VERO ćelijske kulture (u slučaju tahizoita).

### 2.4 Konverzija bradizoita u tahizoite in vivo i umnožavanje tahizoita in vitro u VERO ćelijama

Za konverziju bradizoita iz tkivnih cista u tahizoite korišćena je kombinacija prethodno opisanih metoda. Swiss-Webster miševi inficirani ispitivanim sojevima najmanje 3 do 6 meseci ranije žrtvovani su radi izolacije mozga i pripremanja homogenata. Ukupan broj tkivnih cista je

određen kao što je prethodno opisano radi pripreme infektivne smeše za konverziju koja sadrži 5 tkivnih cista po životinji, rastvor gentamicina (1,8 mg/kg) i fiziološki rastvor u ukupnoj zapremini od 500  $\mu$ l. Infektivna smeša je zatim inokulisana intraperitonealno u naivne miševе, koji su žrtvovani dana nakon infekcije radi izolacije peritonealnog eksudata kao što je već opisano. Izolovana suspenzija je centrifugirana na 280 g 5 min, tečni deo suspenzije je odbacivan, a talog rastvoren u 200  $\mu$ l pripremljenog DMEM medijuma sa 2% telećeg seruma. Suspenzija je inokulisana u pripremljene kulture VERO ćelija od 40-50% konfluentnosti i zatim inkubirana na temperaturi od 37°C, sa atmosferom od 5% CO<sub>2</sub>. Nakon 4 do 6 dana, ćelije su odvojene od flaska direktno u medijum strugačem za ćelije, a zatim centrifugirane na 280 g 5 min. Nakon centrifugiranja, medijum je odbacivan, a ćelije su rastvarane sa 1 ml DPBS-a. Suspenzija je provlačena kroz insulinsku iglu i špric više puta radi oslobađanja intracelularnih tahizoita. Nakon toga, uzet je uzorak od 20  $\mu$ l za brojanje vijabilnih tahizoita na isti način kao što je prethodno opisano (2.2.2). Tahizoiti su dalje korišćeni u eksperimentalne svrhe ili su zamrzavani.

## 2.5 Analiza fenotipa tahizoita in vitro

### *2.5.1 Kinetika invazije*

VERO ćelije su inokulisane u individualne bunare ploče sa 24 bunara (50,000 ćelija po bunaru) u 1 ml DMEM medijuma sa 2% telećeg seruma, a zatim inkubirane na 37°C sa atmosferom od 5% CO<sub>2</sub> najmanje 2 h radi adherencije. Ćelije su zatim inficirane tahizoitima sojeva G13, EQ39, EQ40, K1 i BGD18 u odnosu od 1 tahizoita na 10 ćelija. Tri bunara su inficirana svakim pojedinačnim sojem (tehnički replikati). Invazija tahizoita u ćelije je praćena vizuelno na invertnom DM IL LED mikroskopu (Leica Microsystems, Veclar, Nemačka) tako što je pregledano do 200 ćelija po bunaru na svakih 30 min do maksimalno 3 h nakon infekcije. Ploča sa kulturama je pažljivo vraćana u inkubator nakon provere uz oprez da se ne poremete interakcije tahizoita sa ćelijama usled prekomernog mešanja medijuma. Vreme pojave intracelularnih tahizoita kod svakog soja je beleženo. Eksperiment je ponovljen tri puta (biološki replikati).

### *2.5.2 Utvrđivanje stope proliferacije*

Kulture VERO ćelija u ploči od 24 bunara su inficirane tahizoitima ispitivanih sojeva kao što je prethodno opisano (2.3.2). Nakon inkubacije u trajanju od 3 h, ekstracelularni tahizoiti su odstranjeni tako što je medijum odbačen, svaki bunar ispran sa 1 ml DPBS rastvora, a zatim je dodat svež medijum i kulture su vraćene u inkubator. 24 h nakon infekcije, pregledano je od 400 do 600 ćelija po soju, zabeležen je broj inficiranih ćelija kao i broj parazitskih vakuola unutar individualnih ćelija, a zatim su kulture vraćane u inkubator. 48 h nakon infekcije, od 30 do 50 parazitskih vakuola je pregledano i zabeležen je broj vakuola u ćeliji kao i broj tahizoita unutar svake vakuole. Eksperiment je ponovljen šest puta (biološki replikati). Broj deoba tahizoita nakon 48 h je procenjen kao log<sub>2</sub> ukupnog broja parazita u vakuoli.

### *2.5.3 Analiza egresa parazita-kvantifikacija plakova u ćelijskoj kulturi*

VERO ćelije su inokulisane u ploči od 24 bunara kao što je prethodno opisano (2.5.2). Nakon postizanja 100% konfluentnosti, što je do 3 dana nakon inokulacije, ćelije su inficirane tahizoitima ispitivanih sojeva u odnosu od 1 tahizoita na 5 ćelija. Kulture su inkubirane kao što je prethodno opisano u trajanju od 5 dana, zatim je medijum pažljivo odstranjen, svaki bunar ispran DPBS rastvorom i dodat je 1 ml svežeg medijuma. Nakon dodatnih 5 dana inkubacije, ploče su izvađene iz inkubatora, medijum je pažljivo odstranjen, a zatim je u svaki bunar dodat 1 ml rastvora paraformaldehida (PFA) od 4% (Sigma-Aldrich, St. Luis, Mizuri, SAD). Ploče su ostavljane na sobnoj temperaturi 30 min radi fiksiranja ćelija i tahizoita. Nakon 30 min, PFA rastvor je odstranjen iz bunara, a zatim su bunari ispirani pod mlazom dejonizovane vode nekoliko sekundi. Ploča je nakon ispiranja okretana naopako i ostavljena do 3 min da bi se



bunari ocedili. U svaki bunar je zatim dodato 0,5 ml rastvora boje *crystal violet* (Sigma-Aldrich, St. Luis, Mizuri, SAD) od 1% i ploča je ostavljena na sobnoj temperaturi od 10 do 15 min da bi se obojio ćelijski sloj. Nakon toga, *crystal violet* rastvor je pažljivo odstranjen iz svakog bunara, a ostatak boje je ispran pod mlazom dejonizovane vode. Ploča je nakon ispiranja okrenuta naopako i ostavljena da se kompletno osuši. Plakovi su brojani na invertnom DM IL LED mikroskopu (Leica Microsystems, Veclar, Nemačka) u svakom pojedinačnom bunaru. Broj plakova je prikazan kao ukupan broj iz sva tri bunara, a eksperiment je ponovljen dva puta (biološki replikati) radi statističke obrade.

## 2.6 Ekstrakcija nukleinskih kiselina

### *2.6.1 Priprema suspenzije tkiva srca divljih kanida i mišijih organa*

Uzorci zamrznutih srca divljih kanida su nakon odmrzavanja prvo ispirani sterilnim fiziološkim rastvorom (Hemofarm AD, Vršac, Srbija), zatim su hirurškim makazama isečeni na komade veličine 1 cm X 1 cm i prebačeni u mikrotubice zapremine 2 ml sa dodatkom 1 ml Trizol reagensa (Invitrogen, Karlsbad, Kalifornija, SAD) i keramičkih kuglica prečnika 1.4 mm koje zauzimaju oko 30% njene zapremine. Suspenzije tkiva su dobijene nakon mehaničke homogenizacije sa dva do tri ciklusa u trajanju od 45 sek na maksimalnoj brzini u Bead Ruptor instrumentu. Uzorci su zamrznuti nakon homogenizacije na -20°C do trenutka ekstrakcije nukleinskih kiselina. Organi miševa žrtvovanih nakon eksperimentalnih infekcija su nakon izolacije prebacivani u mikrotubicu za homogenizaciju sa dodatkom 1 ml DPBS-a (za ekstrakciju opisanu u 2.6.2) ili Trizol reagensa (za ekstrakciju opisanu u 2.6.4) i zatim procesuirani sa dva ciklusa u trajanju od 20 sek na maksimalnoj brzini.

### *2.6.2 Ekstrakcija gDNK iz mišije krvi i organa komercijalnim kitom*

Ekstrakcija je rađena sa DNeasy kitom (Qiagen, Hilden, Nemačka) prema uputstvu proizvođača bez izmena. gDNK je ekstrahovana iz 200 µl krvi dobijene kardiopunkcijom kod miševa koji su žrtvovani zbog teških kliničkih simptoma da bi se izbegla prekomerna patnja životinja, ili iz 100 µl suspenzije organa (mozga ili srca) životinja koje su uginule tokom eksperimenta.

### *2.6.3 Precipitacija i koncentrovanje izolovane gDNK za genotipizaciju *T. gondii**

Za direktnu genotipizaciju iz uzoraka u kojima je detektovana mala količina DNK *T. gondii* real time PCR metodom (2.9), što je definisano sa Ct > 30, upotrebljena je metoda precipitacije i koncentrovanja izolovane gDNK natrijum acetatom. Količini od 10 do 100 µl izolovane gDNK je dodato 1 do 10 l natrijum acetata koncentracije 3 M (0,1 volumena) kao i 2 µl *Pellet Paint* reagensa (Merck Millipore, Darmštad, Nemačka) i isopropanola u odnosu od 1:1. Nakon inkubacije od 2 do 5 min na sobnoj temperaturi, uzorak je centrifugiran na maksimalnoj brzini 5 min. Nakon centrifugiranja, sav supernatant je odbačen, a prikupljena gDNK obojena *Pellet Paint* reagensom je ispirana sa 200 µl 70% etanola i centrifugirana na maksimalnoj brzini u trajanju od 5 min, a zatim ponovo isprana sa 200 µl 100% etanola. Nakon konačnog centrifugiranja, prikupljena gDNK je isušena inkubacijom na 55°C od 5 do 7 min, a zatim rastvorena u 3 µl za 3 x koncentrovan uzorak, ili u 10 µl za 10 x koncentrovan uzorak, Ultrapure vode (ThermoFisher Scientific, Voltham, Masačusets, SAD).

### *2.6.4 Ekstrakcija totalne RNK i gDNK iz uzoraka tkiva srca divljih kanida, tahizoita gajenih in vitro i mišijih organa*

Ekstrakcija je rađena iz homogenata u Trizol reagensu prema uputstvu proizvođača. Za ekstrakciju nukleinskih kiselina, tahizoita iz *in vitro* kulture ili nakon *in vivo* kulture, korišćeno je 0,5 ml Trizol reagensa, dok je za uzorke tkiva srca divljih kanida i mišje organe korišćen 1 ml Trizol reagensa. U slučaju tahizoita, Trizol je dodat tahizoitima koji su prethodno isprani DPBS rastvorom i prebačeni u mikrotubice, ili bunaru koji sadrži inficirane ćelije, koji je prethodno ispran sa 1 ml DPBS rastvora, dok je za tkivo srca veličine 1 cm x 1 cm i mišje organe Trizol

dodat u mikrotubice za mehaničku homogenizaciju. Zapremine od 0,5 ml Trizol reagensa je zatim dodato 100  $\mu$ l hloroforma (Sigma-Aldrich, St. Luis, Mizuri, SAD), dok je za zapreminu od 1 ml korišćeno 200  $\mu$ l hloroforma. Totalna RNK je izolovana prema uputstvu proizvođača, a zatim rastvorena u Ultrapure vodi, i to u 30  $\mu$ l za tahizoite i u 150  $\mu$ l za organe. DNK je izolovana iz istog uzorka prema uputstvu proizvođača, a rastvarana u 50  $\mu$ l ili 300  $\mu$ l 8mM NaOH (Sigma-Aldrich, St. Luis, Mizuri, SAD).

### 2.7 Genotipizacija sojeva *T. gondii*

Metoda korišćena za genotipizaciju je MnPCR-RFLP na 9 standardizovanih lokusa, i to altSAG2, GRA6, BTUB, PK1, L358, C22-8, C29, CS3 i Apico (Khan et al., 2005; Pena et al., 2008; Su et al., 2010). Reakciona smeša za prvi korak, u kojem se umnožavaju svi lokusi istovremeno (*multiplex*), sadržala je PCR MasterMix (ThermoFisher Scientific, Voltham, Masačusets, SAD) koncentracije 1 x, 0,15 mM svih eksternih prajmera za navedenih 9 lokusa, 2  $\mu$ l uzorka ekstrahovane gDNK i Ultrapure vodu. Ukupna zapremina reakcije iznosila je 20  $\mu$ l, a termalni profil se sastojao od tri koraka: inicijalna denaturacija od 3 min na 95°C, zatim 30 ciklusa od 30 sek na 95°C, 60 sek na 55°C i 60 sek na 72°C i konačno 5 min na 72°C. Reakcione smeše za drugi korak, u kojem se umnožava svaki lokus pojedinačno, su sadržale PCR MasterMix koncentracije 1 x, 0,3 mM internih prajmera za svaki pojedinačni lokus, 2  $\mu$ l reakcione smeše dobijene u prvom koraku i Ultrapure vodu. Ukupna zapremina je iznosila 20  $\mu$ l kao i u prvom koraku, termalni profil se takođe sastojao od tri koraka: inicijalne denaturacije identične kao u prvom koraku, zatim 35 ciklusa od 30 sek na 95°C, 60 sek na 60°C i 60 sek na 72°C i konačno 5 min na 72°C. Jedini izuzetak je termalni profil za Apico marker za koji je *annealing* temperatura iznosila 58°C. Amplifikacija je vršena u Veriti aparatu (Applied Biosystems, Foster Siti, Kalifornija, SAD). Za dobijanje fragmenata različitih dužina enzimskom restrikcijom, produkti amplifikacije iz drugog koraka tretirani su odgovarajućim restrikcionim enzimima. Reakciona smeša zapremine od 25  $\mu$ l je sadržala Fast Digest Buffer (Thermofisher Scientific, Voltham, Masačusets, SAD) koncentracije 1 x, 1 do 2 jedinice odgovarajućeg enzima, 5  $\mu$ l PCR reakcije kao i Ultrapure vodu. Identifikacija genotipa je rađena poređenjem restrikcionih profila alela na pojedinim lokusima dobijenih na agaroznom gelu od 2,5% sa dodatkom rastvora etidijum bromida finalne koncentracije 0,4  $\mu$ g/ml (Thermofisher Scientific, Voltham, Masačusets, SAD) sa profilom alela referentnih arhetipova RH (alel tip I na svim lokusima), ME49 (alel tip II na svim lokusima) i NED (alel tip III na svim lokusima). Za vizualizaciju i fotografisanje gelova korišćen je BioDocAnalyze instrument (Biometra, Getingen, Nemačka). Sekvence internih i eksternih prajmera kao i dužine amplikona i restrikcioni enzimi su prikazani u 2.7.1.

#### 2.7.1 Sekvence prajmera (3' $\rightarrow$ 5'), veličine amplikona i enzimi korišćeni za genotipizaciju

Lokus	Sekvence eksternih prajmera	Sekvence internih prajmera	Dužina int. amplikona	Restrikcioni enzim(i)
altSAG2	GGAACGCGAACAATGAGTTT GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	ACCCATCTGCGAAGAAAACG ATTTCGACCAGCGGGAGCAC	546bp	Mbo I
GRA6	ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT GCACCTTCGCTTGTTGGTT	TTTCCGAGCAGGTGACCT TCGCCGAAGAGTTGACATAG	344bp	SaqA I
BTUB	TCCAAAATGAGAGAAATCGT AAATTGAAATGACGGAAGAA	GAGGTCATCTCGGACGAACA TTGTAGGAACACCCGGACGC	411bp	BshI1285 I Taq I
L358	TCTCTCGACTTCGCCTCTTC GCAATTTCTCGAAGACAGG	AGGAGGCGTAGCGCAAGT CCCTCTGGCTGCAAGTGT	418bp	BsuR I Hinf I II
C22-8	TGATGCATCCATGCGTTTAT CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	TCTCTCTACGTGGACGCC AGGTGCTTGGATATTCGC	521bp	Alw26 I Mbo II
C29-2	ACCCACTGAGCGAAAAGAAA AGGGTCTCTTGCGCATACAT	AGTTCGACAGGTGTCGC TGCTAGGAAAAGAGGCGC	446bp	HpyCH4IV Rsa I
PK1	GAAAGCTGTCCACCCTGAAA AGAAAGCTCCGTGAGTGAT	CGCAAAGGGAGACAATCAGT TCATCGTGAATCTCATTGC	903bp	AvaI RsaI
CS3	GTGTATCTCCGAGGGGTCT TGTGACTTCTTCGCATCGAC	AGCGGATTTCCAACACTGTC CTGCTGCATTACAAACTCC	557bp	Hinf I II Mbo I

Apico	TGGTTTTAACCTAGATTGTGG AAACGGAATTAATGAGATTGAA	GCAAATTCTGAATTCTCAGTT GGGATTTCGAACCTTGATA	640bp	BspT I Dde I
-------	---	--	-------	-----------------

### 2.8 Tipizacija alela gena markera virulencije

Amplifikacija gena markera virulencije je rađena MnPCR metodom na sličan način kao što je opisano prethodno (2.7) i u Dubey et al. (2014). Reakciona smeša za prvi korak je sadržala 10 µl PCR Mastermix koncentracije 1 x, 0,25 µM svakog eksternog prajmera (2.8.1.), 3 µl gDNK ekstrahovane iz *in vitro* gajenih tahizoita kao i Ultrapure vodu. Ukupna zapremina reakcije iznosila je 20 µl. Reakciona smeša za drugi korak je sadržala 10 µl PCR Mastermix koncentracije 1 x, 0,5 µM internih prajmera za svaki pojedinačni gen (ROP18 UPS i DEL su amplifikovani kao posebni geni), 2 µl reakcione smeše iz prvog koraka nakon amplifikacije kao i Ultrapure vodu. Ukupna zapremina je takođe iznosila 20 µl. Termalni profili su bili identični onima korišćenim za prvi i drugi korak genotipizacije, kao što je prethodno opisano (2.7). Enzimski restrikcija amplifikovanih produkata kao i analiza produkata na agaroznom gelu je rađena identično kao što je prethodno opisano za genotipizaciju, sa istim referentnim sojevima, izuzev za gene GRA15 kod kojeg enzimski restrikcija nije neophodna i ROP18UPS kod kojeg se alel tipa 3 amplifikuje, dok se aleli tipa 1 i 2 ne amplifikuju (2.7).

2.8.1. Sekvence prajmera (3' → 5'), veličine amplikona i enzimi korišćeni za tipizaciju gena markera virulencije

Gen	Sekvence eksternih prajmera	Sekvence internih prajmera	Restrikcioni enzim(i)
ROP5	GGACAGACGCAGGCTTTTAC TCAAACGTCCTGACACTTCG	TGTGGCAGTTCAGTCTCAGC TCGAAGTTGAGGAACCGTCT	FspB I
ROP16	ATCTGCTTATCCGGCGACTA TCCGTTGGCATTATCATCA	TACCAAACCCAGCTTTCCACC TCGTCAACAGCTGACTCCAC	Hin I II Taq I
ROP18	CTCGTCGACCACACAGCTAA TTTTATCGACATCCCGCTTC GAGTGCTTTCTGTGCTCCT	<b>UPS</b> CACAGCATGAGCTTAAGAGTTG CACCGCAAGACAGGCTGTCTTC <b>DEL</b> AGTTCCTTCCCTGGTGTCT ACAAACTGGACTGGGGTGAG	Nema restrikcije
GRA15	CACGTACACAACCCATCTCG CCTTTGAACGGTAATGGAA	GGACCACCCAGAACAGAAAA CCCTATCGGTTTTTGGTCA	Nema restrikcije

### 2.9 Detekcija *T. gondii* gDNK metodom PCR u realnom vremenu

Detekcija se zasnivala na amplifikaciji sekvence od 80 bp unutar 529 bp repetitivnog elementa sa između 200 i 300 kopija po genomu, u zavisnosti od soja. Reakciona smeša je sadržala 10 µl Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster Siti, Kalifornija, SAD), 7,5 µM prajmera HO1 (3'-AGAGACACCGGAATGCGATCT-5') i HO2 (3'-CCCTCTTCTCCACTCTTCAATTCT-5'), 3,5 µM Taqman probe 3'-FAM-ACGCTTTCCTCGTGGTGATGGCG-TAMRA-5', 3 µl ekstrahovane gDNK kao i Ultrapure vodu do ukupne količine od 20 µl. Amplifikacija je rađena u dva koraka, a termalni profil se sastojao od inkubacije na 50°C u trajanju od 2 min radi aktivacije uracil DNK glikozilaze, inicijalne denaturacije na 95°C u trajanju od 5 min, a zatim 45 ciklusa od 95°C u trajanju od 15 sek, i 60°C u trajanju od 60 sek. Detekcija je vršena nakon svakog ciklusa amplifikacije (engl. *end point detection*), a prag pozitivnosti (engl. *threshold*) je određen automatskim algoritmom nakon 15 ciklusa amplifikacije. Korišćen je aparat StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster Siti, Kalifornija, SAD).

### 2.10 Konverzija iRNK u cDNK

Koncentracija RNK je izmerena Qubit 2.0 fluorimetrom (Invitrogen, Karlsbad, Kalifornija, SAD) komercijalnim reagensima iz Qubit RNA BR (engl. *Broad Range*) ili HS (engl. *High*

*Sensitivity*) kitova (Invitrogen, Karlsbad, Kalifornija, SAD) prema uputstvu proizvođača. Zapremine RNK koje odgovaraju količini od 2 µg ili 5 µg su korišćene za sintezu jednolančane cDNK, u zavisnosti od grupe uzoraka za koje će biti urađena relativna kvantifikacija ekspresije gena. Sinteza jednolančane cDNK je rađena RevertAid First strand cDNA synthesis kitom (ThermoFisher Scientific, Voltham, Masačusets, SAD) prema uputstvu proizvođača, izuzev supstitucije nasumičnih heksamera reagensom OligoDT radi sinteze cDNK isključivo od iRNK frakcije.

### 2.11 Kvantifikacija relativne ekspresije gena domaćina i parazita

Reakciona smeša za određivanje relativne ekspresije odabranih parazitskih i mišjih gena je sadržala 10 µl PowerUp SYBR Green Master Mix (ThermoFisher Scientific, Voltham, Masačusets, SAD), specifične prajmere u koncentraciji od 1 µM, 2 µl cDNK i Ultrapure vodu (2.11.1.). Konačna zapremina reakcije je iznosila 20 µl. Kalibracija ekspresije je rađena sa cDNK sintetisanom od RNK tahizoita soja RH (ToxoDB#10) za ENO2, a bradizoita arhetipa II (ToxoDB#1) za ENO1, kao i iz mozгова ili slezina neinficiranih miševa (n=4). Za normalizaciju ekspresije je u oba slučaja korišćen gen  $\beta$ -actin. Relativna kvantifikacija je urađena  $\Delta\Delta C_t$  metodom sa uračunavanjem efikasnosti amplifikacije metodom dilucije (Pfaffel, 2004).

#### 2.11.1 Sekvence prajmera (3' → 5'), veličine amplikona i enzimi korišćeni za genotipizaciju

Gen	Vrsta	Sekvence <i>forward</i> prajmera	Sekvence <i>reverse</i> prajmera
$\beta$ -actin	<i>T. gondii</i>	TCCCGTCTATCGTCGGAAAG	CCATTCCGACCATGATACCC
ENO1	<i>T. gondii</i>	GTTATCAAGGACATCGTTGCACG	CTATCGACACGCCAAAATGG
ENO2	<i>T. gondii</i>	CCATCAAGGACATCACTGC	GCCGGCTTGATAATCTTGTGG
$\beta$ -actin	<i>M. musculus</i>	CACCACAGCTGAGAGGGAAATC	GTTTCATGGATGCCACAGGATT CC
IL-12p40	<i>M. musculus</i>	GTATTCAGTGTCTGCCAGGAG	GRCTGGTTTGATGATGTCCCTG
IFN- $\gamma$	<i>M. musculus</i>	GAAAGACAATCAGGCCATCAGC	CGGATGAGCTCATTGAATGC
IL-10	<i>M. musculus</i>	CTGTCATCGATTCTCCCCTGTG	GACTCAATACACACTGCAGGTG

### 2.12 Test modifikovane aglutinacije (MAT)

Priprema antigena je rađena prema protokolu koji su opisali Desmonts i Remington (1980.), ali bez upotrebe sarkoma ćelija, dok je sam test izvođen u potpunosti prema istom protokolu, tako da je  $\beta$ -merkaptetanol, koji sprečava vezivanje IgM klase antitela za antigen, dodavan direktno u serum. Serumi miševa žrtvovanih u toku eksperimenata su serijski dvostruko razblaživani, od 1:20 do 1:327680, pa je po 50 µl dodavano u bunare sa oblim dnom mikrotitracione ploče. Svakom uzorku seruma je zatim dodat *T. gondii* antigen, koji se sastoji od celih tahizoita RH soja, izolovanih iz peritoneuma miševa, fiksiranih u 6 % PFA rastvoru i razblaženih u BABS puferu (pH 8,95) sa dodatkom 0,04 % BSA (Sigma-Aldrich, St. Luis, Mizuri, SAD) na koncentraciju od 5 - 7 X 10<sup>3</sup> tahizoita/µl, u konačnoj zapremini od 50 µl. Ploča je inkubirana na 37°C preko noći. Prisustvo specifičnih IgG antitela u serumu označava raspršen aglutinat koji ravnomerno prekriva kompletno dno bunara, te je teško uočljiv, dok pojava izraženog taloga u vidu “dugmeta” u centralnom delu bunara odsustvo specifičnih antitela. Kao titar specifičnih antitela u određenom serumu smatra se poslednje razblaženje seruma u kome je očitivan pozitivan nalaz tj. u kome se još ne zapaža “dugme”.

### 2.13 Utvrđivanje kumulativne smrtnosti in vivo, određivanje virulencije i analiza parametara morbiditeta

Swiss Webster ženke težine do 20 grama su intraperitonealno inficirane dozama od 10<sup>1</sup> do 10<sup>6</sup> tahizoita sojeva G13, EQ39, EQ40, K1 i BGD18. Infektivna smeša je pripremljena i infekcija

urađena kao što je prethodno opisano (2.2.2). Infekcija je kod pojedinih miševa klinički bila uočljiva kroz pojavu letargije, vidljivog gubitka telesne mase i razbarušenog krzna, simptomi koji spadaju u očekivanu kliničku sliku, ali je potvrđena i eksperimentalno i to na dva načina: detekcijom 529 repetitivnog elementa u krvi ili organima (mozak, srce) kod životinja koje su uginule tokom eksperimenta ili dokazivanjem *T. gondii* specifičnih IgG antitela MAT testom kod životinja koje su preživele. Životinje kod kojih su se pojavili simptomi patnje kao što su hemipareza ili otežano disanje su odmah žrtvovane. Dan uginuća je beležen a smrtnost je praćena tokom 42 dana. Tada su sve preživele životinje žrtvovane, izolovan je mozak, i ukupan broj cista u mozgu je utvrđen na ranije opisane načine (2.2.1). Promer tkivnih cista je izmeren Axioskop 2 plus measure funkcijom Zeiss Axiovision programa, verzija 4.8, a zapremina izračunata pomoću formule za zapreminu sfere ( $V = \frac{4}{3}\pi r^3$ ). Za utvrđivanje parametra kumulativne smrtnosti, koji se dobija kao procenat uginulih životinja inficiranih sa tri uzastopne infektivne doze u kojima je potvrđena infekcija kod 100% miševa, odabrane su doze  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ .

#### 2.14 IGRA (engl. Interferon Gamma Release Assay) test

Solubilni antigen tahizoita *T. gondii* (STAg) za restimulaciju ćelija pripreman je od tahizoita RH soja izolovanih iz peritoneuma Swiss Webster miševa (n=2) trećeg dana nakon infekcije, na prethodno opisan način (2.2.2). Nakon oslobađanja tahizoita iz ćelija provlačenjem kroz insulinski špric i iglu, suspenzija je ispirana DPBS-om i centrifugirana tri puta, a zatim resuspendovana u 1ml DPBS-a i prebačena u mikrotubice zapremine 2 ml sa keramičkim kuglicama prečnika 1.4 mm. Mehanička homogenizacija je urađena sa tri ciklusa u trajanju od 20 sek na maksimalnoj brzini u Bead Ruptor instrumentu. Nivo homogenizacije je proveren vizuelno, a antigen se smatrao zadovoljavajućim kada suspenzija više nije sadržala intaktne tahizoite. Proteinski sadržaj je kvantifikovan korišćenjem Protein Assay kita (Invitrogen, Karlsbad, Kalifornija, SAD) za fluorimetar Qubit 2.0. Swiss Webster ženke težine do 20g su interaperitonealno inficirane dozom od 10 tahizoita sojeva G13, EQ39, EQ40, K1 i BGD18 (ToxoDB#1). Infektivne smeše kao i način intraperitonealne infekcije su opisani prethodno (2.2.2). Nakon 42. dana, miševi su žrtvovani, a kardiopunkcijom je iglom od 21 G na insulinskom špricu izvučen 1 ml krvi i prebačen u mikrotubice sa 1,5 mg EDTA (Sigma-Aldrich, St. Luis, Mizuri, SAD). Punoj krvi je dodato 20 ng STAg-a, pa je suspenzija mešana 2 min u orbitalnoj mešalici i inkubirana na 37°C u trajanju od 5-6 h. Nakon inkubacije, frakcija koja sadrži mononuklearne ćelije je izolovana centrifugiranjem kroz Ficoll Paque PLUS (GE Healthcare, Uppsalla, Švedska) gradijent po uputstvu proizvođača. Izolovane ćelije su ispirane DPBS-om nekoliko puta, pa je dodat 1 ml Trizol reagensa i totalna RNK je izolovana po uputstvu proizvođača. Relativna kvantifikacija ekspresije IFN- $\gamma$  urađena je kao što je opisano (2.11), a kao kalibratori ekspresije korišćeni su periferni mononukleari stimulisani STAg antigenom i izolovani na isti način kao i iz neinficiranih miševa, dok je  $\beta$ -actin korišćen za normalizaciju. Kontrolu eksperimenta su činili ne-stimulisani mononukleari izolovani iz miševa inficiranih tahizoitima genotipa G13.

#### 2.15 Funkcionalna analiza zaštitnog imuniteta: Reinfekcija (challenge) hronično inficiranih miševa

Swiss Webster ženke inficirane dozom od 10 tahizoita sojeva G13, EQ39, EQ40, K1 i BGD18 (ToxoDB#1) su nakon 42 dana re-inficirane dozom od 100 tahizoita virulentnog soja RH. Infektivne smeše kao i način intraperitonealne infekcije su opisani prethodno (2.2.2). Preživljavanje životinja nakon reinfekcije je praćeno 30 dana. Miševi su tada žrtvovani radi uzimanja krvi kardiopunkcijom i izolovanja organa (mozak, slezina). U serumu je određen titar *T. gondii* specifičnih IgG antitela MAT testom (2.12), dok su organi mehanički homogenizovani kao što je prethodno opisano (2.6.1) radi izolacije nukleinskih kiselina i analize nivoa ekspresije citokina IFN $\gamma$ , IL-12 i IL-10.

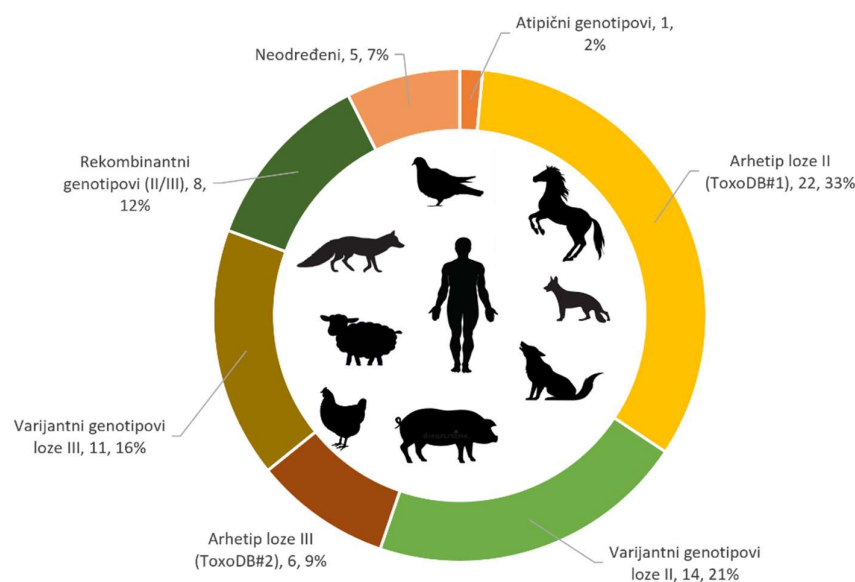
### 2.16 Statistička obrada rezultata

Statistička obrada rezultata i grafički prikazi su rađeni u GraphPad Prism8 (GraphPad software, San Diego, CA, SAD), SPSS (IBM Corporation, Armonk, NY, SAD) i Excel programima (Microsoft Corporation, Redmond, WA, SAD). Analiza rezultata preživljavanja miševa nakon infekcije vršena je pomoću Kaplan-Meier metode, dok je za poređenje rezultata broja parazita po vakuoli i broja plakova korišćen T-test. Za izračunavanje LD50 korišćena je *LD50 calculator* funkcija za Excel program (<https://probitanalysis.wordpress.com/2016/07/07/first-blog-post/>) bazirana na Probit analizi. Za poređenje rezultata analize nivoa specifičnih IgG antitela kao i relativnih nivoa citokina korišćena je integrisana One-way ANOVA u GraphPad Prism8 softveru, a Bonferroni *post hoc* test je rađen online (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/posttest1/>).

## Rezultati

### 1. Populaciona struktura *T. gondii* u prelaznim domaćinima u Srbiji

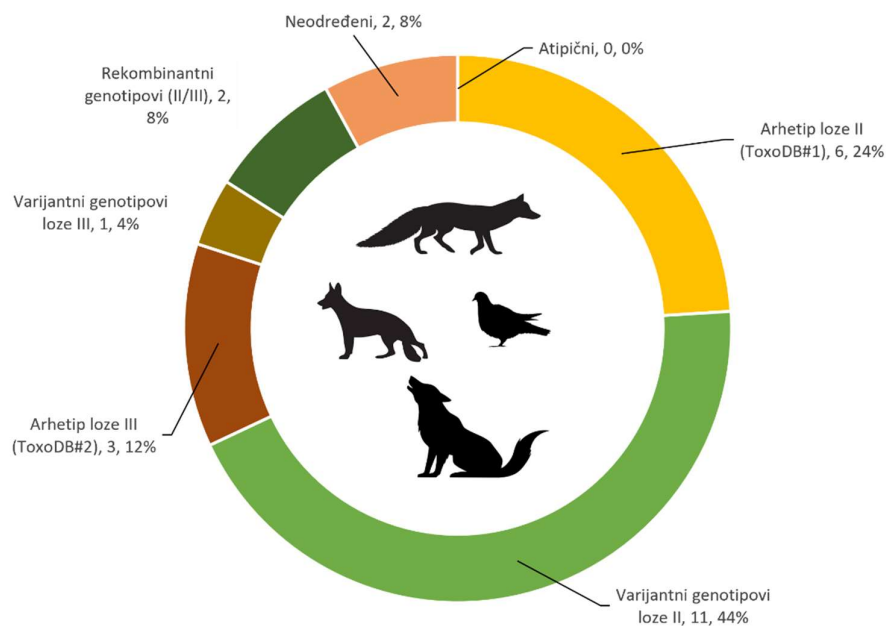
Populaciona struktura parazita *T. gondii* u Srbiji je pokazala da su u prelaznim domaćinima detektovani i izolovani genotipovi loza II i III (Graf. 1). Pokazano je da obe loze cirkulišu i u domaćoj i u silvatičnoj sredini. Najveći deo strukture čine genotipovi loze II, sa 53,7%, među kojima dominanira arhetipski genotip (ToxoDB#1), sa 32,8% udela, koji je najfrekventniji kod čoveka. Genotipovi loze III, koja čini 25,3% strukture, detektovani su u zlatnim šakalima, lisicama i vukovima, ali i izolovani iz domaćih životinja. Među genotipovima loze III, dominantni su varijantni genotipovi. Genotipovi za koje je bilo moguće precizno utvrditi da su rekombinantni (II/III) čine 11,9% strukture a oni koji nisu mogli da se svrstaju u loze 7,4%. Svega 1,4% (1 soj) je bilo atipičnih.



**Grafikon 1.** Populaciona struktura parazita *T. gondii* u prelaznim domaćinima u Srbiji. Populaciona struktura je utvđena na osnovu genotipizacije 67 sojeva poreklom iz ljudskih telesnih tečnosti, i srca raznih vrsta domaćih životinja, divljih golubova i divljih kanida.

Više od jedne trećine (37,3%) svih sojeva genotipiziranih u ovom istraživanju poticalo je iz divljih kanida. Zanimljivo je da su i kod njih genotipovi loze II takođe dominantni (68%), a najveći deo strukture čine varijantni genotipovi ove loze (44%) (Graf. 2). Arhetip (ToxoDB#2) i varijantni genotipovi loze III zajedno čine 16% strukture. Genotipovi za koje nije mogla da bude određena pripadnost lozi II ili III čine 8% strukture, dok rekombinantni genotipovi takođe čine 8% strukture.

Analiza diverziteta populacije genotipova kod lisica (*V. vulpes*) pokazala je 8 različitih genotipova među 10 uzoraka u kojima je genotipizacija bila uspešna, dok je kod zlatnih šakala (*C. aureus*) detektovano svega 6 različitih genotipova među 13 uzoraka. U oba uzorka sivih vukova (*C. lupus*) detektovani su različiti genotipovi (Tab. 1). Velika većina alela su tipovi 2 i 3, dok su u dva različita genotipa detektovani aleli tipa 1.



**Grafikon 2.** Populaciona struktura parazita *T. gondii* kod zlatnih šakala, lisica i sivih vukova. Populaciona struktura je utvrdjena na osnovu 24 sojeva detektovanih u zlatnim šakalima (*C. aureus*), lisicama (*V. vulpes*) i vukovima (*C. lupus*).

**Tabela 1.** Genotipovi detektovani u divljim kanidama

Hromozom		ib	VI	VIIa	VIII	IX	X	Apikoplast		Genotip, loza
PCR-RFLP Marker		C22-8	PK1	CS3	altSAG2	BTUB	GRA6	Apico		
Soj ToxoDB#	Poreklo	Genotip								
067-16	<i>V. vulpes</i>	III	III	-	III	III	III	-	-	Arhetip, III
097-16	<i>C. aureus</i>	III	III	III	III	III	III	III	-	Arhetip, III
032-16	<i>C. aureus</i>	III	III	III	III	III	III	-	-	Arhetip, III
124-16	<i>V. vulpes</i>	III	III	-	III	II	III	-	-	Varijantni, III
020-16	<i>C. lupus</i>	II	III	-	II	III	II	III	-	Rekombinantni II/III
121-16	<i>V. vulpes</i>	III	-	-	II	III	II	-	-	II ili III
075-16	<i>C. aureus</i>	II	II	III	II	III	III	-	-	II ili III
022-16	<i>C. lupus</i>	II	II	-	II	III	II	-	-	Varijantni, II
068-16	<i>V. vulpes</i>	II	III	-	II	III	II	II	-	Varijantni II
103-16	<i>V. vulpes</i>	II	II	II	II	III	II	-	-	Varijantni, II
056-13	<i>C. aureus</i>	II	III	-	II	III	II	II	-	Varijantni, II
057-16	<i>C. aureus</i>	II	II	-	II	III	III	II	-	Varijantni, II
125-16	<i>C. aureus</i>	II	III	II	II	II	II	III	-	Rekombinantni II/III
023-15	<i>C. aureus</i>	II	III	-	II	III	II	-	-	Varijantni, II
051-16	<i>C. aureus</i>	III	III	I	II	II	II	-	-	Varijantni, II
061-16	<i>C. aureus</i>	II	II	-	II	III	III	-	-	Varijantni, II
062-16	<i>C. aureus</i>	II	II	-	II	III	III	-	-	Varijantni, II
113-16	<i>V. vulpes</i>	-	I	II	II	III	II	-	-	Varijantni, II
061-13	<i>V. vulpes</i>	II	III	III	II	II	III	-	-	Varijantni, II
205-16	<i>C. aureus</i>	II	II	II	II	II	II	II	-	Arhetip, II
087-16	<i>C. aureus</i>	II	-	II	II	II	II	II	-	Arhetip, II
115-16	<i>C. aureus</i>	II	II	-	II	II	II	-	-	Arhetip, II
126-16	<i>V. vulpes</i>	-	II	-	II	II	II	-	-	Arhetip, II
101-13	<i>V. vulpes</i>	II	II	II	II	II	II	II	-	Arhetip, II
050-13	<i>V. Vulpes</i>	II	II	-	II	-	II	-	-	Arhetip, II



## 2. Biološka karakterizacija varijantnih genotipova loze III

### 2.1 Genotipovi izolata i tipizacija markera virulencije

Genotipizacija na 9 lokusa je pokazala da su četiri varijantna genotipa loze III izolovana iz domaćih životinja međusobno različiti (Tab. 2). Pretraga ToxoDB ([www.toxodb.org](http://www.toxodb.org)) pokazala je da je samo soj EQ39 ranije izolovan genotip #54. Genotip kontrolnog soja BGD18 potvrđen je kao arhetip loze II (ToxoDB#1).

**Tabela 2.** Poreklo sojeva i MnPCR-RFLP genotipovi

Hromozom		Ib	VI	III	V	VIIa	VIII	IX	X	Apikoplast
PCR-RFLP Marker		C22-8	PK1	C29-2	L358	CS3	Alt.SAG2	BTUB	GRA6	Apico
Soj ToxoDB#	Poreklo	Genotip								
Eq40 (ToxoDB--)	<i>E. caballus</i>	II	II	III	III	III	II	I	III	III
K1 (ToxoDB--)	<i>G. gallus</i>	II	III	III	III	III	II	II	III	III
G13 (ToxoDB--)	<i>C. liva</i>	II	II	III	III	III	III	III	III	III
Eq39 (ToxoDB#54)	<i>E. caballus</i>	III	III	III	III	II	II	III	III	II
BGD18 (ToxoDB#1)	<i>H. sapiens</i>	II	II	II	II	II	II	II	II	II

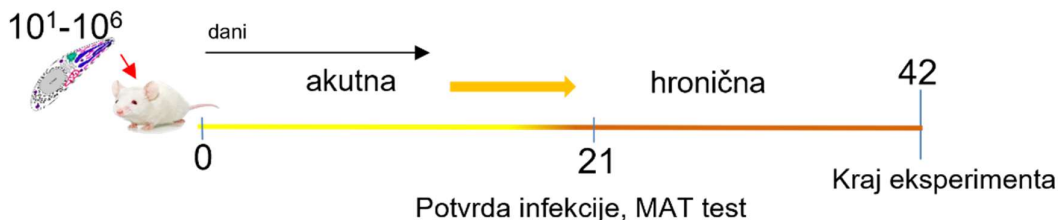
Ispitivanje gena markera virulencije ROP16, ROP5, GRA15 i ROP18 pokazalo je identične tipove alela kod svih varijantnih sojeva loze III (Tab. 3). Poređenje sa kontrolnim sojevima, arhetipovima loza I, II i III, pokazalo je da svi varijantni sojevi loze III imaju identične tipove alela ovih gena kao i arhetip III (ToxoDB#2). Pokazano je da izolovani soj BGD18 (ToxoDB#1) ima identičan tip alela kao i kontrolni soj Me49 (ToxoDB#1), što dozvoljava da se koristi kao kontrolni soj za potrebe ostalih eksperimenata.

**Tabela 3.** Tipizacija alela četiri gena markera virulencije ROP16, ROP5, GRA15 i ROP18. Sojevi RH, Me49 i NED, koji su referentni genotipovi za arhetipove loza I, II i III, korišćeni su kao kontrole za različite tipove alela na prikazana četiri lokusa.

Soj	Gen, hromozom, QTL			
	ROP16, VIIb, VIR4	ROP5, XII, VIR1	GRA15, X, -	ROP18, VIIa, VIR3
RH (toxodb#10)	1	1	1	1
Me49 (toxodb#1)	2	2	2	2
NED (toxodb#2)	1	3	1	3
Eq40	1	3	1	3
K1	1	3	1	3
Eq39 (toxodb#54)	1	3	1	3
G13	1	3	1	3
BGD18 (toxodb#1)	2	2	2	2

## 2.2 Određivanje virulencije *in vivo* i parametara morbiditeta

Rezultati preživljavanja infekcije tahizoitima ispitivanih genotipova za određivanje virulencije *in vivo* po protokolu iz Saraf et al., 2017 (Graf. 3) poređeni su sa dva kontrolna soja, visoko virulentnim arhetipom I, RH (ToxoDB#10), i sojem niske virulencije, arhetipom II, BGD18 (ToxoDB#1).



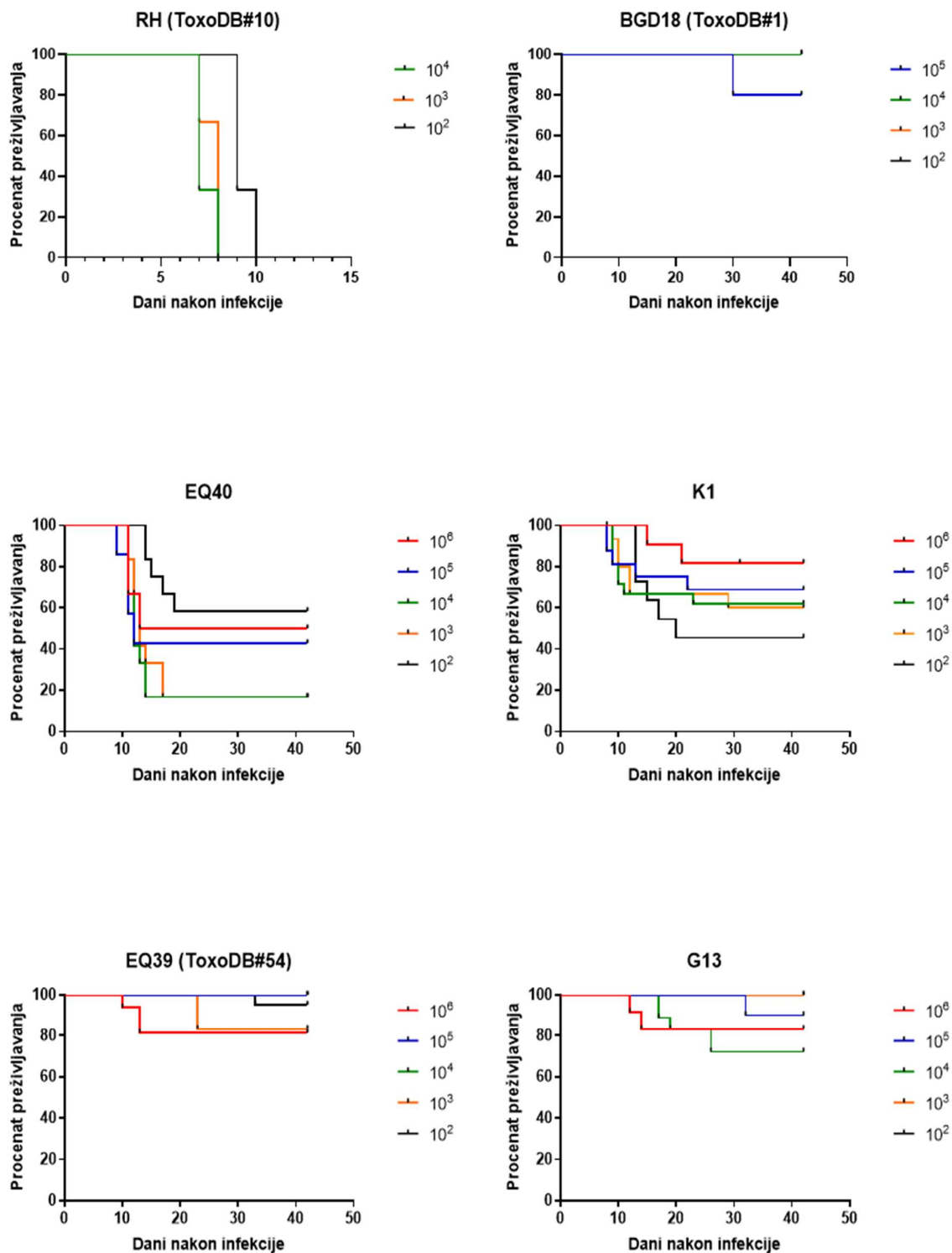
**Grafikon 3.** Šematski prikaz eksperimenta

### 2.2.1 Analiza preživljavanja akutne infekcije različitim sojevima *T. gondii*

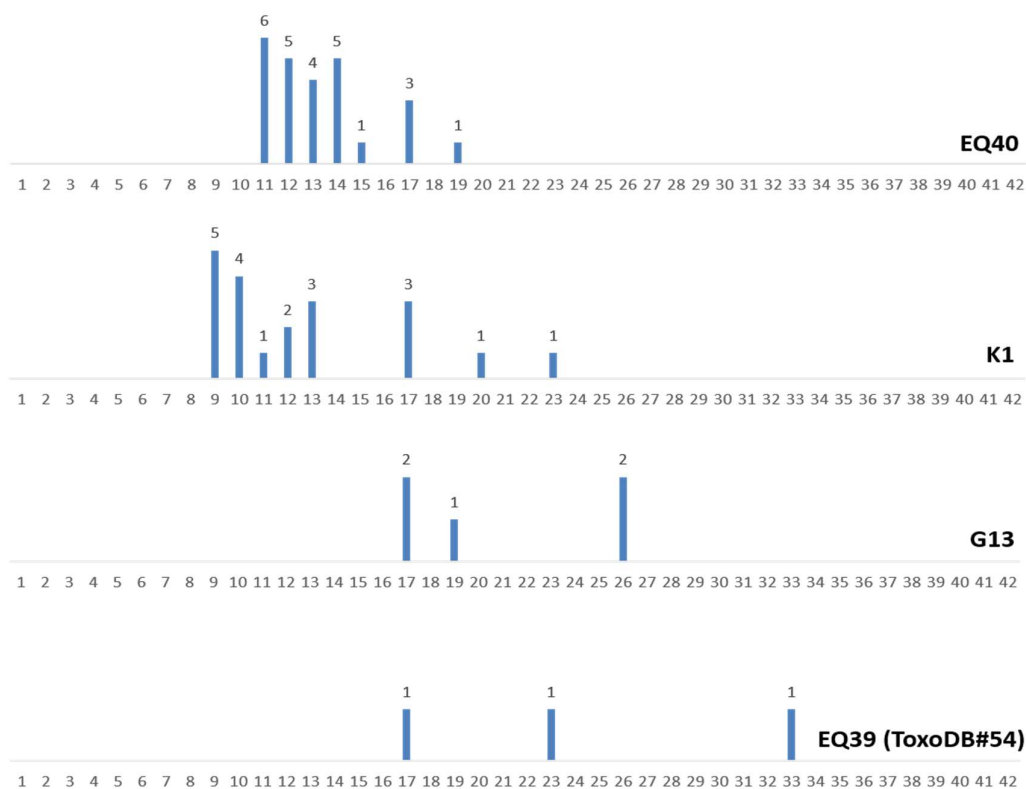
Svi miševi inficirani sojem RH (ToxoDB#10), i to sa tri različite doze tahizoita ( $10^2$ ,  $10^3$  i  $10^4$ ), po očekivanju su uginuli do 10. dana nakon infekcije. Nasuprot tome, većina miševa, izuzev nekoliko jedinki inficiranih sa  $10^5$  tahizoita, preživela je infekciju sojem BGD18 (ToxoDB#1). Kod ispitivanih genotipova loze III, infekcija tahizoitima EQ40 i K1 izazvala je visoki procenat smrtnosti koji je bio dozno zavisian, dok sa G13 i EQ39 (ToxoDB#54) nije (Graf. 4).

### 2.2.2 Kinetika preživljavanja i kumulativna smrtnost

Praćenjem preživljavanja miševa nakon infekcije ispitivanim genotipovima sa infektivnim dozama od  $10^1$ - $10^6$  tahizoita pokazano je da je najveći broj miševa inficiranih tahizoitima genotipova EQ40 i K1 uginuo 11-15, odnosno 9-13 dana nakon infekcije, dok su miševi inficirani genotipovima EQ39 (ToxoDB#54) i G13, uginuli sporadično u različitim vremenskim tačkama tokom infekcije (Graf. 5).



**Grafikon 4.** Kaplan-Meier krive preživljavanja miševa tokom 42 dana infekcije različitim dozama tahizoita kontrolnih i ispitivanih genotipova.



**Grafikon 5.** Vremenski tok infekcije od 1. do 42. dana sa infektivnim dozama od  $10^1$ - $10^6$  tahizoita različitih genotipova. Broj uginulih životinja u određenom danu je prikazan iznad svakog stuba.

Procenat miševa uginulih u ranoj infekciji (do 15. dana) po očekivanju je bio najviši za EQ40, a najniži za EQ39 (ToxoDB#54) i G13. Kumulativna smrtnost, koja je izračunata iz tri konsektivne infektivne doze,  $10^2$ - $10^4$ , do kraja eksperimenta 42. dana, takođe je bila najviša za EQ40, a najniža za EQ39 (ToxoDB#39), dok su svi miševi inficirani istim dozama kontrolnog soja BGD18 (ToxoDB#1) preživeli (Tab. 4). Na osnovu ovih rezultata pokazano je da je među ispitivanim sojevima loze III najvirulentniji genotip EQ40, a zatim K1, koji se na osnovu kumulativne smrtnosti klasifikuju kao intermedijarno virulentni, dok su G13 i EQ39 (ToxoDB#54) genotipovi niske virulencije. Letalne doze za 50% miševa ( $LD_{50}$ ) za genotipove EQ40 i K1 iznosile su 694 ( $10^2$ ) odnosno 21,262 ( $10^4$ ) tahizoita.

**Tabela 4.** Procenat uginulih miševa u ranoj infekciji i kumulativni mortalitet do 42. dana

Soj	Procenat uginulih životinja do 15. dana	Kumulativna smrtnost do 42. dana ( $10^2$ - $10^4$ )
RH (ToxoDB#10)	100%	-
BGD18 (ToxoDB#1)	0%	0%
EQ40	84%	69,45%
K1	75%	38,8%
G13	0%	10,75%
EQ39 (ToxoDB#54)	0%	6,8%

### 2.2.3 Analiza parametara morbiditeta

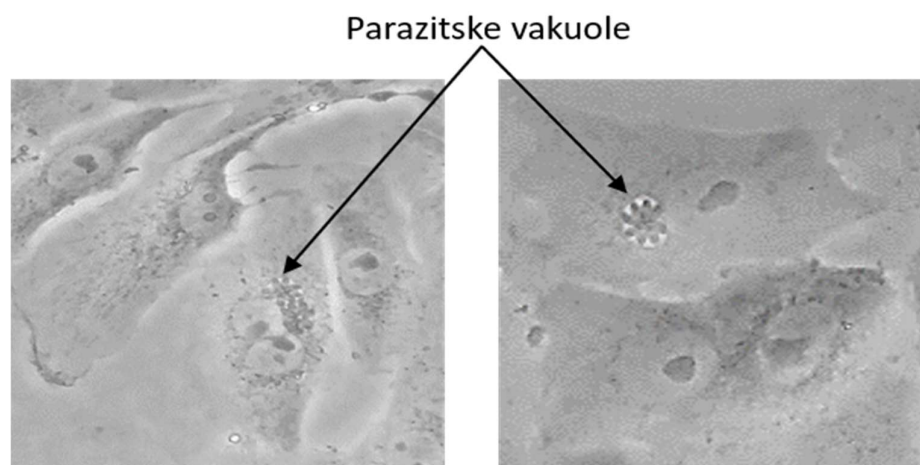
Miševi koji su preživeli infekciju različitim genotipovima loze III žrtvovani su 42. dana radi analize parametara morbiditeta. Broj tkivnih cista u mozgovima preživelih životinja bio je izuzetno varijabilan i nije korelirao ni sa infektivnom dozom niti sa virulencijom sojeva. U Tabeli 5 prikazano je poređenje maksimalnog broja tkivnih cista kod preživelih miševa kao i prosečan promer, iz kojeg je izračunata prosečna zapremina.

**Tabela 5.** Maksimalan broj i veličina tkivnih cista u mozgu preživelih miševa, (n = 4-6), 42 dana nakon infekcije različitim genotipovima loze III. Zapremina je aproksimirana kao  $V=4/3\pi r^3$ .

Soj	Max. broj cista	Prosečan promer	Zapremina ( $V=4/3\pi r^3$ )
EQ40	1970	13,86 (n=68)	1394,08 $\mu\text{m}^3$
K1	600	14,99 (n=57)	1763,61 $\mu\text{m}^3$
G13	980	13,42 (n=113)	1265,48 $\mu\text{m}^3$
EQ39 (ToxoDB#54)	650	14,85 (n=157)	1714,66 $\mu\text{m}^3$

### 2.3 Analiza fenotipa virulencije *in vitro*

Kinetika invazije tahizoita u VERO ćelije i intraćelijska proliferacija su analizirane metodom *growth assay* prema Fox i Bzik (2002). Rezultati dobijeni sa ispitivanim genotipovima poređeni su međusobno kao i sa sojem BGD18 (ToxoDB#1), koji je služio kao primer nisko virulentnog genotipa, dok je laboratorijski soj RH (ToxoDB#10), kao primer visoko virulentnog genotipa, kojeg odlikuje brza invazija i visoka stopa proliferacije, služio kao kontrola. Infektivne doze su predstavljene kao MOI (engl. *multiplicity of infection*), što označava odnos broj tahizoita prema broju ćelija.



**Grafikon 6.** Intraćelijske vakuole u VERO ćelijama kojima proliferišu tahizoiti genotipa EQ40 nakon 3 dana *in vitro* kulture. U vakuolama se jasno vide rozete, koje su vrlo učestale formacije u slučaju infekcije tahizoitima soja RH (ToxoDB#10), ali ređe zapažene posle infekcije tahizoitima nisko virulentnih genotipova.

### 2.3.1 Kinetika invazije

Rezultati praćenja invazije su pokazali da se kod genotipova EQ40, K1 i EQ39 (ToxoDB#54) inficirane ćelije mogu primetiti već 1 h nakon infekcije, dok je vreme do pojave prvih inficiranih ćelija za genotip G13 bilo najduže i iznosilo čak 3 h. Kontrolni soj RH (ToxoDB#10) inficira ćelije u roku od 20 min, dok je vreme za soj BGD18 (ToxoDB#1) iznosilo 1,5 h (Tab. 6).

**Tabela 6.** Kinetika invazije. Inficirana su tri tehnička replikata (bunara) za svaki soj po eksperimentu. Infektivna doza je iznosila 0,1 MOI, a pregledano je do 200 VERO ćelija za svaki soj u intervalima od po 30 min nakon infekcije. Eksperimenti su ponovljeni tri puta i prikazani rezultati predstavljaju prosek iz sva 3 eksperimenta.

Soj	Vreme nakon infekcije (h)	
	1	3
RH (ToxoDB#10)	+	+
BGD18 (ToxoDB#1)	-	+
EQ40	+	+
K1	+	+
EQ39 (ToxoDB#54)	+	+
G13	-	+

### 2.3.2 Proliferacija

Od ispitivanih genotipova loze III, najviši procenat inficiranih ćelija nakon 24 h utvrđen je kod EQ39 (ToxoDB#54), a najniži kod G13, dok su EQ40 i K1 pokazali slične (intermedijarne) vrednosti. Sem toga, nakon 24 h je kod EQ39 (ToxoDB#54) u najvećem broju ćelija primećeno dve ili više vakuola, dok je kod EQ40 bilo do dve vakuole. U najvećem broju ćelija inficiranih ostalim genotipovima, uključujući i kontrolni RH (ToxoDB#10), primećena je po jedna vakuola. Nakon 48 h, broj vakuola po ćeliji bio je sličan broju nakon 24 h kod svih, izuzev BGD18 (ToxoDB#1), kod kojeg je primećen blag porast na gotovo dve vakuole po ćeliji (Tab. 7).

Broj tahizoita u vakuoli kao i broj deoba bili su najviši u odnosu na sve ispitivane genotipove kod soja RH (ToxoDB#1), a najniži kod BGD18 (ToxoDB#1), dok su ovi parametri kod ispitivanih genotipova loze III bili između ove dve krajnosti. Među ispitivanim genotipovima loze III, najviši prosečni broj tahizoita po vakuoli zapažen je za EQ40, dok je prosečan broj deoba nakon 48 h bio sličan za EQ40, K1 i G13, a niži za EQ39 (ToxoDB#54) (Tab. 8).

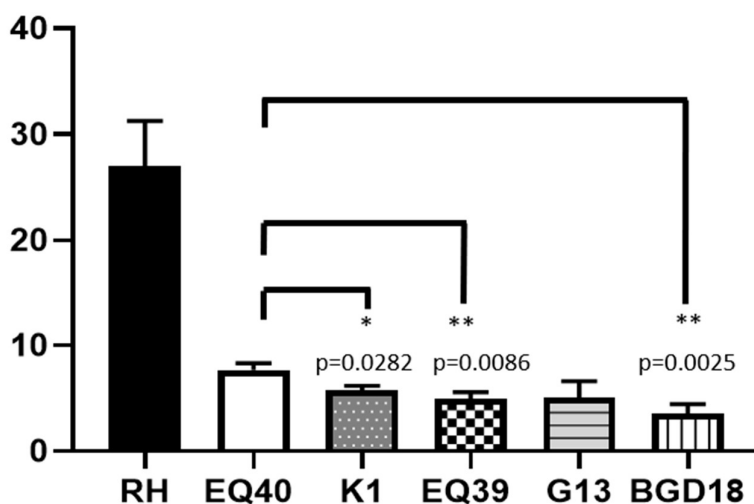
**Tabela 7.** Procenat inficiranih VERO ćelija nakon 24 h i broj vakuola po ćeliji nakon 24 i 48 h. Prosečne vrednosti za svaki genotip dobijene su iz tri tehnička replikata (bunara) po eksperimentu. Ćelije su inficirane dozom od 0,1 MOI, a pregledano je od 400 do 600 VERO ćelija za svaki soj po eksperimentu. Eksperimenti su ponovljeni šest puta

Soj	Inficirane ćelije (%) nakon 24h	Br. vakuola po ćeliji (prosek)	
		24	48
RH (ToxoDB#10)	4.42%	1.4	1.2
BGD18 (ToxoDB#1)	0.57%	1.3	1.8
EQ40	1.18%	1.9	1.6
K1	1.31%	1.3	1.3
EQ39 (ToxoDB#54)	2.97%	2.5	2.4
G13	0.43%	1	1.4

**Tabela 8.** Proliferacija nakon 48 h *in vitro*. Prosečne vrednosti za svaki genotip dobijene su iz tri tehnička replikata (bunara). Ćelije su inficirane dozom od 0,1 MOI, a pregledano je 30-50 vakuola po soju za svaki eksperiment. Eksperimenti su ponovljeni šest puta. Broj deoba je aproksimiran kao  $\log_2$  broja parazita po vakuoli.

Soj	Proliferacija nakon 48h	
	Br. parazita/vakuoli	Br. deoba
RH (ToxoDB#10)	27±4.250	3.712±0.476
BGD18 (ToxoDB#1)	3.6±0.880	0.981±0.244
EQ40	7.7±0.610	2.008±0.191
K1	5.4±0.436	2.025±0.127
EQ39 (ToxoDB#54)	4.9±0.611	1.625±0.157
G13	5.0±1.550	2.033±0.515

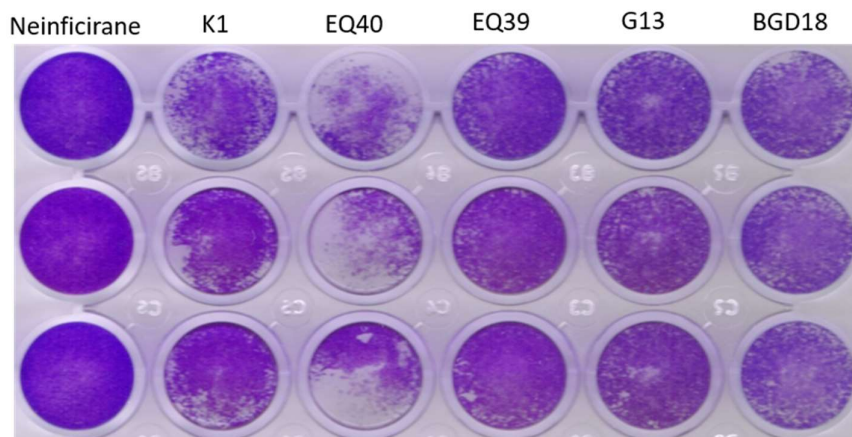
Statističko poređenje prosečnog broja tahizoita u vakuolama ispitivanih genotipova loze III potvrdilo je da su razlike između EQ40, K1 i EQ39 (ToxoDB#54) i kontrolnog soja BGD18 (ToxoDB#1) značajne, što je u korelaciji sa prethodno utvrđenom virulencijom *in vivo*. Statističke značajnosti između genotipova EQ40 i G13 nije bilo (Graf. 7).



**Grafikon 7.** Broj parazita u vakuolama. Prosečne vrednosti za svaki soj dobijene su iz tri tehnička replikata (bunara) po eksperimentu. Eksperimenti su ponovljeni šest puta. Rezultati su prikazani sa standardnom greškom srednje vrednosti. Statistička analiza: t-test, poređenje EQ40 sa K1, EQ39 (ToxoDB#54), G13, BGD18 (\* $p < 0,5$ ; \*\* $p < 0,01$ ). Razlika između EQ40 i G13 nije bila statistički značajna.

### 2.3.3 Analiza egesa

Analiza egesa je rađena nakon 10 dana *in vitro* kulture kvantifikacijom broja plakova, koji su posledica smrti inficirane ćelije, u konfluentnom pokrivaču VERO ćelija. Kontrola za ovaj eksperiment su bile neinficirane VERO ćelije obojene 1% *crystal violet* rastvorom, koji se vezuje za kompletnu površinu ćelije, te se prisustvo plakova utvđuje vizuelno kao nedostatak boje. Pokazano je da su se plakovi formirali u svim inficiranim bunarima, dok u bunarima sa neinficiranim VERO ćelijama po očekivanju nisu primećeni plakovi. Gotovo trećina površine bunara u kojima su se nalazile ćelije inficirane tahizoitima genotipa EQ40 nije bila obojena, za razliku od svih ostalih bunara inficiranih tahizoitima ispitivanih genotipova loze III i kontrolnog soja BGD18 (ToxoDB#1), što ukazuje na to da je došlo do smrti najvećeg broja VERO ćelija. Zbog spajanja individualnih plakova, broj plakova za EQ40 nije mogao da bude utvrđen (Graf. 8).



**Grafikon 8.** VERO ćelije inficirane ispitivanim genotipovima loze III i kontrolnim BGD18 (ToxoDB#1) obojene 1% *Crystal violet* rastvorom. Reprerzentativna slika za tri izvedena eksperimenta. Ćelije su inficirane dozom od 0,5 MOI. Kontrolni soj RH (ToxoDB#1) nije korišćen u ovim eksperimentima jer



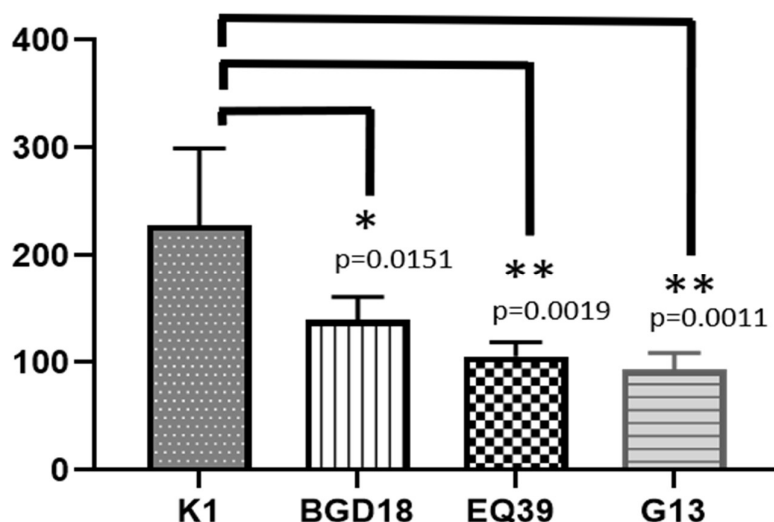
kompletno uništava ćelijski sloj u roku od 48-72 h. Plakovi su brojeni na uvećanju 5 X na celoj površini bunara

Kvantifikacija plakova u bunarima inficiranim tahizoitima genotipova K1, EQ39 (ToxoDB#54), G13 kao i kontrolnim sojem BGD18 (ToxoDB#1) pokazala je najviše plakova kod K1, a najmanje kod G13 (Tab. 9).

**Tabela 9.** Broj plakova nakon 10 dana infekcije ispitivanim sojevima i kontrolnim sojem BGD18 (ToxoDB#1). Prosečne vrednosti za svaki soj su dobivene iz tri tehnička replikata (bunara) po eksperimentu. Pregledana je cela površina bunara. Eksperimenti su ponovljeni dva puta.

Soj	Br. plakova nakon 10 dana (prosek)
BGD18 (ToxoDB#1)	139.8±8.6
K1	228.5±29.05
EQ39 (ToxoDB#54)	105.5±5.47
G13	93.6±6.2

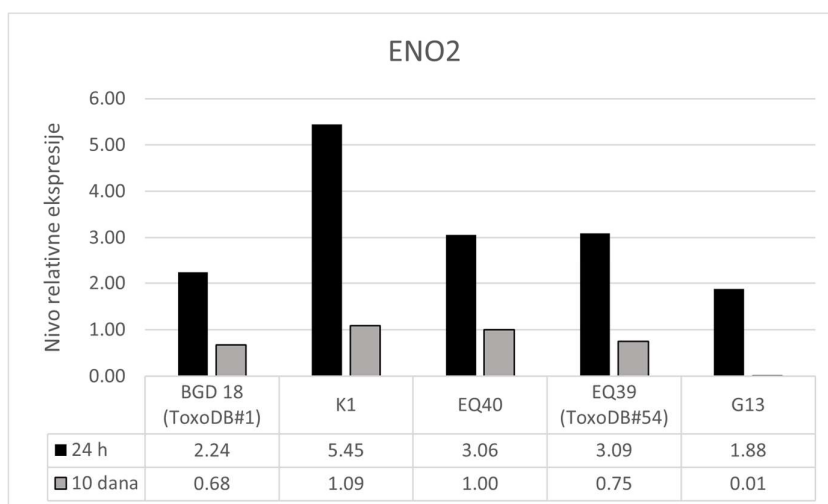
Statističko poređenje t-testom broja plakova u bunarima inficiranim tahizoitima K1 u odnosu na BGD18 (ToxoDB#1), EQ39 (ToxoDB#54) i G13 pokazalo je da su primećene razlike značajne (Graf. 9). Ovi rezultati su u potpunosti u korelaciji sa virulencijom utvrđenom *in vivo*.



**Grafikon 9.** Broj plakova 10 dana od infekcije VERO ćelija. Prosečne vrednosti za svaki genotip dobijene su iz tri tehnička replikata (bunara) po eksperimentu. Eksperimenti su ponovljeni dva puta. Rezultati su prikazani sa standardnom greškom srednje vrednosti. Statistička obrada: t-test, poređenje genotipa srednje virulencije K1, sa genotipovima niske virulencije, BGD18, EQ39, G13 (\* $p < 0,5$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

### 2.4 Analiza ekspresije gena ENO2, tahizoitske enolaze

Ekspresija tahizoitske enolaze (ENO2) utvrđena nakon 24 h bila je najviša kod genotipa K1, a najniža kod G13, dok su nivoi kod EQ40 i EQ39 (ToxoDB#54) gotovo isti. Nakon 10 dana *in vitro* kultivacije, ekspresije ENO2 bila je viša kod intermedijarno virulentnih genotipova K1 i EQ40 u odnosu na nisko virulentne G13 i EQ39 (ToxoDB#54) kao i kontrolni soj BGD18 (ToxoDB#1) (Graf. 10).

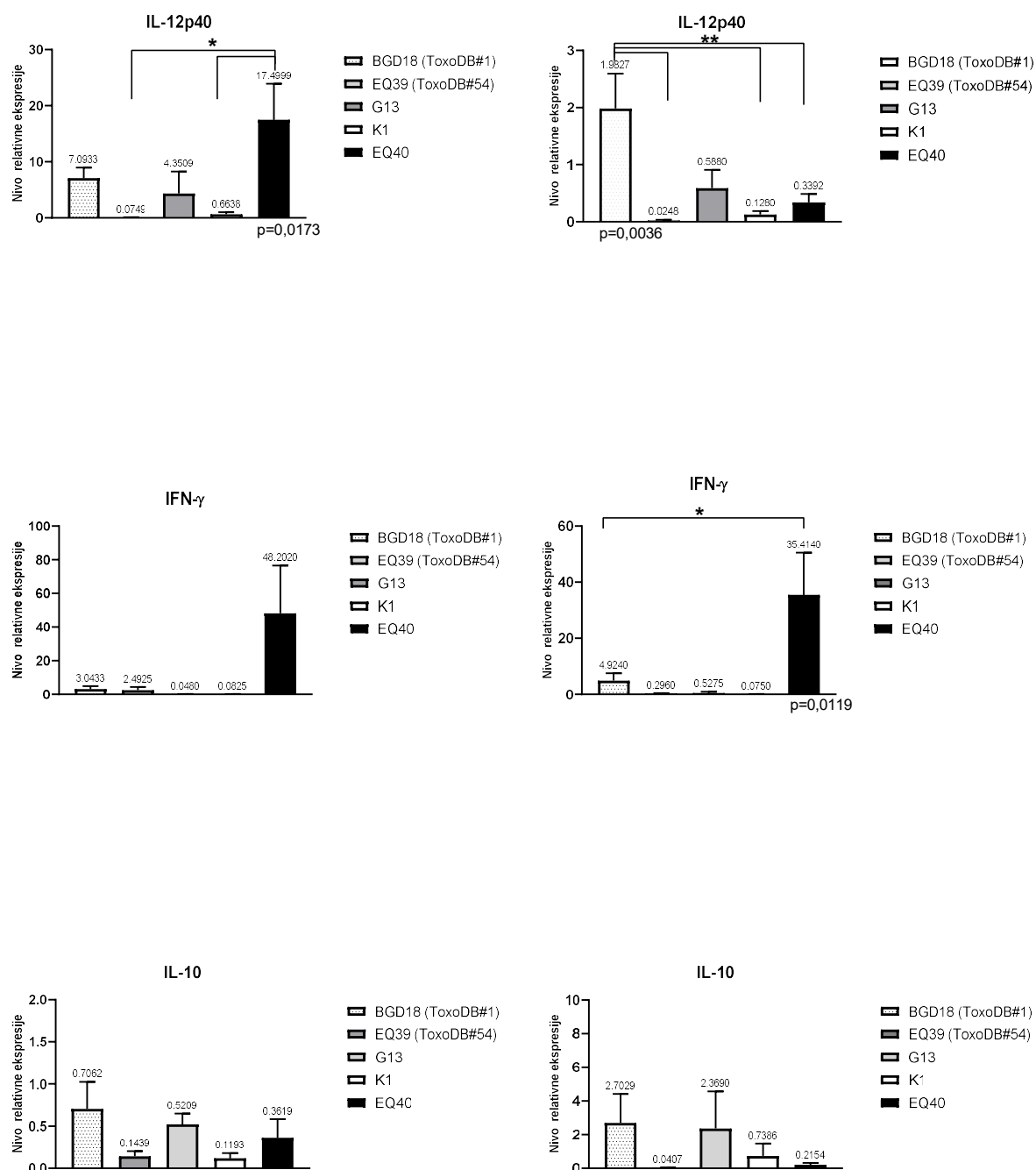


**Grafikon 10.** Nivo relativne ekspresije tahizoitske enolaze (ENO2) *in vitro* nakon 24 h i 10 dana. Uzorak tahizoita za analizu dobijen je iz tri bunara po eksperimentu. Prosečne Ct vrednosti na osnovu kojih je izračunat relativni nivo ekspresije dobijene su iz tri replikata PCR reakcije. Za normalizaciju je korišćen *T. gondii*  $\beta$ -actin, dok je kalibracija urađena tahizoitima soja RH (ToxoDB#10) izolovanim iz peritoneuma inficiranih Swiss Webster miševa nakon 3 dana infekcije.

## **3. Imunski odgovor domaćina nakon infekcije tahizoitima varijantnih genotipova loze III**

### 3.1 Analiza imunskog odgovora domaćina u ranoj infekciji

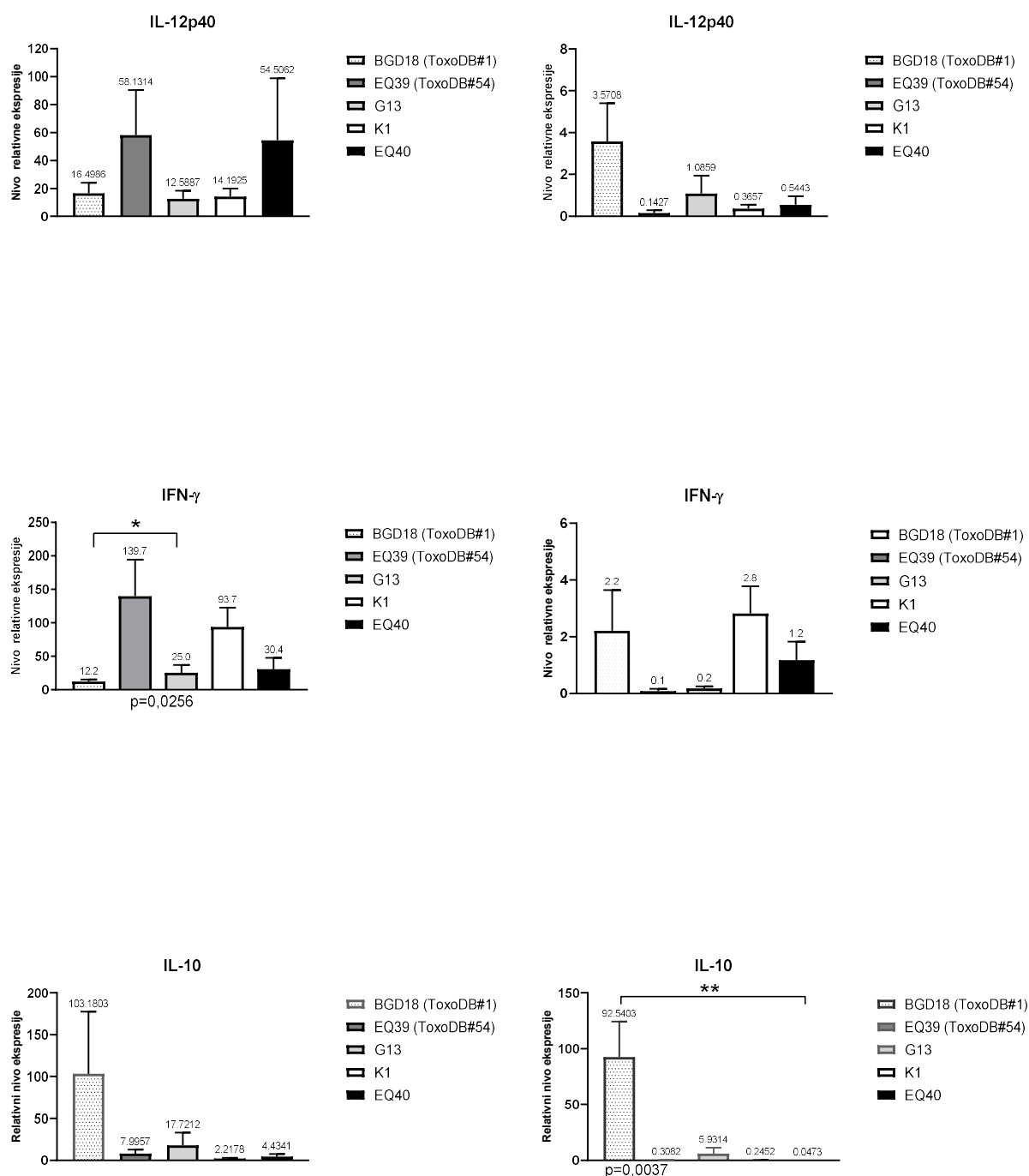
Analiza ekspresije gena u ranoj infekciji (7. dan) pokazala je statistički značajno najviši nivo IL-12p40 u mozgu miševa inficiranih genotipom EQ40 u odnosu na EQ39 (ToxoDB#54) i G13, dok je u slezini statistički značajno najviši nivo kod miševa inficiranih kontrolnim sojem BGD18 (ToxoDB#1) u odnosu na sve genotipove izuzev G13, iako je daleko niži od nivoa u mozgu. Najviši nivo IFN- $\gamma$  je detektovan i u mozgu i slezini miševa inficiranih genotipom EQ40, ali je razlika bila statistički značajna u odnosu na sve genotipove samo u slezini. Nivo IL-10 je izuzetno nizak (<1) u mozgu svih miševa, dok je u slezini ekspresija bila nešto viša kod nisko virulentnih genotipova BGD18 (ToxoDB#1) i G13 mada ne statistički značajno (Graf. 11).



**Grafikon 11.** Relativna kvantifikacija ekspresije IL-12p40, IL-10 i IFN- $\gamma$  u mozgu i slezini miševa 7. dana posle infekcije sa po 10 tahizoita ispitivanih genotipova *T. gondii*. Sa leve strane su prikazani rezultati ekspresije citokina u mozgu inficiranih Swiss Webster miševa (n=5), a sa desne strane u slezini. Rezultati su prikazani sa standardnom greškom srednje vrednosti. Statistička obrada: *one-way* ANOVA (\* $p < 0,5$ ; \*\* $p < 0,01$ ), sa *post hoc* Bonferroni korekcijom.

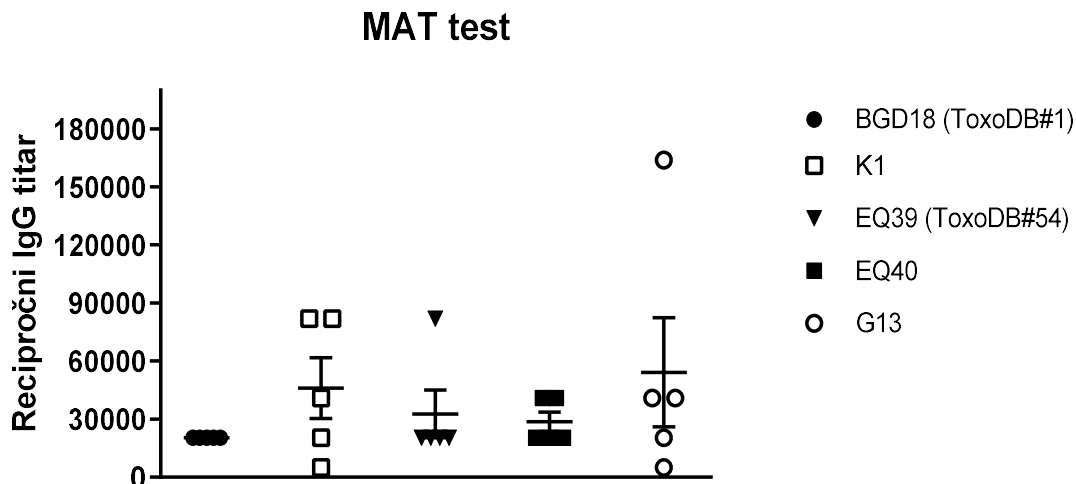
### 3.2 Analiza imunskog odgovora domaćina u kasnoj infekciji

Analiza ekspresije gena u mozgu miševa u kasnoj infekciji (42. dan) pokazala je visoke nivoe IL-12p40 nakon infekcije nisko virulentnim genotipom EQ39 (ToxoDB#54) kao i intermedijarno virulentnim EQ40, dok su nivoi u slezini značajno niži, a najviši kod nisko virulentnog genotipa BGD18 (ToxoDB#1). I nivo IFN- $\gamma$  je bio statistički značajno najviši u mozgu miševa inficiranih genotipom EQ39 (ToxoDB#54) u odnosu na BGD18 (ToxoDB#1) kao i G13, dok su najviši nivoi ovog citokina u slezini utvrđeni kod BGD18 (ToxoDB#1) i K1. Ekspresija anti-inflamatornog citokina IL-10 je bila statistički značajno najviša u mozgu i miševa inficiranih sa BGD18 (ToxoDB#1) u odnosu na sve ostale genotipove kao i u slezini, mada nije bilo statistički značajno. Nivoi IL-10 kod genotipova EQ39 (ToxoDB#54), K1 i EQ40 su bili izuzetno niski (<1) (Graf. 12).



**Grafikon 12.** Relativna kvantifikacija ekspresije IL-12p40, IL-10 i IFN- $\gamma$  u mozgu i slezini miševa 42. dana posle infekcije sa po 10 tahizoita ispitivanih genotipova *T. gondii*. Sa leve strane su prikazani rezultati ekspresije citokina u mozgu inficiranih Swiss Webster miševa (n=5), a sa desne strane u slezini. Rezultati su prikazani sa standardnom greškom srednje vrednosti. Statistička obrada: *one-way* ANOVA (\* $p < 0,5$ ; \*\* $p < 0,01$ ) sa *post hoc* Bonferroni korekcijom.

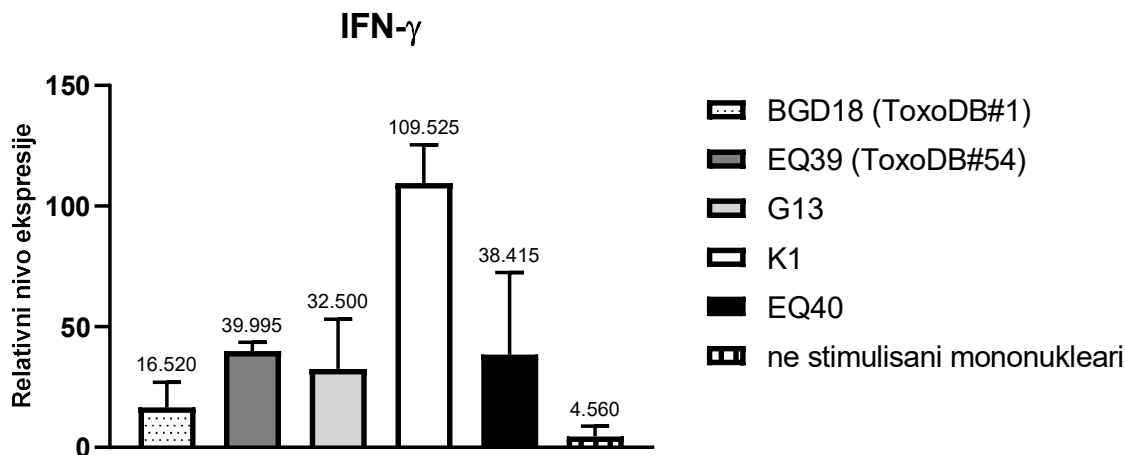
Uz ekspresiju gena u kasnoj infekciji određen je i nivo specifičnih IgG antitela. Rezultati su pokazali da razlike u nivou između grupa miševa inficiranih ispitivanim genotipovima nisu statistički značajne, iako je primećen trend da su srednje vrednosti kod svih izolata loze III više u odnosu na srednju vrednost kod kontrolnog soja BGD18 (ToxoDB#1) (Graf. 13).



**Grafikon 13.** Nivo *T. gondii* specifičnih IgG antitela kod miševa 42. dana posle infekcije. Rezultati MAT testa za n=5 miševa po genotipu. Prosečne vrednosti: BGD18 (ToxoDB#1):**20480**, K1:**46080**, EQ39(ToxoDB#54):**32768**, EQ40:**28672**, G13:**48872**. Razlike nisu statistički značajne

#### 4. IGRA test

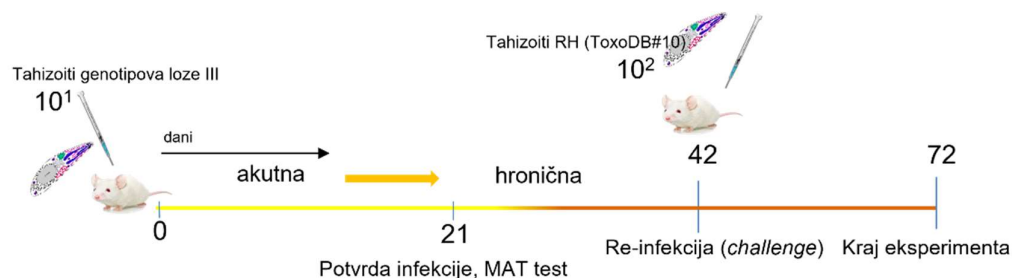
Najviša relativna ekspresija nakon re-stimulacije mononuklearnih ćelija periferne krvi STAg antigenom utvrđena je kod genotipa K1, dok je najniža bila kod kontrolnog soja BGD18 (ToxoDB#1). Vrednosti ekspresije kod genotipova EQ39 (ToxoDB#54), EQ40 kao i G13 bile su vrlo slične. Statističkih razlika između nivoa ekspresije nije bilo (Graf. 14).



**Grafikon 14.** Relativni nivo ekspresije IFN- $\gamma$  u mononuklearnim ćelijama periferne krvi stimulisanim sa STAg antigenom. Prikazane su srednje vrednosti dobijene iz 2-3 individualna miša za svaki genotip. Ne-stimulisani mononukleari potiču iz 2 miša inficirana genotipom G13.

## 5. Preživljavanje i analiza imunskog odgovora domaćina nakon re-infekcije

Funkcionalna analiza stečenog imunskog odgovora na infekciju ispitivanim genotipovima loze III, kao i kontrolnog soja BGD18 (ToxoDB#1) odnosila se na kapacitet imunskog odgovora da zaštiti miševe od letalnog ishoda infekcije visoko virulentnim genotipom ToxoDB#10. Infektivna doza u primarnim infekcijama je iznosila  $10^1$  tahizoita, što je subletalna doza za sve ispitivane genotipove, dok je re-infekcija RH sojem (ToxoDB#10) rađena infektivnom dozom od  $10^2$  tahizoita. Preživljavanje miševa je praćeno do 30 dana nakon re-infekcije (Graf. 15).



**Grafikon 15.** Šematski prikaz eksperimenta (*challenge*) re-infekcije

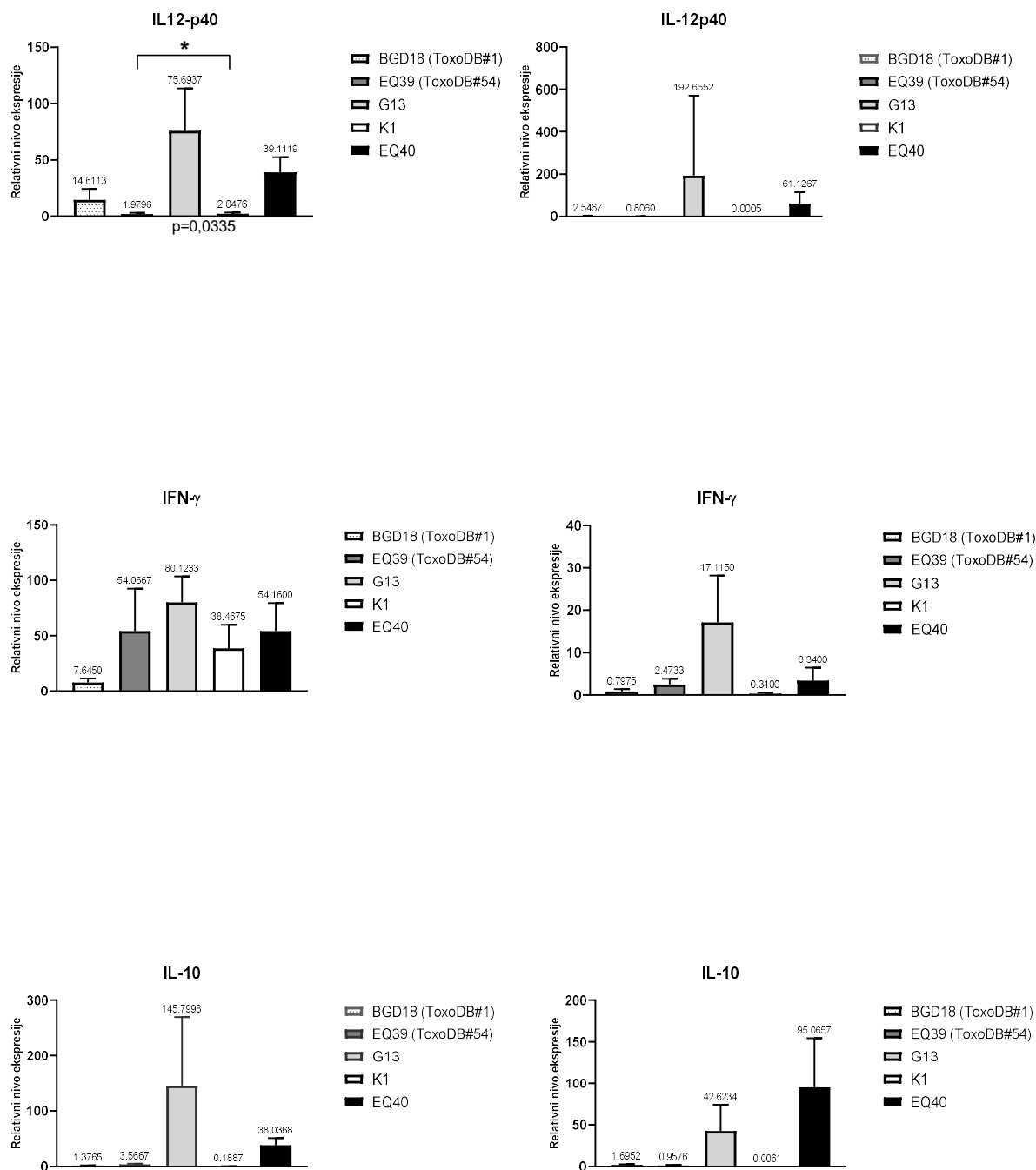
Svi miševi koji su bili inficirani ispitivanim izolatima loze III kao i kontrolnim genotipom BGD18 (ToxoDB#1) su preživeli re-infekciju visoko virulentnim genotipom ToxoDB#10 (Tab. 10).

**Tabela 10.** Preživljavanje miševa imunizovanih ispitivanim sojevima *T. gondii* 30 dana nakon re-infekcije visoko virulentnim genotipom ToxoDB#10. Broj miševa inficiranih ispitivanim genotipovima kao i kontrolnim sojem BGD18 (ToxoDB#1) iznosio je po 10 u svakoj grupi. Re-inficirano je po 5 miševa, osim za K1 i EQ39 (ToxoDB#54) jer su po dve životinje uginule u kasnoj fazi (>30 dana) primarne infekcije kod oba genotipa, a dve životinje su isključene iz eksperimenta zbog povreda i lošeg opšteg izgleda.

Soj	Virulencija	Br. inficiranih	Br. potvrđeno inficiranih	Br. re-inficiranih	Preživeli (% preživljavanja)
<b>BGD18 (ToxoDB#1)</b>	Niska	10	10	5	5 (100%)
<b>EQ40</b>	Srednja	10	7	5	5 (100%)
<b>K1</b>	Srednja	10	6	4	4 (100%)
<b>EQ39 (ToxoDB#54)</b>	Niska	10	7	3	3 (100%)
<b>G13</b>	Niska	10	9	5	5 (100%)

Analiza ekspresije IL-12p40 30. dana nakon re-infekcije pokazala je statistički značajno viši nivo u mozgu miševa inficiranih genotipom G13 u odnosu na EQ39 (ToxoDB#54) i K1, dok je u slezini takođe najviši nivo detektovan kod G13, iako ova razlika nije bila statistički značajna. Sem G13, značajni nivoi ekspresije su bili i kod genotipa EQ40, dok su kod ostalih genotipova izuzetno niski. Ekspresija IFN- $\gamma$  u mozgu bila je vrlo slična kod svih genotipova izuzev kontrolnog soja BGD18 (ToxoDB#1), kod kojih je bila najniža, dok je najviši nivo detektovan u slezini miševa inficiranih genotipom G13. Kod G13 je takođe utvrđen najviši nivo IL-10 u mozgu, koji je bio nešto niži kod miševa inficiranih sa EQ40. U slezini, najviši nivo ekspresije

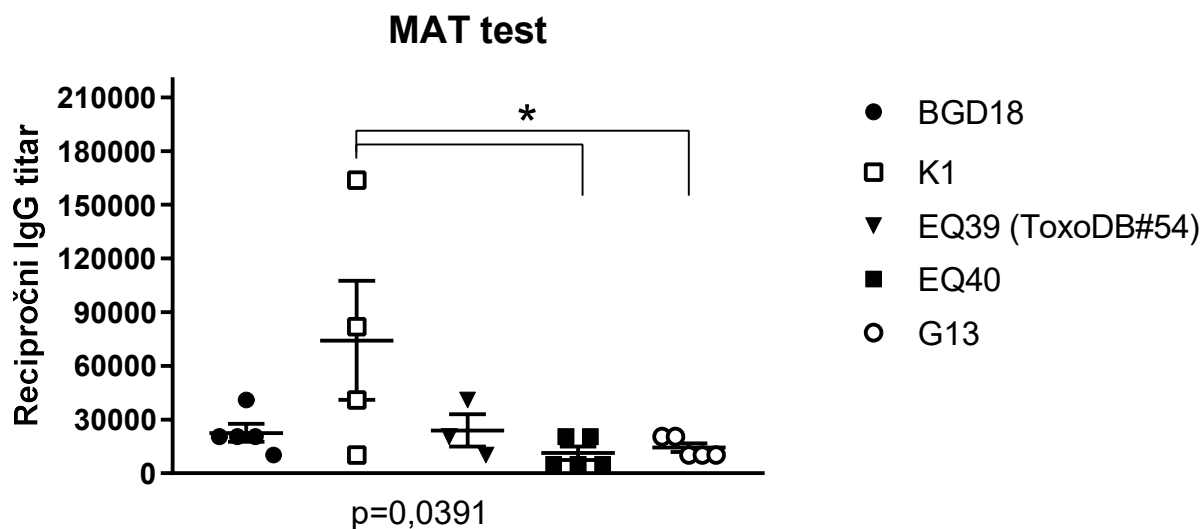
IL-10 bio jekod miševa inficiranih sa EQ40, a nešto niži kod miševa inficiranih sa G13, ali ova razlika nije bila statistički značajna (Graf. 16).



**Grafikon 16.** Relativna kvantifikacija ekspresije IL-12p40, IL-10 i IFN- $\gamma$  u mozgu i slezini miševa imunizovanih ispitivanim genotipovima *T. gondii* 30 dana posle re-infekcije visoko virulentnim genotipom ToxoDB#10. Sa leve strane su prikazani rezultati ekspresije citokina u mozgu, a sa desne u slezini. Rezultati su prikazani sa standardnom greškom srednje vrednosti. Statistička obrada: *one-way* ANOVA (\*p < 0,5; \*\*p < 0,01) sa *post hoc* Bonferroni korekcijom.



Testom modifikovane aglutinacije urađenim 30 dana nakon re-infekcije pokazano je da je nivo specifičnih IgG antitela bio najviši u serumima miševa inficiranih genotipovima K1 i RH (ToxoDB#10), što je bilo i statistički značajno u odnosu na nivoe kod miševa inficiranih genotipovima EQ40 i G13. Najniži nivo specifičnih antitela detektovan je kod miševa inficiranih genotipovima G13 i RH (ToxoDB#10) (Graf. 17).



**Grafikon 17.** Nivo *T. gondii*-specifičnih IgG antitela kod miševa (n=5) 30 dana nakon re-infekcije. Prosečne vrednosti: BGD18 (ToxoDB#1):**22528**, K1:**74240**, EQ39(ToxoDB#54):**23893,3**, EQ40:**11264**, G13:**14336**. Statistička obrada: *one-way* ANOVA (\*p < 0,5; \*\*p < 0,01) sa *post hoc* Bonferroni korekcijom.

## Diskusija

### 1. Populaciona struktura parazita *T. gondii* u prelaznim domaćinima u Srbiji

Analiza populacione strukture genotipova *T. gondii* izolovanih ili detektovanih u prelaznim domaćinima u Srbiji zasnovana je na 67 sojeva, od kojih je 24 poreklom iz ljudi, 15 iz četiri vrste domaćih životinja (*Equus caballus*, *Gallus gallus domesticus*, *Ovis aries*, *Sus scrofa*), 3 iz gradskih golubova (*Columba livia*) i 25 iz tri vrste divljih kanida (*Canis aureus*, *Vulpes vulpes*, *Canis lupus*) (Fig.1). Genotipovi loze II čine većinu strukture, pri čemu je arhetip (ToxoDB#1) dominantan, što je i očekivano prema podacima iz literature koji se odnose na Evropu (Peyron et al., 2006; DeCraye et al., 2011; Su et al., 2012; Hermann et al., 2012; Can et al., 2014; Vilares et al., 2014; Marković et al., 2014; Calero-Bernal et al., 2015; Vilares et al., 2017; Kuruca et al., 2019; Fernandez-Escobar et al., 2020). Diverzitet je nizak, čak 41,7 % populacije se sastoji od samo dva genotipa, arhetipa loza II (ToxoDB#1) i III (ToxoDB#2), koji su nisko virulentni (Howe i Sibley, 1995; Dubey, 1998; Su et al., 2002). Genotipovi loze I, koji su retki, nisu detektovani u Srbiji, ali je primećeno prisustvo alela tipa I kod nekolicine ispitanih sojeva različitih genotipova, što je u skladu sa ranijim nalazima kod životinja i ljudi u Evropi (Montoya et al., 2008; Ajzenberg et al., 2009; Turčekova et al., 2014; Calero-Bernal et al., 2015). Objašnjenje za odsustvo genotipova loze I u Srbiji može biti činjenica da je ova loza globalno nefrekventna, vrlo verovatno zbog visoke virulencije, koja uslovljava skraćeno vreme transmisije kod osetljivih domaćina i ujedno implicira užu spektar domaćina podobnih za značajnu geografsku diseminaciju (Su et al., 2003; Su et al., 2012).

Interesantno je da su genotipovi loze III u Srbiji većinom detektovani kod ljudi (35,2%), iako nema izolata, dok je kod domaćih i divljih životinja detektovano svega 23,2 %, ali postoji značajan broj izolata. Ovi nalazi su u skladu sa nalazima iz drugih zemalja, jer se genotipovi loze III i globalno retko izoluju iz ljudskih tkiva ([www.toxodb.org](http://www.toxodb.org); Ajzenberg et al., 2009). Iako eksperimentalne potvrde za sada nema, nalazi mogu biti posledica potencijalne imunološke barijere, u vidu specifičnih mehanizama rezistencije prisutnih kod ljudi, koji drastično smanjuju broj tahizoita ili tkivnih cista genotipova loze III. Imajući u vidu da se izolacija sojeva kod ljudi vrši samo iz telesnih tečnosti (krv, plodova voda, očna vodica ili cerebrospinalna tečnost) i da je moguća samo tokom rane infekcije, koja se izuzetno retko dijagnostikuje, ili reaktivacije, i inače je otežana kod ljudi. Ukoliko je pak broj tahizoita genotipova loze III drastično niži kod čoveka u odnosu na broj tahizoita drugih genotipova koji se češće izoluju, izolacija ovih genotipova bi bila moguća samo u retkim slučajevima.

Ubedljiva globalna dominacija arhetipa loze II (ToxoDB#1) kod ljudi i domaćih životinja se objašnjava kao posledica diseminacije ovog genotipa na razne kontinente od strane ljudi ali i određenim genetskim adaptacijama, koje za rezultat imaju fenotip sa povišenim kapacitetom za infekciju tkivnim cistama i niska virulencija, kao odlikama koje značajno doprinose transmisiji (Su et al., 2003; Shwab et al., 2018; Hassan et al., 2019; Galal et al., 2019a, b). Ali, imajući u vidu da arhetip loze II (ToxoDB#1) nije jedini genotip sa povišenim kapacitetom za infekciju tkivnim cistama, niti jedini nisko virulentan genotip, nejasno je zašto genotipovi kao što je i arhetip loze III (ToxoDB#2), nisu jednako učestali. Iako se čovek ne smatra značajnim rezervoarom *T. gondii*, uprkos visokoj prevalenciji infekcije kod ljudi, a postoji značajna razlika između arhetipova loze II (ToxoDB#1) i III (ToxoDB#2) upravo u učestalosti u ljudskoj populaciji, postavlja se pitanje da li postoje druge adaptacije koje pospešuju infekciju čoveka, koje bi objasnile ubikvitarnost arhetipa loze II (ToxoDB#1) (Howe i Sibley, 1995; Howe et al., 1997; Ayala, 1998; Montoya i Liesenfeld, 2004). Interesantno je da je čovek zapravo domaćin iz kojega je transmisija retka jer je predominantno vertikalna, ali ga zato karakteriše dug prosečan

životni vek, što je možda usmerilo evoluciju arhetipa loze II (ToxoDB#1) ka parazitiranju čoveka.

### Populaciona struktura *T. gondii* kod divljih kanida

Iako je loza III globalno distribuirana, u Evropi su genotipovi ove loze većinom detektovani na jugu kontinenta, posebno u zoni Mediterana, za razliku od genotipova loze II koji su rasprostranjeni ravnomerno po celom kontinetu. Za sada je u Evropi najčešće izolovan arhetip loze III (ToxoDB#2), dok su izolati varijantnih genotipova retki. Analiza populacione strukture genotipova *T. gondii* iz Srbije je pokazala da su oni koji kruže silvatično većinom varijantni (60,7 %) dok ih je u domaćoj sredini manje od polovine (46,1%) (Graf.1, 2). U divljim kanidama su najviše detektovani varijantni genotipovi loze II (44 %), ali i jedan loze III (soj 124-16) iz lisice, dok su sojevi 121-16 iz lisice i 075-16 iz zlatnog šakala, takođe mogući pripadnici loze III (Tab.1) (Uzelac et al., 2019). Visok diverzitet populacije genotipova u silvatičnoj sredini je očekivan, jer je dobro opisana dihotomija diverziteta genotipova *T. gondii* koji kruže u domaćoj u odnosu na silvatičnu sredinu (Khan et al., 2014; Jiang et al., 2018; Galal et al., 2019). Ovo je posebno izraženo u delovima sveta gde još uvek postoje velika prirodna prostranstva u kojima je gustina ljudske populacije ekstremno niska, kao što je veliki deo severozapada SAD, gde uz globalne loze I, II i III kruži i autohtona loza haplotip 12 (loza X) koja je isključivo prisutna u silvatičnoj sredini, i Amazonija u južnoj Americi, gde takođe kruže genotipovi koji nisu srodni autohtonim brazilskim lozama BrI-IV (Pena et al., 2008; Khan et al., 2011, Mercier et al., 2010; Galal et al., 2019).

Ali, čak su i u pojedinim delovima Evrope, kao npr na jugu Italije, detektovani atipični genotipovi kod divljih svinja, što ukazuje na postojanje populacije višeg diverziteta nego što je očekivano prema nalazima iz ranijih godina, koji su uglavnom bili zasnovani na genotipovima detektovanim kod domaćih životinja (Sgroi et al., 2020). Sem toga, učestalost ToxoDB#1 u silvatičnim sredinama je očekivano niža, što dodatno podstiče sumnje da je čovek ključan za diseminaciju ovog genotipa (Lehmann et al., 2006; Shwab et al., 2018). Iako je u Srbiji u silvatičnoj sredini prisutan značajan diverzitet, poređenjem broja različitih genotipova kod zlatnih šakala i lisica pokazano je svega 6/13 različitih kod zlatnih šakala, ali 8/9 kod lisica. Nizak diverzitet populacije genotipova detektovanih u uzorcima zlatnih šakala je zapravo karakterističan za domaću sredinu, jer je kod domaćih životinja za sada detektovano svega 6/15 različitih genotipova. Imajući u vidu da su obe životinje mezopredatori koji su omnivore i dele staništa koja su često u blizini naseljenih mesta, poreklo razlika u diverzitetu populacije genotipova je vrlo verovatno u različitoj dostupnosti izvora hrane.

Ispitivanjem površinskih voda u Srbiji nedavno je utvđeno prisustvo oocista *T. gondii* u Drini, Dunavu i Mlavi, što ističe značaj vode kao rezervoar parazita, pogotovo za divlje životinje (Ćirković et al., 2020). Ali, različit pristup izvorima površinske vode u ovom slučaju ne objašnjava nalaze, jer voda na celokupnoj teritoriji sa koje potiču analizirane životinje ne predstavlja ograničeni resurs, te se podrazumeva podjednak pristup svim izvorima. Ishrana lisica i zlatnih šakala je vrlo slična i sastoji se od sitnih sisara i ptica, ali se obe životinje neretko hrane i strvinama, a ponekad i antropogenim otpadom (Ranc et al., 2018). Ispitivanje želudačnog sadržaja zlatnih šakala izlovljenih u Srbiji je potvrdilo da se ove životinje često hrane mesom domaćih životinja, ali zapravo otpadom koji nije upotrebljiv za ljudsku ishranu (Penezić, 2016). Ovo ukazuje na to da se u ruralnim sredinama nakon klanja domaćih životinja otpad baca na divlje deponije koje su lako dostupne divljim životinjama. Poražavajuća je i činjenica da su ispitivane životinje poreklom iz raznih krajeva zemlje, što ukazuje na visok stepen zagađenosti prirodne sredine. Ova praksa omogućava zlatnim šakalima da retko love da bi se prehranili i uslovljava ih da redovno posećuju divlje deponije ili da se nastane u neposrednoj blizini ruralnih domaćinstava kao izvora lako dostupne hrane (Ćirović et al., 2014; Uzelac et al., 2019).

Pozitivan doprinos ove prakse kao i sposobnosti šakala da se adaptira i prihvati nove izvore hrane, nesumnjivo je porast brojnosti populacije vrste koja je u prošlom veku bila gotovo istrebljena u Evropi surovom metodom trovanja, ali koja se sada brzo širi sa Balkana ka drugim delovima kontinenta (Lanszki et al., 2006, Ćirović et al., 2014). Populacija zlatnih šakala u Evropi se procenjuje na između 97,000 i 117,000 jedinki, ali se velike reproduktivne populacije nalaze uglavnom u Bugarskoj, Mađarskoj i Srbiji (Ranc et al., 2018). Imajući u vidu da je broj zlatnih šakala u centralnoj, zapadnoj pa i severnoj Evropi manji, ovi nalazi genotipova kao i prevalencije toksoplazmoze koja je iznosila čak 25% predstavljaju prve podatke za Evropu (Uzelac et al., 2019). Između ostalog pokazuju i da je zlatni šakal značajan prirodan rezervoar *T. gondii*, iako je *T. gondii* samo jedna od 194 za sada detektovanih vrsta parazita kod ovih životinja (Gherman et al., 2017). Činjenica pak da je zlatni šakal migrirajuća vrsta koja potiče iz srednje Azije, ističe njen doprinos u širenju genotipova *T. gondii* pa i drugih parazita ka Evropi.

Genotipovi loze II su najučestaliji kod lisica u svetu, dok su genotipovi loze III retki (De Craeye et al., 2011; Hermann et al., 2012; Wei et al., 2021), što je u skladu sa nalazima u Srbiji, jer 78% populacije genotipova čini loza II. Ali, diverzitet populacije genotipova kod lisica u Srbiji nije karakterističan za ostale delove Evrope, gde se uglavnom nalazi arhetip loze II (ToxoDB#1) (De Craeye et al., 2011; Hermann et al., 2012). Viši diverzitet genotipova u Srbiji se može objasniti izvorima hrane dostupnim liscama u Srbiji za razliku od lisica u ostalim delovima Evrope. Naime, imajući u vidu da se zlatni šakali često hrane antropogenim otpadom, postavlja se pitanje zašto lisice ne eksploatišu isti lako dostupan izvor hrane. Jedno objašnjenje, koje je podržano opservacijama lovaca u Srbiji da se brojnost lisica u staništima sa velikim brojem zlatnih šakala zapravo smanjuje, jeste postojanje supresije od strane vršnog predatora (engl. *top-down suppression*) (Penezić, 2016; Newsome et al., 2017).

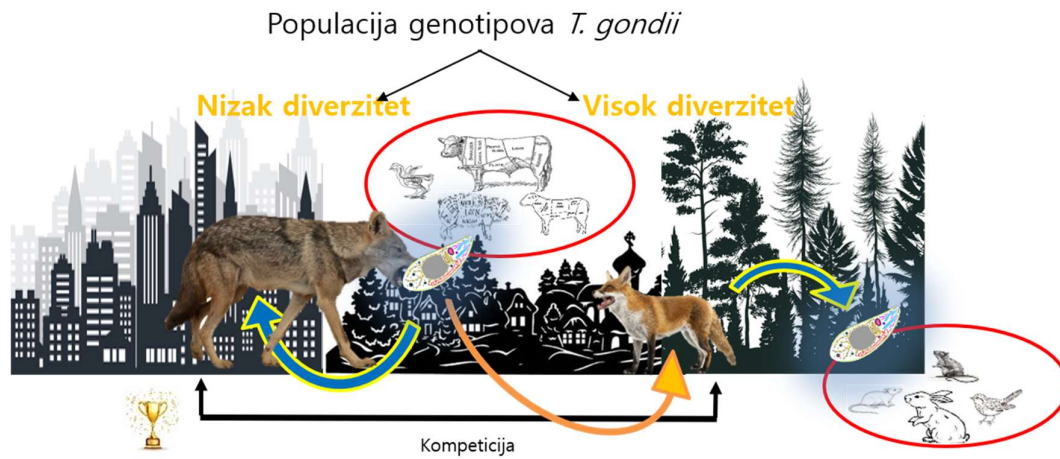
Zlatni šakali su prosečno veći, a često i teži od lisica, te u odsustvu pravih vršnih predatora, kao što je sivi vuk, zlatni šakali mogu da oponašaju vršne predatore u smislu prostorne dominacije u staništu kao i nad izvorima hrane (Newsome et al., 2017; Feit et al., 2019). Kada su lisice u pitanju, prisustvo zlatnih šakala u ulozi vršnih predatora ih vrlo verovatno uslovljava da love divlje životinje da bi se prehranile i prisiljava ih da se presele u sasvim druga staništa ili na obode staništa koje dele sa zlatnim šakalima, ali koji su udaljeniji od ljudskih naselja (Newsome et al., 2017) (Graf. 18). Visok diverzitet genotipova *T. gondii* prisutan kod lisica je iz ovih razloga mogući pokazatelj diverziteta genotipova koji cirkulišu u sitnim sisarima i pticama u silvatičnoj sredini. S druge strane, moguće objašnjenje za nizak diverzitet populacije genotipova *T. gondii* kod lisica u ostalim delovima Evrope upravo je u odsustvu zlatnih šakala ili prisustvu malog broja jedinki, te je liscama lakše dostupan antropogeni otpad (Graf. 18).

Sivi vukovi, čija populacija je u Srbiji nedavno procenjena na oko 800 jedinki, uglavnom nastanjuju šumovite, planinske, slabo naseljene krajeve na jugoistoku i jugozapadu zemlje, dok je manji deo populacije prisutan u jugoistočnoj Vojvodini, jedinom području u Srbiji gde je vuk zaštićen od lova (Teodorović et al., 2014; Ćirović i Penezić, 2019). Iako je ispitano samo 10 sivih vukova na prisustvo gDNK *T. gondii* u uzorcima srca, dve životinje su bile pozitivne, pri čemu su detektovana dva različita varijantna genotipa, jedan loze II, a drugi loze II ili III (Uzelac et al., 2019). Imajući u vidu da je sivi vuk vršni predator, jedan od retkih preostalih u Evropi, u njegovu ishranu se ubrajaju gotovo sve životinje koje se nalaze u staništu, bilo divlje ili domaće, kao i svi ostali mogući izvori hrane, uključujući i antropogeni otpad (Fleming et al., 2017; Ćirović i Penezić, 2019). Teodorović i saradnici (2014) su pokazali da su kod sivih vukova najčešće detektovane larve *Trichinella britovi*, koja kruži u silvatičnoj sredini, u odnosu na vrstu *Trichinella spiralis*, koja kruži u domaćoj sredini. Ovo ukazuje na to da domaće životinje ili antropogeni otpad ipak nisu primarni izvori hrane za sive vukove, iako je kasnije pokazano da u Srbiji mogu biti suplementarni izvor hrane u zimskim uslovima, ali ne i u drugim staništima u Evropi (Wagner et al., 2012; Ćirović i Penezić, 2019). Implikacija ovih nalaza je da su vukovi skloniji lovu nego oportunističkom hranjenju otpadom, možda iz razloga što prema nekim

procenama, vuk konzumira do čak 10 kg hrane dnevno u zavisnosti od težine i sezone, a veličina čopora takođe sezonski varira, od maksimalno 6 zimi, do 10 jedinki (odraslih i mladunaca) leti, te održavanje jednog čopora zahteva značajnu količinu hrane i nije isključeno da jednostavno prevazilazi količine dostupne na mestima gde se odlaže antropogeni otpad (Peterson i Ciucci, 2003; Stahler et al., 2006; Fernandez-Gil et al., 2020).

Nalazi *T. gondii* genotipova kod lisica i sivih vukova u Srbiji, u odnosu na nalaze kod lisica u Evropi, ukazuju na to da je diverzitet populacije genotipova u silvatičnoj sredini u Srbiji visok. Ovo je delimično očekivano, imajući u vidu da je prisustvo genotipova loze III u južnoj Evropi učestalije nego u ostalim delovima kontinenta. Sa visokim diverzitetom i velikim brojem varijantnih genotipova u silvatičnoj sredini, raste i verovatnoća za prisustvo virulentnih genotipova, što je jasno pokazano u južnoj Americi, na primeru Amazonske toksoplazmoze, kao i nedavno na primeru nekoliko teških slučajeva toksoplazmoze kod imunokompetentnih ljudi u SAD, zaraženih genotipovima haplotipa IV, loze X, koja cirkuliše u divljači (Demar et al., 2007; Carme et al., 2009; Schumacher et al., 2020).

Prelaz virulentnih genotipova iz silvatične u domaću sredinu se, na osnovu ovih nalaza, događa kada se čovek zajedno sa domaćim životinjama nastani na rubu silvatične sredine gde su potencijalno izloženi vodi kontaminiranoj oocistama i kada meso divljači uđe u lanac ishrane. Amazonija i ogromna prostranstva prekrivena gustom šumom na severozapadu SAD predstavljaju oblasti divljine koje su neuporedive sa Evropom, gde je velika većina prirodnih sredina isprekidana manje ili više urbanim sredinama. Posledica je da mnogi ljudi žive na obodima silvatičnih sredina, a mnoge divlje životinje, na obodima urbanih sredina. Na primeru zlatnih šakala u Srbiji pokazano je da divlje životinje, koje su rezervoari raznih parazita, zahvaljući čovekovoju intervenciji postaju rezervoari za genotipove *T. gondii* koji cirkulišu u domaćoj sredini, što ide u prilog širenju nisko virulentnog arhetipa II (ToxoDB#1) i smanjenju diverziteta populacije genotipova u čovekovom okruženju, kao što je slučaj u severnoj Americi i Brazilu (Silva et al., 2014; Jiang et al., 2018, Uzelac et al., 2019) (Graf. 18). Ali, imajući u vidu da je zlatni šakal migrirajuća vrsta poreklom iz srednje Azije koja se širi ka severnoj Evropi, te poseduje visok kapacitet za distribuciju *T. gondii* preko velikih geografskih teritorija, ističe se kao mogući vektor za inter i intra kontinentalnu razmenu genotipova. Na osnovu nalaza iz lisica, za koje je pokazano da su primarno rezervoari za genotipove koji ne cirkulišu u domaćoj sredini, ali dele staništa sa šakalima, postavlja se pitanje da li u Srbiji uopšte postoje genotipovi koji su isključivo silvatični ili cirkulacija ipak nije prostorno ograničena. U ovom kontekstu značajan je podatak da je jedan deo ispitanih lisica izlovljen nadomak Beograda, u Surčinu, i da je genotip 061-13, detektovan u lisici, vrlo verovatno identičan genotipu K1, izolovanom iz domaće, slobodnoživeće kokoške, koje važe za izuzetne bioindikatore zagađenosti okoline sa oocistama (Dubey et al., 2020). Ukoliko je cirkulacija genotipova između domaćih i divljih životinja neograničena, utvrđivanje virulencije varijantnih genotipova *T. gondii* postaje od značaja za javno zdravlje.



**Grafikon 18.** Šematski prikaz cirkulacije genotipova *T. gondii* kod zlatnih šakala i lisica

## 2. Biološka karakterizacija varijantnih genotipova loze III

### Identifikacija genotipova i geografska rasprostranjenost

Između 2012. i 2017. godine, u našoj laboratoriji su izolovana četiri različita soja koja predstavljaju varijantne genotipove loze III iz domaćih životinja i jednog gradskog goluba. Pretraga elektronske baze ToxoDB ([www.toxodb.org](http://www.toxodb.org)) na osnovu MnPCR-RFLP rezultata je pokazala da genotipovi sojeva EQ40, K1 i G13 do sada nisu pohranjeni, tj. da su možda novoprepoznati, dok je genotip soja EQ39 identifikovan kao ToxoDB#54, koji je ranije izolovan iz morskih vidri u severnoj Americi (Tab. 2) (Dubey et al., 2014; Uzelac et al., 2020). Genotipizacija sojeva EQ40, EQ39 (ToxoDB#54) i G13 takođe je rađena i analizom dužina MS markera, kojom je pokazano je da je genotip EQ40 identičan onim ranije izolovanim iz kože u Gabonu, svinje u Portugalu (soj TgPiPr14) i ovce u Francuskoj (de Sousa et al., 2006; Halos et al., 2010; Mercier et al., 2010; Klun et al., 2017; Uzelac et al., 2020). Filogenetska analiza je pokazala da su genotipovi EQ39 (ToxoDB#54), EQ40 i G13 međusobno dosta udaljeni, što nije karakteristično za Evropu, gde cirkulišu većinski srodni genotipovi a diverzitet populacije je nizak. Imajući u vidu da su ToxoDB#54 i EQ40 rasprostranjeni na dva kontinenta, očigledno kao rezultat vrlo uspešne transmisije kroz vreme i prostor, moguće je da su importovani sa drugih kontinenta, dok su G13 i K1 prema dosadašnjim podacima prisutni samo u Srbiji (Klun et al., 2017). Ovi podaci ukazuju na mogućnost da je genotip EQ40, koji je endemski u Evropi, zapravo afričkog porekla. Činjenice da su u Turskoj iz ljudi i životinja izolovani genotipovi loze *Africa 1*, a da je i u Srbiji detektovan atipičan soj genotipa koji je srodan lozi *Africa 1*, indicija je za to da je region koji obuhvata jug Evrope, Mediteranski basen i mala Azija, zapravo geografski pojas u kojem dolazi do mešanja populacija genotipova *T. gondii* sa dva kontinenta i dodaje kredibilitet hipotezi afričkog porekla mnogih genotipova koji cirkulišu ne samo u Evropi, već i severnoj Americi i Aziji (Lehmann et al., 2006; Mercier et al., 2010; Döşkaya et al., 2013; Štajner et al., 2013; Can et al., 2014). Razmena genotipova objašnjava donekle dosta visok diverzitet populacije genotipova u prelaznim domaćinima u Srbiji, nasuprot centralnoj i severnoj Evropi, ali je i razlog za zabrinutost, imajući u vidu da su genotipovi loza *Africa 1* i *Africa 3* prema nekim podacima virulentni (Mercier et al., 2010; Marković et al., 2014; Kuruca et al., 2019; Uzelac et al., 2019).

### Virulencija in vivo, vreme smrtnosti, parametri morbiditeta i tipizacija gena markera virulencije

Kaplan-Mejer krive preživljavanja nakon infekcija sa svim ispitivanim genotipovima su pokazale različite profile (Graf 4). Na osnovu parametra kumulativnog mortaliteta, sojevi EQ40 i K1 se klasifikuju kao srednje virulentni, dok su G13 i EQ39 (ToxoDB#54) kao i BGD18 (ToxoDB1) niske virulencije, što je u skladu sa prethodno publikovanim rezultatima za ToxoDB#1 i ToxoDB#54 (Tab. 4) (Su et al., 2002, Dubey et al., 2014). Visok kumulativni mortalitet, kao i podatak da je najveći procenat miševa inficiranih genotipom EQ40 uginuo u roku od 15 dana nakon infekcije je u skladu sa rezultatima dobivenim za portugalski izolat TgPiPr14 koji je izazvao najveću smrtnost u roku od 12 dana (de Sousa et al., 2006). Nasuprot ovome, smrtnost je nakon infekcije sa nisko virulentnim izolatima bila sporadična. Smrtnost tokom rane faze infekcije je karakteristična za visoko virulentne genotipove, kao što je pokazano za arhetip I (ToxoDB#10), a ovde i za EQ40 i K1 (Sibley i Boothroyd, 1992; Khan et al., 2009). S druge strane, smrtnost kod arhetipova loze II (ToxoDB#1) i III (ToxoDB#2) dozna zavisna, ali je vreme neodređeno, što je sasvim u skladu sa sporadičnom smrtnosti koja je primećena za EQ39 (ToxoDB#54) i G13 (Graf. 5). Analiza parametara morbiditeta kod izolata loze III iz Srbije je pokazala da nisu u korelaciji sa virulencijom genotipa, već da su vrlo verovatno odraz kvaliteta mehanizama rezistencije i tolerancije kod individualnih domaćina, jer su maksimalni

brojevi cista bili visoki u mozgu miševa inficiranim genotipom, EQ40, koji je srednje virulentan, i kod G13, koji je nisko virulentan. Takođe, zapremina cista se nije značajno razlikovala između sva četiri izolata (Tab. 5). Imajući u vidu da su za eksperimentalne infekcije korišćeni *outbred* Swiss Webster miševi, koji su preživeli infekcije čak i sa visokim dozama ( $>10^4$ ) srednje virulentnih izolata, predstavljaju pojedince sa superiornim mehanizmima rezistencije i tolerancije, dok je u odnosu na njih grupa miševa koja čini veliki broj preživelih nakon infekcije sa nisko virulentnim sojevima dosta heterogena. Interesantno je da je najviši maksimalan broj cista primećen kod EQ40, što implicira veću šansu za transmisiju i može biti odraz evolutivne kompenzacije za visoku virulenciju, kao što se i očekuje prema *trade-off* hipotezi (Anderson i May, 1982).

Virulencija koju su pokazali EQ40 i Portugalski izolat TgPiPr14 *in vivo* je u kontrastu sa niskim kumulativnim mortalitetom izazvanim gabonskim izolatom TgA105011, dok podataka za *in vivo* virulenciju Francuskog izolata, koji potiče sa juga zemlje iz regiona koji se graniči sa Španijom, nema u literaturi (Halos et al., 2010). I do sada su u literaturi opisani izolati sa različitim kontinenta genotipizirani metodom zlatnog standarda, MnPCR-RFLP na 9, ili metodom analize dužine MS na 15 lokusa, sa identičnim genotipom, a vrlo različitim kumulativnim mortalitetom, uprkos činjenici da je utvrđivanje virulencije rađeno identičnim protokolom (Schwab et al., 2016; Rego et al., 2017; Hamilton et al., 2019). Poznato je da postoji značajna razlika u rezoluciji genotipa prema MnPCR-RFLP metodi u odnosu na tipizaciju mikrosatelita zbog različitih frekvencija mutacija u kodirajućoj i satelitskoj DNK, što ukazuje na izvestan nesklad između metodologija i upućuje na oprez u tumačenju rezultata procene virulencije isključivo na osnovu MnPCR-RFLP ili ToxoDB, i MS genotipa (Su et al., 2010). Uz to, obe metodologije karakteriše inherentan manjak rezolucije u definiciji genotipa, imajući u vidu da se smatra da postoji svega 1-2 % razlike na nivou genomske sekvence (do  $1,3 \times 10^6$  bp) između arhetipova tri globalne loze I, II i III (Sibley i Boothroyd, 1992; Su et al., 2003; Khan et al., 2005). Ovo znači da se u pomenutim slučajevima vrlo verovatno radilo o genotipovima koji su identični samo prema strogoj definiciji na osnovu 9 MnPCR-RFLP lokusa ili 15 MS, što suštinski samo podrazumeva isti ToxoDB broj ili identičan obrazac dužina 15 MS markera, ali ne i identične alele gena markera virulencije, koji mogu u nekim slučajevima da objasne razlike u *in vivo* fenotipu virulencije (Schwab et al., 2016).

Analiza gena markera virulencije je pokazala da sva četiri izolata loze III iz Srbije imaju identične alele na svim lokusima (Tab. 3). Iako je CS3 u slučaju pojedinih brazilskih izolata imao prediktivnu vrednost za virulenciju, od ispitivanih genotipova loze III, samo je EQ39 (ToxoDB#54) imao alel 2, povezan sa višom virulencijom, na tom lokusu (Tab. 2) (Pena et al., 2008). Rezultati analize fenotipa virulencije *in vivo* su pokazali da kod analiziranih genotipova, tip alela na CS3 lokusu nema prediktivnu vrednost za virulenciju. Prema nekim nalazima se smatra se da je kombinacija alela ROP5 i ROP18 najbolji pokazatelj virulencije, jer je pokazano da tipovi alela na ova dva lokusa koreliraju sa fenotipom virulencije *in vivo* kod 240 ispitanih sojeva, većinski poreklom iz novog sveta, koji predstavljaju 136 genotipova (Schwab et al., 2016). Kombinacija ROP5<sub>3</sub>/ROP18<sub>3</sub>, koja je prisutna kod svih izolata loze III iz Srbije kao i u 24 od 136 ispitana genotipa (17,6%), povezana je sa vrlo širokim spektrom virulencije, od 0-100 % mortaliteta miševa, što znači da ima nisku prediktivnu vrednost (Schwab et al., 2016). Nasuprot ovome, kombinacija alela ROP5<sub>3</sub>/ROP18<sub>4</sub> koja je najučestalija kod sojeva iz novog sveta—prisutna je kod 35 od 136 genotipova (25,7%)—ima izuzetno visoku prediktivnu vrednost, jer mortalitet varira od 50-100 %, sa svega jednim genotipom, ToxoDB#18, koji je nisko virulentan (0% mortaliteta). Podaci iz različitih laboratorija su pokazali da se mortalitet izazvan genotipovima ToxoDB#8, 18, 29, 46 i 186 drastično razlikovao od soja do soja, iako su imali identične alele ROP5, ROP18, ROP16 pa čak i ROP17 u pojedinim slučajevima, što jasno ukazuje na razlike u genomu koje nisu obuhvaćene ni MnPCR-RFLP genotipizacijom na 10 lokusa niti analizom dodatna 4 lokusa, što vrlo verovatno objašnjava nalaze Hamilton et al.



(2019) i Rego et al. (2017) (Shwab et al., 2016). Podaci upućuju i na zaključak da bi rezultati analize alela gena markera virulencije, koji na žalost nisu dostupni, možda mogli da objasne razliku u virulenciji srpskog izolata EQ40 i portugalskog izolata TgPiPr14 u odnosu na gabonski izolat. Za sve ispitane izolate loze III iz Srbije, rezultati analize četiri individualna gena markera virulencije, među kojima su i oni za koje se smatra da imaju najbolju prediktivnu vrednost, nisu objasnili razlike u fenotipu virulencije *in vivo*. Imajući u vidu da je ROP18<sub>III</sub> alel koji nije eksprimiran, ili je prema nekim tvrdnjama nisko eksprimiran, zbog sekvence od 2 kb koja je umetnutna u promotorski region, širok sprektar virulencije genotipova kod kojih je prisutan ovaj alel je možda sasvim očekivan (Khan et al., 2009). Naime, jasno je da u odsustvu ROP18, ROP5 interaguje sa ROP17 ali vrlo verovatno i sa drugim predstavnicima porodice roptrijskih kinaza, koji za sada nisu identifikovani, te je kombinacija tih interakcija ključna za virulenciju (Etheridge et al., 2014; Paredes-Santos et al., 2019). Takođe, ovi rezultati impliciraju da analiza pojedinačnih gena markera virulencije, što je eksperimentalna praksa, svakako nije adekvatna za predikciju virulencije, već da bi možda primena metodologija većeg kapaciteta koja dozvoljava sveobuhvatnu analizu potencijalnih gena markera virulencije i veću rezoluciju, kao što su sekvenciranje ili specifičan *SNP array*, mogle da budu značajne u budućnosti. Za sada, upotreba laboratorijskih miševa za utvrđivanje virulencije genotipova *T. gondii* ostaje neizbežna.

#### *Fenotip virulencije in vitro—intrinzična virulencija*

Kontrolni Soj RH (ToxoDB#10) je pokazao drastično različite rezultate analize intrinzične virulencije *in vitro* u odnosu na ostale ispitivane genotipove, što je i očekivano za arhetip loze I (Dubey et al., 1998; Saeij et al., 2005, Khan et al., 2009). Ali uprkos tome, važno je istaći da je soj RH je ipak specifičan u odnosu na ostale izolate ovog genotipa, kao što je GT1, jer je od 1947. godine, kada je izolovan, pa do sada u kontinuiranoj kulturi *in vivo*, u različitim sojevima laboratorijskih miševa, a od 1977. godine, *in vitro* najčešće u *human foreskin fibroblast* (HFF) ćelijskoj liniji, u mnogim laboratorijama u svetu (Pfefferkorn i Pfefferkorn, 1976; Dubey et al., 1998, Khan et al., 2009). Smatra se da se zbog kultivacije *in vitro*, koja podrazumeva uslove koji pogoduju održavanju parazita u brzodelećem životnom obliku tahizoit, vremenom postigla izuzetno visoka stopa proliferacije, natprosečno duže ekstracelularno preživljavanje kao i smanjenje tendencije za spontanu konverziju u bradizoite, što uslovljava i veći mortalitet ćelija domaćina (Dubey et al., 1998; Khan et al., 2009). *In vivo* se pokazalo da soj RH vrlo efikasno probija biološke barijere, a do incistacije ne dolazi u običajenom roku, te su kontinuirana brza proliferacija tahizoita i posledična inflamacija letalne za većinu sojeva laboratorijskih miševa (Khan et al., 2009). Suprotno tome, kod soja GT1, koji je takođe visoke intrinzične virulencije kao RH, ali se znatno ređe kultiviše i to samo u nekoliko laboratorija, ipak se održala prirodna tendencija ka incistaciji.

Imajući u vidu da su biološke odlike soja RH *in vitro* i *in vivo* pokazane i prihvaćene kao mehanizmi koji doprinose virulenciji genotipa ToxoDB#10, implikacija je da je su pojedini mehanizmi dosta prilagodljivi okolnostima ili domaćinu, što nije iznenađujuće kod parazita, ali i da je potreban oprez u poređenju fenotipa virulencije izolata koji su kultivisani kratkoročno, pogotovo *in vitro*, u odnosu na one koji su kultivisani dugoročno, zbog mogućih adaptacija koje „maskiraju“ prirodne karakteristike (Sibley et al., 2002). U ovim eksperimentima, RH je služio samo kao primer virulentnog genotipa, dok je izolat BGD18 (ToxoDB#1), služio kao primer nisko virulentnog genotipa. Stoga je očekivano da se i *in vitro* fenotip BGD18, koji je kultivisan samo za vreme eksperimenata, kao i ispitivani genotipovi loze III, razlikuje u odnosu na dugoročno kultivisane laboratorijske sojeve istog genotipa (Sibley et al., 2002).

Rezultati ispitivanja kinetike invazije VERO ćelija su pokazali da izuzev nisko virulentnog izolata G13, kome je za invaziju bilo potrebno 3 h, tahizoiti svih ostalih genotipova inficiraju ćeliju roku od 1 h do 1,5 h, a RH soj za samo 20 min, što je značajna razlika u vremenu neophodnom za invaziju i upućuje na mogući defekt izolata G13 u nekom od mehanizama koji

promovišu invaziju (Tab. 6). Imajući u vidu da i tahizoita G13 ipak prodiru u ćelije, o čemu svedoči i rezultat da je 0,43 % ćelija bilo inficirano nakon 24 h, što podrazumeva intaktnu kliznu motilnost kao i pokretni spoj, moguće je da je u pitanju defekt u ostvarivanju stabilnog kontakta sa ćelijom domaćina koji prethodi invaziji. Među *T. gondii* proteinima koji učestvuju u ostvarivanju kontakta sa ćelijom domaćina izdvajaju se MIC1, MIC4, MIC13, RON4, P104 i MCP4a, za koje su definisani ćelijski ligandi, i AMA1, integralni adhezin bez kojeg je stabilan kontakt izuzetno otežan (Bargieri et al., 2013; Kato, 2018). Interakcija proteina RON4, čiji je ligand  $\beta$ -tubulin, smatra se izuzetno značajnim za ostvarivanje kontakta i invaziju, dok je pokazano da je redukcija invazije takođe posledica nedostatka sijaličkih kiselina, liganda MIC1, na membranama nekih ćelija (Takemae et al., 2013; Kato, 2018). Rezultati analiza sekvence i nivoa ekspresije gena koji kodiraju proteine AMA1, RON4 i MIC1 i lokalizacije proteina za vreme invazije, kao i uživo praćenje samog procesa u visokoj rezoluciji, koje nisu bile predviđene u sklopu ove disertacije, bi u slučaju izolata G13 možda pružile mehanističko objašnjenje za usporenu invaziju, ali je usporena invazija svakako jedno od objašnjenja za njegovu nisku virulenciju *in vivo*. Nizak broj inficiranih ćelija nakon 24 h, ali i broj deoba nakon 48 h koji je vrlo sličan K1 i EQ40, koji su *in vivo* pokazali fenotip intermedijarne virulencije, potvrđuju da se zaista radi o defektu na nivou invazije ćelija, a ne na nivou proliferacije unutar parazitoforme vakuole.

Interesantno je da je od ispitivanih genotipova loze III, najviše inficiranih ćelija nakon 24 h bilo zapaženo kod nisko virulentnog soja EQ39 (ToxoDB#54), što upućuje na izuzetno uspešnu invaziju, koja se pak ne zasniva na brzini, jer je vreme invazije slično kao kod EQ40 i K1, već na kvalitetu ostvarivanja kontakta ili prodora kroz ćeliju domaćina (Tab. 7). Imajući u vidu da je pokazano da ćelije inficirane ovim genotipom prosečno sadrže više od jedne parazitoforme vakuole, vrlo je verovatno da je prodor kroz ćelijsku membranu olakšan, što ukazuje na superiornu kliznu motilnost i/ili pokretni spoj u odnosu na ostale ispitane genotipove loze III. Prsten adhezije i pokretni spoj su kompleksne multiproteinske strukture, a invazija je kratkotrajan proces od svega 20-40 sek za vreme kojih se paralelno aktiviraju mnogi mehanizmi, te je diskretna vizuelna analiza samog trenutka ulaska vrlo otežana i zahteva posebne tehničke mogućnosti (Charron i Sibley, 2004; Besteiro et al., 2011; Delorme-Walker et al., 2012). Iako mehanizmi invazije prevazilaze okvire ovog istraživanja, značajan prvi korak u identifikaciji mehanizma mogla bi biti analiza nivoa ekspresije toksofilina, jer je depolimerizacija i reorganizacija aktinskog skeleta ćelije domaćina neophodna za prodor tahizoita i formiranje parazitoforme vakuole (Delorme-Walker et al., 2012). Uprkos moguće superiorne klizne motilnosti ili pokretnog spoja, prosečan broj parazita po vakuoli kao i deoba nakon 48 h kod EQ39 (ToxoDB#54) najniži su od svih ispitanih genotipova loze III, što vrlo verovatno i objašnjava nisku virulenciju *in vivo*.

Kod genotipa EQ40 je primećen statistički značajno najviši prosečan broj tahizoita u vakuolama nakon 48 h u odnosu na K1, EQ39 (ToxoDB#54) i BGD18 (Tab. 8). Iako je broj tahizoita u vakuolama viši i u odnosu na G13, razlika nije bila statistički značajna verovatno zbog visoke vrednost standardne greške srednje vrednosti koja je između ostalog rezultat činjenice da je veoma mali broj ćelija bio inficiran, što uslovljava i manji broj vakuola nakon 48 h (Graf. 7). Broj tahizoita u vakuolama je kvantitativni pokazatelj stope rasta, a razlikuje se od prosečnog broj deoba, koji je aproksimiran kao  $\log_2$  broja parazita, jer uzima u obzir i „re-invaziju“, koja je posledica završetka litičnog ciklusa u toku eksperimentalnog perioda. Kraj ciklusa podrazumeva smrt ćelije domaćina i pojavu ekstracelularnih tahizoita, koji invazijom obližnjih ćelija ulaze u novi litični ciklus i stvaraju vakuole sa po jednim tahizoitom, čiji broj deoba je nula. Iz ovih razloga je prosečan broj tahizoita u vakuolama uvek viši od prosečnog broja deoba, te uprkos činjenici da je prosečan broj deoba kod EQ40, K1 i G13 vrlo sličan, viši prosečan broj tahizoita po vakuoli jeste indicija za višu intrinzičnu virulenciju EQ40.

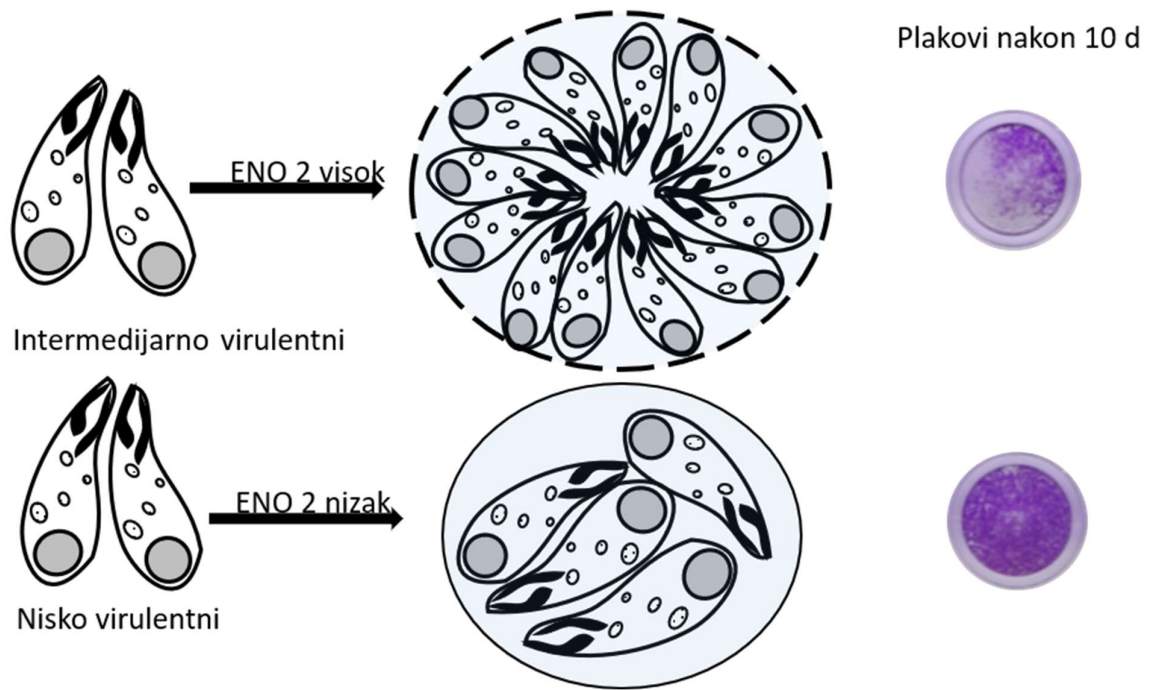
Ubedljiva razlika između intrinzičnih virulencija ispitivanih genotipova je pokazana analizom egesa, vizuelnom inspekcijom i kvantifikacijom plakova koji su posledica egesa u ćelijskoj kulturi (Graf. 8). Uprkos pokušaju standardizacije eksperimentalnog protokola smanjivanjem infektivne doze na 0,3, 0,1 i 0,01 MOI ili promenom eksperimentalnog intervala od 10 na 14, ili 7 i 5 dana, uslovi koji omogućavaju adekvatnu kvantifikaciju plakova kod svih genotipova loze III i oba kontrolna, RH (ToxoDB#10) i BGD18 (ToxoDB#1), nisu mogli da budu jedinstveni, zbog velike razlike u intrinzičnoj virulenciji, te su odabrani uslovi koji odgovaraju većini. Za EQ40 nije bilo moguće kvantifikovati plakove pod odabranim eksperimentalnim uslovima, ali je nedostatak gotovo trećine ćelijskog sloja u bunarima vizuelno jasan i govori o višoj intrinzičnoj virulenciji u odnosu na sve ostale ispitane genotipove loze III i kontrolnog genotipa BGD18 (ToxoDB#1). Visoko virulentan RH soj (ToxoDB#10) kompletno uništava ćelijski sloj u istim eksperimentalnim uslovima u roku od 2 do 3 dana, dok do toga ne dolazi ni nakon 14 dana u bunarima inficiranim nisko virulentnim BGD18 (ToxoDB#1). Kvantifikacija plakova nastalih u bunarima inficiranim genotipom K1 u odnosu na BGD18 (ToxoDB#1), EQ39 (ToxoDB#54) i G13 pokazala je da je prosečan broj plakova nastalih nakon infekcije sa K1 gotovo dvostruko viši u odnosu na ostale, što je i statistički značajno i potvrđuje višu intrinzičnu virulenciju K1 (Tab. 9, Graf. 9). Ukupni rezultati analize intrinzične virulencije *in vitro* su u skladu sa kumulativnim mortalitetom miševa i potvrđuju da je genotip EQ40 najvirulentniji, a genotip G13 najmanje virulentan.

Iako za sada nije eksperimentalno utvrđena veza između prostorne konformacije tahizoita u vakuoli i virulencije, činjenica je da je formacija rozeta karakteristična za tahizoite visoko virulentnog soja RH (ToxoDB#10) (Dubey et al., 1998; Attias et al., 2020). Ali, imajući u vidu da je RH adaptiran na *in vitro* uslove kultivacije, a da je rozeta prirodna formacija usled sinhronne deobe tahizoita, nije jasno da li je sinhrona deoba intrinzična ili stečena odlika virulentnih sojeva. Tokom kultivacije tahizoita genotipova loze II i III za potrebe *in vitro* eksperimenata, primećena je znatno niža frekvencija rozeta kod BGD18 (ToxoDB#1), EQ39 (ToxoDB#54) i G13 u odnosu na EQ40 i K1, što upravo može ukazivati na intrinzično odsustvo ili nizak stepen sinhronizacije deobe kod nisko virulentnih genotipova koji za razliku od RH soja, nisu dugoročno kultivisani *in vitro*, i može objasniti razlike u stopi proliferacije. Asinhrona deoba je smatrana odlikom bradizoita, ali prema novim saznanjima je vrlo verovatno i odlika prelaznog životnog oblika koji eksprimira bradizoitske i tahizoitske gene, a nalazi se u tkivnim cistama, koji može biti instrumentalan za rast i razvoj tkivne ciste, a čak možda i podstiče fenomen spontane reaktivacije infekcije u lokalizovanom kontekstu koji se smatra ključnim za dugoročno održavanje parazita kod domaćina (White et al., 2014, Suzuki et al., 2021). Postojanje prelaznog životnog oblika uslovljeno je i samim procesom konverzije, jer je odavno pokazano da deoba tahizoita ne sme biti potpuno prekinuta, da bi do konverzije uopšte i došlo (Bohne et al., 1993). Striktne kontrole deobe je pak neophodna za održavanje integriteta membrane parazitoforne vakuole, te asinhrona deoba predstavlja preduslov za incistiranje, tačnije vrlo verovatno omogućava vremenski interval neophodan za biogenezu membrane ciste. Prema davnašnjim eksperimentalnim opservacijama, nisko virulentni genotipovi favorizuju incistiranje, što nije sasvim precizan zaključak jer do incistiranja dolazi i kod visoko virulentnih genotipova (Smith, 1995; Dubey et al., 1998). Razlika je vrlo verovatno u vremenu neophodnom do incistacije, što implicira različite vremenske intervale za „akutnu“ fazu infekcije kod nisko i visoko virulentnih genotipova. Imajući u vidu da analiza prostorne konformacije nije bila predviđena u sklopu eksperimenata, frekvencija rozeta nije utvrđena, te ni rezultati nisu prikazani, ali je urađena analiza kojom se stiče uvid u metaboličku aktivnost tahizoita ispitanih genotipova i kontrolnih sojeva.

Geni koji kodiraju enolaze ENO1 i ENO2, koji su različito ekspimirani u tahizoitima i

bradizoitima, su u mnogim istraživanjima korišćeni kao markeri životnog oblika (Dzierzinski et al., 2011). U ovom slučaju je tahizoitska enolaza, ENO2, koja je procesivnija od bradizoitske ENO1, poslužila isključivo kao genski marker za metaboličku aktivnost, s obzirom da se u roku od 10 dana u uslovima kultivacije koji su primenjeni, ne očekuje spontana konverzija u bradizoite, a viši nivo sinteze enolaze jeste asociran sa pojačanim metabolizmom glukoze (Dzierzinski et al., 2011). Analiza relativne ekspresije nivoa ENO2, je pokazala najviši nivo kod intermedijarno virulentnog K1 nakon 24 h, dok su nivoi kod EQ40 i EQ39 (ToxoDB#54) gotovo isti, a najniži nivo je detektovan kod G13 (Graf. 10). Interesantno je da je metabolička aktivnost K1 nakon 24 h intrinzično viša u odnosu na EQ40, iako su oba genotipa intramedijarno virulentna, a EQ40 ima značajno višu stopu proliferacije. EQ39 (ToxoDB#54) takođe predstavlja zanimljiv slučaj jer je nisko virulentan genotip koji sporo proliferiše. Imajući u vidu da je ekspresija analizirana samo u intracelularnim tahizoitima, nivo ekspresije ENO2 kod K1 je vrlo verovatno inherentno viši u odnosu na EQ40, dok je moguće objašnjenje za EQ39 (ToxoDB#54) izuzetno visok procenat inficiranih ćelija nakon 24 h kao i činjenica da je velika većina ćelija sadržala više od jedne vakuole. Na osnovu rezultata dobijenih nakon 10 dana kultivacije na isti način kao i za analizu egrasa, pokazano je da je metabolička aktivnost kod nisko virulentnih genotipova niža u odnosu na intermedijarno virulentne, za od 32 do 37.5 % kod BGD18 (ToxoDB#1), 31 do 25 % kod EQ39 (ToxoDB#54), dok je kod G13 ekstremno niska, gotovo nedetektibilna. Niska metabolička aktivnost za posledicu može imati i postepeno smanjenje stope proliferacije, što je primećeno i objavljeno mnogo ranije, prilikom kultivacije arhetipova II i III, ToxoDB#1 i ToxoDB#2, ili pak tendencije da se vremenom povisi frekvencija asinhrona deobe, koja bi mogla biti asocirana sa predstojećom incistacijom, ukoliko se ispune dodatni odgovarajući uslovi (Saeij et al., 2005). Interesantno je da su promene u kinetici proliferacije najverovatnije posledice genske regulacije kod parazita, imajući u vidu da nedostaci nutrijenata ili značajne promene pH sa modernim sintetičkim medijumima nisu očekivani u kratkoročnoj kulturi.

Implikacija rezultata jeste da je tendencija ka incistaciji inherentna kod *T. gondii*, da je zapravo prirodna posledica nakon određenog broja litičnih ciklusa, koji izgleda varira zavisno od virulencije, tako da nisko virulentni genotipovi ispoljavaju tendenciju ka incistaciji „rano“, a intermedijarno virulentni genotipovi „kasnije“, što čak može biti i slučaj *in vivo*, jer je pokazano da je kod intermedijarno virulentnih genotipova K1 i EQ40 do značajnog mortaliteta dolazilo u roku od 15 dana, dok ga sa nisko virulentnim genotipovima u tom vremenskom intervalu nije bilo, već je mortalitet bio sporadičan i vrlo verovatno uslovljen nekim specifičnostima samog domaćina. Sem toga, na osnovu ovih rezultata a i publikovanih eksperimentalnih saznanja, daleko je verovatnije da se konverzija tahizoita u bradizoite odigrava kao posledica genski regulisane atenuacije metabolizma, koja uslovljava „stabilizaciju“ parazitoformnih vakuola jer usporava deobu između ostalog, i na taj način obezbeđuje vreme za neophodne promene u profilu ekspresije gena, koje konačno menjaju i fenotip. Stabilnije parazitoforme vakuole usled sporije deobe su moguće objašnjenje za manji broj plakova kod nisko virulentnih genotipova (Graf. 19).



**Grafikon 19.** Šematski prikaz uloge metaboličke aktivnosti u virulenciji.

### 3. Imunski odgovor domaćina nakon infekcije varijantnim genotipovima loze III

#### *Imunski odgovor domaćina u ranoj infekciji*

U ranoj infekciji, 7 dana nakon inokulacije, najviši relativni nivo ekspresije je zapažen za citokin IFN- $\gamma$ , dok se IL-10 gotovo ne detektuje u mozgu, a nizak nivo je detektovan samo u slezinama životinja inficiranih kontrolnim sojem BGD18 (ToxoDB#1) i genotipom G13. Ekspresija IL-12p40 je takođe najviša u mozgovima miševa inficiranih genotipom EQ40, dok je u slezinama najviši nivo detektovan kod životinja inficiranih kontrolnim sojem BGD18 (ToxoDB#1) (Graf. 11). Ključni značaj IFN- $\gamma$  za suzbijanje tahizoita i polarizaciju limfocita u Th-1 fenotip kao i zavisnost indukcije njegove ekspresije od strane IL-12 poznati su iz mnogih ranijih istraživanja, te je visoka ekspresija ovih citokina u ranoj infekciji očekivana (Suzuki et al., 1996; Fox et al., 2004; Hunter i Sibley, 2012). Pokazano da su kod miševa DĆ najznačajniji izvor IL-12, kao i da su uz NK ćelije i neutrofilni,  $\gamma\delta$  limfociti, koji poseduju ograničen repertoar T-ćelijskih receptora, izvor IFN- $\gamma$  kod miševa i ljudi u ranoj infekciji (Subauste et al., 1995; Kasper et al., 1996; Hunter i Sibley, 2012; Sturge et al., 2013). Uz to, antigen specifični CD4<sup>+</sup> limfociti, koji su odgovorni za najveći deo produkcije IFN- $\gamma$  u infekciji sa *T. gondii*, mogu se detektovati kod miševa svega 5 dana nakon inokulacije tkivnim cistama (Scharton-Kersten et al., 1998). Iako poreklo IFN- $\gamma$  nije eksperimentalno utvrđeno, visok nivo ovog citokina u mozgu miševa inficiranih genotipom EQ40, a pogotovo slezini, koja je važan lokalitet za inicijaciju adaptivnog imunskog odgovora, ukazuje na snažnu aktivaciju mehanizama rezistencije kod domaćina, što korelira sa rezultatima *in vitro* ispitivanja koja su pokazala da su stopa proliferacije i smrtnosti inficiranih ćelija najviše upravo kod ovog genotipa. Stoga se očekuje lokalizovano visoka koncentracija tahizoitskih antigena ali i medijatora inflamacije, poreklom od mrtvih ćelija domaćina, što implicira daleko intenzivniju stimulaciju i aktivaciju različitih tipova stacionarnih imunskih ćelija (slezina) kao i pojačanu infiltraciju imunskih ćelija u inficirana tkiva, što je moguće objašnjenje upravo za visok relativni nivo ovog citokina u mozgu.

Interesantno je da su kod svih genotipova loze III prisutni GRA15<sub>I/III</sub> i ROP16<sub>I/III</sub>, aleli koji su prisutni kod genotipova koji u MF mogu da suprimiraju NF- $\kappa$ B translokaciju (GRA15) ili konstitutivno aktiviraju STAT3/6 (ROP16), čiji se kombinovan efekat, prema rezultatima dosadašnjih istraživanja, odražava kao inhibicija transkripcije IL-12, dok GRA15<sub>II</sub> i ROP16<sub>II</sub>, prisutni kod kontrolnog soja BGD18 (ToxoDB#1), deluju suprotno (Rosowski et al., 2011; Tuladhar et al., 2019). Uticaj različite regulacije transkripcije kod MF od strane parazita teško je evaluirati u kontekstu opšteg imunskog odgovora u slezini i mozgu, ali prisustvo relativno visokog nivoa IL-12p40 u mozgu miševa inficiranih EQ40 u odnosu na nivo kod miševa inficiranih kontrolnim sojem BGD18 (ToxoDB#1) nije u korelaciji sa očekivanim efektom alela gena markera virulencije. U slezini je pak relativni nivo IL-12p40 zaista viši kod kontrolnog u odnosu na ostale, što možda predstavlja korelaciju sa efektom alela GRA15<sub>II</sub> i ROP16<sub>II</sub>. Ovi rezultati ne umanjuju značaj efekta interakcije različitih sekretornih proteina parazita sa određenim tipovima ćelija domaćina, već ističu kompleksnost interpretacije ovih interakcija za imunski odgovor u ranoj fazi infekcije, pogotovo u kontekstu identifikacije mogućih mehanizama virulencije koji od njih zavise.

Profil ekspresije IL-10, IL-12 i IFN- $\gamma$  u tkivima miševa inficiranih genotipom EQ40, kao najvirulentnijim među ispitivanim genotipovima, ukazuje na snažan proinflamatorni odgovor koji služi da zaštiti domaćina od letalnog ishoda infekcije (Suzuki et al., 1996). Miševi su za ove eksperimente inokulisani sa svega 10 tahizoita, što predstavlja subletalnu dozu za genotip EQ40, čija je LD<sub>50</sub> 694 tahizoita. Utvrđeno je u prethodnim eksperimentima da sve jedinke inficirane sa 10 tahizoita preživljavaju ranu fazu i dugoročno tolerišu infekciju, te uprkos

relativno visokim nivoima IL-12p40 i IFN- $\gamma$ , ne dolazi do intenzivne patologije uslovljene nekontrolisanom inflamacijom koja bi prouzrokovala prekomernu nekrozu tkiva u ranoj fazi infekcije i time dovela do letalnog ishoda miševa (Gazinelli et al, 1996; Neyer et al., 1997; Denkers i Gazinelli, 1998). Ovi nalazi podstiču sumnju da je odusustvo IL-10 7. dana nakon inokulacije zapravo slučajno i da do ekspresije vrlo verovatno dolazi kasnije u toku infekcije. Očekuje se pak da infekcije sa višim infektivnim dozama indukuju i daleko višu relativnu ekspresiju IL-12p40 i IFN- $\gamma$ , te je moguće da je kasna ekspresija IL-10, koja može biti zavisna i od genotipa, objašnjenje za visoku stopu smrtnosti do 15. dana primećenu u eksperimentalnim infekcijama za utvrđivanje virulencije *in vivo*. Imajući u vidu da je ekspresija IFN- $\gamma$  značajno niža kod miševa inficiranim ostalim ispitivanim genotipovima, koje karakteriše niža stopa proliferacije i litičnog kapaciteta, moguće je da do indukcije IFN- $\gamma$  dolazi nešto kasnije u toku infekcije, kada se povećaju koncentracije antigena i medijatora inflamacije.

#### Imunski odgovor domaćina u kasnoj infekciji

I u kasnoj infekciji, 42. dana nakon inokulacije, najviši relativni nivo ekspresije utvrđen je za IFN- $\gamma$  ali u mozgu miševa inficiranih nisko virulentnim EQ39 (ToxoDB#54), a zatim kod miševa inficiranih intermedijarno virulentnim K1, kod kojih je takođe najviši i u slezini (Graf. 12). Visoki relativni nivoi IL12-p40 su detektovani i u mozgu životinja inficiranih genotipovima EQ39 (ToxoDB#54) i, kao i u ranoj infekciji, EQ40. Ali, za razliku od rane infekcije, kada je relativni nivo IL-10 bio izuzetno nizak ili čak nedektabilan, ekspresija IL-10 je utvrđena kod svih genotipova, a vrlo visoki relativni nivoi IL-10 detektovani su u mozgu i slezini miševa inficiranih kontrolnim sojem BGD18 (ToxoDB#1). Održavanje visokog nivoa ekspresije IL-12p40 u mozgu kod EQ39 (ToxoDB#54) i EQ40 u kasnoj infekciji može ukazivati da su leukocitima, koji su jedini izvor ovog citokina, i dalje dostupni određeni *T. gondii* antigeni, iako se očekuje da je do tada većina tahizoita izvršila konverziju u bradizoit. Smatralo se da su tkivne ciste inertne dok novija istraživanja nisu pokazala proliferaciju bradizoita unutar cista, motilnost, pa čak i sposobnost da emigriraju iz ciste i inficiraju obližnje ćelije i stvaraju nove „mlade“ ciste, dok su druga istraživanja iznela teoriju periodične lokalizovane reaktivacije ili ruptur cista, što takođe ukazuje prisustvo izvesne dinamika i u kasnoj infekciji, iako se u velikoj većini slučajeva ne manifestuje u vidu kliničkih simptoma kod domaćina za razliku od rane infekcije (Dzierzinska et al.2004; Sullivan i Jeffers, 2012, Tiwari et al., 2019; Suzuki et al., 2021).

Uz to, činjenica da određena populacija CD8<sup>+</sup> limfocita ima sposobnost da prepozna i uništi tkivne ciste ukazuje na mogućnost da je prisustvo *T. gondii* antigena vrlo verovatno doživotno kod domaćina što može biti objašnjenje ne samo ove rezultate, već je verovatno i neophodno za održavanje imunološke memorije ali i za razvoj efikasnih mehanizama tolerancije infekcije (Suzuki et al., 2010; Tiwari et al., 2019). Prisustvo IL-12p40 uslovljava i kontinuiranu produkciju IFN- $\gamma$ , što je evidentno kod svih ispitivanih genotipova; statistički značajno najviši relativni nivo ovog citokina kod nisko virulentnog genotipa EQ39 (ToxoDB#54) interesantan nalaz koji ukazuje na to da se proinflamatorni odgovor postiže kod svih inficiranih domaćina nezavisno od virulencije genotipa parazita, ali da se njegov intenzitet menja u toku vremena nakon infekcije. Imajući u vidu da se stopa proliferacije tahizoita vrlo verovatno atenuira vremenom i *in vivo*, kao što je pokazano *in vitro*, što može biti posledica umanjenja ekspresije ENO2, moguća je ranija konverzija tahizoita u bradizoite kod nisko virulentnih genotipova kod kojih je ENO2 ekspresija niža u odnosu na intermedijarno virulentne genotipove (Saeij et al., 2005, Uzelac et al., 2020). Uz genski regulisanu atenuaciju metabolizma, koja se razlikuje u odnosu na virulenciju genotipa, poznato je da je imunološki pritisak domaćina ključan za konverziju i incistaciju, što ukazuje i na postojanje različitih pragova odoljevanja konverziji kod različitih genotipova, što je u ranijim istraživanjima tumačeno kao sklonost ka incistaciji primećenu kod nisko virulentnih genotipova (Gazinelli et al., 1993; Smith, 1995; Dubey et al., 1998). Iako rezultati ekspresije citokina u kasnoj infekciji kod miševa inficiranih nisko virulentnim genotipom EQ39 (ToxoDB#54) svedoče o visokom intenzitetu imunskog odgovora,

ne moraju nužno biti u suprotnosti sa pojačanom sklonosti ka incistaciji ili nižim pragom odoljevanja konverziji koja je pokazana *in vitro*, upravo iz razloga što je *in vivo* antigen dostupan čak i nakon incistacije.

O nezavisnosti opšteg imunskog odgovora od virulencije svedoče i rezultati MAT testa, jer statistički značajnih razlika u nivou specifičnih IgG antitela između miševa inficiranih sa ispitivanim genotipovima nema (Graf. 13). Ali, blago povišeni nivoi su zapaženi kod svih miševa inficiranih varijantnim genotipovima loze III, što može ukazivati na razlike u repertoaru imunodominantnih epitopa, a pogotovo u imunogenosti određenih parazitskih proteina kod ovih genotipova u odnosu na arhetip II (ToxoDB#1). Imajući u vidu uticaj antigena ne samo na repertoar već i na frekvenciju određenih T-ćelijskih receptora za populacije antigen specifičnih limfocita koji se stvaraju kao odgovor na infekciju, očekivano je da se ćelijski imunitet između različitih genotipova donekle razlikuje—što može imati značajne implikacije u kontekstu re-infekcije istim ili različitim genotipovima. Rezultati re-stimulacije ćelija periferne krvi STAg antigenom poreklom od visoko virulentnog arhetipa I (ToxoDB#10) su pokazali da je nivo relativne ekspresije IFN- $\gamma$  kod svih miševa inficiranih varijantnim genotipovima loze III viši u odnosu na arhetip II (ToxoDB#1) (Graf. 14). Najviši nivo relativne ekspresije, mada ne statistički značajno, utvrđen je kod intermedijarno virulentnog genotipa K1, dok su nivoi kod EQ40, EQ39 (ToxoDB#54) i G13 bili vrlo slični. Imajući u vidu da su u kasnoj infekciji Th-1 diferencirani antigen specifični CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfociti glavni izvor IFN- $\gamma$ , rezultati ukazuju na razlike u ćelijskom imunitetu kod miševa inficiranih genotipovima loze III u odnosu na one inficirane arhetipom II (ToxoDB#1), ali i da je kod genotipa K1 ćelijski imunitet izuzetno snažan (Sturge et al., 2013).

Prema dosadašnjim saznanjima, efekti mehanizama koji doprinose virulenciji se ispoljavaju najviše u ranoj fazi infekcije, što uslovljava i snažniji proinflamatorni odgovor koji je uočljiv 7. dana nakon inokulacije kod EQ40, ali je sasvim sigurno prisutan i kod K1, što impliciraju rezultati relativne ekspresije IFN- $\gamma$  u re-stimulisanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi. U kasnoj fazi infekcije se pak jasno ističe značaj mehanizama tolerancije, što je pogotovo uočljivo kroz visoku ekspresiju IL-10 kod kontrolnog soja BGD18 (ToxoDB#1). Ekspresija ovog citokina u slezini, koja je i statistički značajno viša u odnosu na ostale genotipove, vrlo verovatno potiče od strane B-ćelija. Ovi rezultati ističu značaj slezine u promovisanju tolerancije u kasnoj infekciji, dok u ranoj infekciji, prema nekim saznanjima, zavisno od infektivne doze može doći i do oštećenja slezine od strane tahizoita i smanjenja njene funkcije (Zaretsky et al., 2012; Lee et al., 2019; Pereira et al., 2019, Sasai et al., 2019). Imajući u vidu da je u ovim eksperimentima korišćena niska infektivna doza od 10 tahizoita, oštećenja su vrlo verovatno ograničena, što može biti objašnjenje za visoku funkcionalnost slezine u kontekstu imunskog odgovora u ranoj i kasnoj infekciji. Iako se ekspresija IL-10 detektuje u mozgu miševa inficiranih varijantnim genotipovima loze III, pa i u slezini miševa inficiranih genotipom G13, izuzetno nizak nivo može biti posledica različite kinetike ekspresije, koja pak nije u korelaciji sa virulencijom, ili jedinstvene predispozicije genotipova ove loze za slabiju indukciju ili pak inhibiciju ekspresije IL-10.

Prethodna saznanja iz različitih istraživanja upućuju na to da su u kasnoj infekciji značajan izvor IL-10 T-bet<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> limfociti, koji takođe sintetišu i IFN- $\gamma$ , i B-ćelije. Činjenica da ovde prikazani rezultati IGRA i MAT testova svedoče o prisustvu obe populacije ćelija kod miševa inficiranih genotipovima loze III, dodatno ukazuje na nižu indukciju ili inhibiciju IL-10 ekspresije (Sasai et al., 2019). Moguće je stoga da su umesto IL-10, drugi anti-inflamatorni citokini ključni za kontrolu proinflamatornog odgovora. Posebno interesantnu ulogu može imati TGF- $\beta$  koji ima sinergistički efekat sa IL-10 u kontroli inflamacije, a značajne količine ovog citokina sintetišu MF, pogotovo M2 fenotipa, dok sam citokin promovise i polarizaciju MF u M2 fenotip (Zhang et al., 2017; Komai et al., 2018). Prirodnu populaciju MF čine M1, klasični



proinflatorni, M2 (engl. *wound healing*), alternativni, i M<sub>reg</sub>, regulatorni, fenotipovi koji se mogu menjati u zavisnosti od stimulusa u vidu citokinskog okruženja, faktora rasta ili produkata različitih mikroorganizama (Manjili et al., 2014; Italiani i Borashi, 2014; Röszer, 2015). Pokazano je da nakon intraperitonealne injekcije tahizoita, 60% inficiranih ćelija čine MF, 15% su neutrofili, a preostalih 25% različite imunske ćelije (Jensen et al., 2011). Arhetipovi I (ToxoDB#10) i III (ToxoDB#2) prema nekim saznanjima polarizuju MF na M2 fenotip, dok arhetip II (ToxoDB#1) polarizuje na M1, a smatra se da je za ovaj efekat odgovorna kinaza ROP16 koja aktivacijom TF STAT3/6 indukuje ARG1 (Butcher et al., 2011; Jensen et al., 2011). Imajući u vidu da je tip alela ROP16 kod svih ispitivanih sojeva loze III identičan, očekuje se da je polarizacija peritonealnih MF nakon infekcije i usmeravana ka M2 fenotipu, što je možda i uslovalo produkciju TGF-β u ranoj infekciji, dok je moguće da su lezije ili oštećenja u raznim tkivima, pogotovo CNS, koje su izazvane litičkom aktivnosti tahizoita u ranoj infekciji, prisutne u kasnoj infekciji i održavaju M2 populaciju (Laskin et al., 2011).

### Preživljavanje nakon re-infekcije

Svi miševi inficirani ispitivanim sojevima loze III kao i kontrolnim arhetipom loze II (ToxoDB#1) su preživeli re-infekciju visoko virulentnim arhetipom loze I (ToxoDB#10), sojem RH, što je očekivano, na osnovu brojnih eksperimentalnih i kliničkih istraživanja koja su pokazala da stečeni imunitet predstavlja zaštitu od re-infekcije (Howe i Sibley, 1995; Dubey, 1998; Đurković-Đaković, 1998; Montoya i Liesenfeld, 2004) (Tab. 10). Ipak, značajna je činjenica da je infektivna doza za primoinfekciju iznosila svega 10 tahizoita, koja je najniža u odnosu na dosada publikovane doze za imunizaciju različitih sojeva laboratorijskih miševa atenuiranim ili rekombinantnim sojevima *T. gondii* koji su korišćeni kao kandidati za žive vakcine, dok je doza za re-infekciju u skladu sa prethodnim studijama (Cerede et al., 2005; Mevelec et al., 2020). Upotreba soja RH za re-infekciju je vrlo česta praksa koja omogućava praćenje ishoda imunizacije kroz preživljavanje re-inficiranih životinja, obzirom da je zbog visoke virulencije infekcija RH sojem uvek letalna za naivne jedinke gotovo svih sojeva laboratorijskih miševa (Mevelec et al., 2020). U kontekstu ispitivanja stečenog imuniteta, tendencija RH soja da ostane u obliku tahizoita, koja se održava čak u uslovima sa pojačanim imunološkim pritiskom, implicira zapravo izostanak superinfekcije, koja se ogleda u prisustvu tkivnih cista. Uz to, ističe se značaj M1, citotoksičnih CD8<sup>+</sup> limfocita i specifičnih antitela kao mehanizama rezistencije koji smanjuju broj tahizoita (Jensen et al., 2015). Uticaj aktivacije STAT6 od strane ROP16 i posledične polarizacije MF na M2 fenotip predstavlja lokalizovan fenomen u peritoneumu koji se odnosi na inficirane ćelije, što je nesumnjivo korisno za diseminaciju parazita, a posebno značajno u primoinfekciji, u odsustvu opsonizujućih antitela i specifičnih CD8<sup>+</sup> limfocita, jer omogućava uspostavljanje infekcije na različitim lokalitetima.

Nejasno je pak da li je ovaj efekat značajan u kontekstu re-infekcije, kada citokinsko okruženje ima daleko snažniji uticaj na polarizaciju i održavanje fenotipa MF, ali činjenica da su sve životinje imunizovane genotipovima EQ40, K1, EQ39 (ToxoDB#54) kao i dG13 preživele re-infekciju, iako su inficirane dozom RH soja (ToxoDB#10) koja bi dovela do smrtnog ishoda kod naivnih miševa u roku od 10 dana, upućuje na zaključak da uspostavljanje infekcije RH sojem (ToxoDB#10) nije bilo uspešno. Ovo ističe značaj već postojećih M1, specifičnih IgG antitela i specifičnih CD8<sup>+</sup> limfocita za eliminaciju RH tahizoita. Sem toga, svi miševi imunizovani sojem BGD18 (ToxoDB#54), koji poseduje ROP16<sub>II</sub> i nema sposobnost aktivacije STAT6 te je polarizacija MF usmeravana ka M1 fenotipu u primoinfekciji, takođe su preživeli re-infekciju, što dodatno pokazuje da polarizacija MF nije značajna kod re-infekcije. Iako nije eksperimentalno utvrđeno ovde, sumnja da je zaista došlo do eliminacije RH tahizoita zasnovana je na eksperimentalnim rezultatima Jensen et al., (2015) gde je pokazan postepen nestanak bioluminiscentnih RH-*Luc* tahizoita nakon re-infekcije miševa imunizovanim atipičnim MAS (ToxoDB#17) sojem. Iako Jensen et al., (2015) nisu utvrdili kompletnu eliminaciju RH-*Luc* ni nakon 23 dana, vrlo verovatno zbog relativno visoke infektivne doze od 2 x 10<sup>5</sup> tahizoita,

utvrđeno je da imunizovani miševi efikasno kontrolišu replikaciju tahizoita. Takođe primećeno je da je izolacija RH tahizoita iz mozga imunizovanih životinja retka, zbog smanjene tendencije da formira ciste i dodatno upućuje na eliminaciju kao objašnjenje za preživljavanje (Jensen et al., 2015).

Interesantno je pak da re-infekcija sojem GT1, takođe arhetipom I (ToxoDB#10), ima letalan ishod za 100 % miševa imunizovanih arhetipom III (ToxoDB#2). Ovaj rezultat je neočekivan i dovodi u pitanje ne samo validnost testiranja stečenog imuniteta RH sojem već i njegov status kao laboratorijskog modela za arhetip I (ToxoDB#10). Sem 1,394 detektovanih SNP i insercija i delecija nukleotida (engl. *indel*), koji čine razlike na nivou sekvence između GT1 i RH, identifikovana su i dva gena kandidata, GRA2 i GRA15, kod kojih se smatra da su SNP odgovorni za jedinstvene fenotipove *in vivo* koji se ogledaju u imunskom odgovoru na infekciju (Yang et al., 2013). Dok je GRA2 protein povezan sa rezistencijom na IRG posredovano uništavanje parazitoformnih vakuola u mišjem modelu, koja je snažnija kod RH iako su oba soja smatraju rezistentnim, GRA15, koji predstavlja funkcionalni protein od 635 AK samo kod GT1, značajno aktivira translokaciju NF- $\kappa$ B, dok je suprimirana kod RH, jer je protein skraćen na svega 312 AK (Rosowski et al., 2011; Yang et al., 2013). Da li RH stoga eksprimira funkcionalni GRA15 protein nije zapravo jasno, niti da li je efekat mutacije sem stvaranja stop kodona zapravo dobijanje nove funkcije kao specifičnog inhibitora TF NF- $\kappa$ B. Pokazano je da NF- $\kappa$ B posreduje transkripciju pro-inflamatornih ali i anti-inflamatornih citokina, te je moguće da za razliku od RH soja (ToxoDB#10), nakon re-infekcije značajno remeti zaštitno citokinsko okruženje stvoreno nakon primoinfekcije kao podrška funkciji imunskih ćelija da bi uspešno savladale i kontrolisale infekciju (Lawrence, 2009; Liu et al., 2017). Imajući u vidu da su prema rezultatima Jensen et al. (2015) C57B6 miševi re-inficirani GT1 sojem (ToxoDB#10) uginuli nakon 12 dana, vrlo je verovatno, iako autori nisu prikazali eksperimentalne dokaze, da je nekontrolisana inflamacija koja je posledica sinteze pro-inflamatornih citokina ali i genskih predispozicija soja C57B6 za Th-1 i neadekvatnu kontrolu *T. gondii* infekcije, izazvala smrtni ishod, a da je u ovom kontekstu superinfekcija od manjeg značaja (Tsitsiklis et al., 2019). Ovi nalazi između ostalog upućuju na oprez u interpretaciji uticaja tipa alela genskih markera virulencije u kontekstu imunskog odgovora domaćina, jer slučaj GRA15 jasno ističe funkciju produkta genskog markera virulencije u odnosu na sekvencu i ukazuje na potrebu uvođenja analitičkih metoda za utvrđivanje njihove enzimске aktivnosti. Takođe, dogma da stečeni imunitet štiti domaćina od posledica re-infekcije, iako je sasvim sigurno validna za veliku većinu domaćina i genotipova, ipak zahteva rigorozniju eksperimentalnu potvrdu, o čemu svedoče rezultati Jensen et al. (2015). Ovo je posebno značajno u svetlu kliničkih podataka o nekoliko slučajeva re-infekcije kod hronično inficiranih trudnica, koji su za posledicu imali vertikalnu transmisiju tahizoita na plod (Elbez-Rubinstein et al., 2009).

### Imunski odgovor nakon re-infekcije

Najviši relativni nivoi ekspresije IL-12p40, IFN- $\gamma$  i IL-10 30 dana nakon re-infekcije su utvrđeni u mozgu miševa imunizovanih genotipom G13, dok je u slezini, povišen nivo citokina IL-10 primećen kod genotipa EQ40 (Graf. 16). Nivoi IL-12p40 u slezini su niski, slični nivoima 42. dana nakon primoinfekcije, izuzev u pojedinim životinjama, dok su viši u mozgu, što zaista upućuje na kontinuirano prisustvo antigena predominantno lokalizovano u tkivima gde se već nalaze parazitske ciste, ali koja su i predilekciona za tahizoite (Tiwari et al., 2019; Suzuki et al., 2021). Visoki nivoi IL-10 u miševima inficiranim genotipom EQ40, koji nisu primećeni tokom rane niti kasne primoinfekcije, ukazuju na mogućnost da ekspresija IL-10 nije samo posledica restimulacije postojećih antigen specifičnih limfocita, već *de novo* indukcija kod leukocita. Iako nije eksperimentalno utvrđeno ovde, rezultati Jenkins et al. (2015) upućuju na prisustvo tahizoita čak 23 dana nakon re-infekcije, što je moguće, imajući u vidu da je prag odoljevanja konverziji izuzetno visok kod RH soja (ToxoDB#10) kao i stopa proliferacije, te je infiltracija leukocita u inficirana tkiva sasvim očekivana kao i ekspresija IL-10, možda upravo kao posledica

konstitutivne aktivacije STAT3/6 od strane ROP16. U ovom slučaju je evidentno da imunizacija intermedijarno virulentnim sojem kao i re-infekcija sa visoko virulentnim sojem, ukoliko su infektivne doze niske, zapravo uslovljavaju vrlo povoljan imunski odgovor za domaćina, ali i za parazita, jer omogućavaju transmisiju oba soja. U kontekstu vakcinacije, velika većina potencijalnih kandidata upravo predstavlja derivate visoko virulentnog arhetipa I (ToxoDB#10) i intermedijarno virulentnog arhetipa II (ToxoDB#1), te je određen nivo virulencije već prepoznat kao povoljan (Cerede et al, 2005; Mevelec et al., 2020). Izuzetno mali broj kandidata pripada lozi III, što je nesumnjivo posledica istraživanja koja su utvrdila da je arhetip loze III (ToxoDB#2) niske virulencije, iako novija saznanja upućuju na činjenicu da postoje vrlo značajni izuzeci, (Fernandez-Escobar et al., 2021). O višoj virulenciji genotipova loze III govore i ovde prikazani podaci.

Rezultati *in vitro* analize kinetike invazije tahizoita G13 su uputile na mogućnost defekta u invaziji koji uslovljava nizak broj inficiranih ćelija, a koji je vrlo verovatno doprineo niskoj ekspresiji sva tri citokina u ranoj infekciji. Uticaj ovog potencijalnog defekta u kasnoj infekciji, kada je parazit incistiran, mnogo je manji, te se posledično i primećuju viši nivoi ekspresije sva tri citokina kao i da su nivo specifičnih IgG antitela, kao i nivo ekspresije IFN- $\gamma$  nakon restimulacija perifernih limfocita, slični kao kod miševa inficiranih ostalim varijantnim genotipovima loze III. Ovi rezultati i činjenica da su svi miševi preživeli re-infekciju RH sojem (ToxoDB#10), upućuju na zaključak da je imunski odgovor bio efikasan u kontekstu zaštite od letalnog ishoda, ali visoki nivoi relativne ekspresije citokina u mozgu 30. dana nakon re-infekcije mogu ukazivati na mogućnost dužeg prisustva velikog broja RH tahizoita kod miševa imunizovanih genotipom G13. Ukoliko je to slučaj, implikacija može biti da imunizacija rekombinantnim sojevima sa defektom u invaziji, kao što je AMA1 *knockout*, ne predstavlja svrsishodnu strategiju (Garcia et al., 2014).

Interesantno je da su srednje vrednosti nivoa specifičnih IgG antitela niže u odnosu na primoinfekciju kod miševa inficiranih svim genotipovima izuzev K1, kod kojih je statistički značajno najviša vrednost, i BGD18 (ToxoDB#1) (Graf. 17). Opadanje IgG titra u kasnoj infekciji je očekivano kod većine inficiranih domaćina, dok je nejasno da li re-infekcija u svim slučajevima nužno izaziva povišenu sekreciju specifičnih IgG antitela (Dubey, 1995; Villard et al., 2016). Rezultati MAT testa impliciraju da je nakon re-infekcije došlo do snažnijeg odgovora B-ćelija kod miševa inficiranih genotipom K1 i kontrolnim sojem BGD18 (ToxoDB#1), što je evidentno kroz porast nivoa specifičnih IgG antitela, i može da upućuje na značajne razlike u brojnosti ili heterogenosti populacije B-ćelija stvorenih nakon primoinfekcije kod ovih životinja, što opet ukazuje na jedinstvenost antigena ovog genotipa, ali i ostalih genotipova loze III. Uvid u citokinski profil i nivo specifičnih IgG antitela nakon infekcije ispitivanim genotipovima ukazuje na to da se virulencija kod *T. gondii* ne ispoljava kao nedostatak ili neefikasnost imunskog odgovora kod domaćina, već kao intenzitet proinflatornog imunskog odgovora. Iako su u literaturi opisani brojni mehanizmi ovog parazita za eskiviranje urođenog imuniteta, koji je ključan za kontrolu replikacije tahizoita i inicijaciju adaptivnog imunskog odgovora, činjenica da su sve životinje inficirane ispitivanim genotipovima ali i kontrolnim sojem BGD18 (ToxoDB#1) preživele re-infekciju sojem RH, koji nema sposobnost superinfekcije, zbog smanjenje tendencije da formira tkivne ciste, implicira da je odbrana efikasna nezavisno od virulencije ( Lambert i Barragan, 2009; Blader i Saeij, 2009; Hunter i Sibley, 2012; Lima i Lodoen, 2019).

Mehanizmi rezistencije su efikasni čak i kod genotipova niske virulencije, uprkos nižem pragu za konverziju koji uslovljava zapravo mnogo kratkotrajnije interakcije tahizoita sa ćelijama domaćina, što svedoči o brzini razvoja tih mehanizama nakon infekcije (Uzelac et al., 2020). Da je brzina ključna pokazuje činjenica da je stopa proliferacije tahizoita različitih genotipova

korelira sa virulencijom, jer visoka stopa proliferacije uslovljava i višu smrtnost ćelija domaćina i dovodi do patologije, te je ko- evolucija parazita i domaćina vrlo verovatno bila usmeravana ka razvijanju mehanizama rezistencije koji se rapidno mobilisu i ispoljavaju svoje anti-toksoplazmatsko dejstvo.

Imajući u vidu da je odgovor na ovu infekciju uvek pro-inflamatorni, iako postoji autoregulacija proliferacije kod pojedinih genotipova koja se postiže indukcijom anti-inflamatornih citokina (IL-10) i medijatora (ARG1), ističe se značaj anti-inflamatornog dejstva u vidu kontrole pro-inflamatornog odgovora u ranoj infekciji sa virulentnim genotipovima, kao i za promovisanje dugoročne tolerancije prisustva parazitskih cista, što dolazi do izražaja u kasnoj infekciji (Ihle, 2001; Robben et al., 2004; Saeij et al., 2006; Leng et al., 2010; Butcher et al., 2011, Tuladhar et al., 2019). Iako su se ispitivanja mehanizma virulencije uglavnom usmeravala ka istraživanju interakcije tahizoita sa ćelijama domaćina, jer upravo iz tih interakcija proizlazi i odbrana domaćina od infekcije, interesantno je da je prisustvo antigena poreklom od bradizoita zapravo vrlo verovatno doživotno kod domaćina, na šta upućuju i nalazi ekspresije IL-12p40 u kasnoj infekciji. Uloga antigena različitih genotipova u diktiranju repertoara T-ćelijskih receptora antigen specifičnih limfocita nije istaknuta u dosadašnjoj literaturi, iako su različite populacije ovih ćelija kod životinja inficiranih različitim genotipovima *T. gondii*, zapravo očekivane i implicirane nalazima razlika u IFN- $\gamma$  ekspresiji nakon re-stimulacije kao i IgG titru nakon re-infekcije, jer upravo one mogu značajno da utiču na tok re-infekcije, razvoj patologije ali i toleranciju superinfekcije. Razlike u antigenu pak nisu nužno u korelaciji sa virulencijom, već vrlo verovatno mogu da se sagledaju u kontekstu filogenetske srodnosti različitih genotipova.

## Zaključci

Na osnovu nalaza različitih eksperimenata izvedenih u okviru ovog istraživanja izvedeni su sledeći zaključci:

1. U opštoj populacionoj strukturi *T. gondii* u Srbiji postoji visok kombinovan udeo arhetipova II (ToxoDB#1) i III (ToxoDB#2) od 42%, dok sam udeo arhetipa II (ToxoDB#1) čini čak 33% strukture. Ovo ukazuje na dominantnost arhetipova u odnosu na nešto niži udeo (37%) varijantnih genotipova obe loze, kao i na to da je diverzitet populacije genotipova u Srbiji nizak.
2. U silvatičnoj populacionoj strukturi *T. gondii*, za razliku od opšte populacije, postoji visoka učestalost varijantnih genotipova (48%), te se zaključuje da je diverzitet populacije genotipova u silvatičnoj sredini u Srbiji visok. Uz to, zbog prisustva genotipova u silvatičnoj sredini, koji su detektovani ali nisu izolovani te nisu mogli biti ni eksperimentalno ispitani, zaključuje se da u silvatičnoj sredini kruže genotipovi nepoznate virulencije.
3. Nalaz istog genotipa, detektovanog u uzorku srca lisice (061-13), i izolovanog iz srca domaće kokoške (K1), navodi na zaključak da dolazi do razmene genotipova između domaće i silvatične sredine, što može biti od značaja za javno zdravlje.
4. Razlike u diverzitetu genotipova kod lisica (visok – 8 od 9 različitih genotipova) i zlatnih šakala (nizak – 6 od 13 različitih genotipova), koji se često hrane otpadom antropogenog porekla, navode na zaključak da se visok diverzitet populacije genotipova održava samo kod divljih životinja koje se prvenstveno ne hrane takvim otpadom. Ukoliko se pak hrane otpadom antropogenog porekla, divlje životinje postaju rezervoari genotipova koji kruže u domaćoj sredini, što ima za posledice širenje nisko virulentnog arhetipa II (ToxoDB#1), kao i smanjenje diverziteta populacije genotipova u čovekovom okruženju.
5. Na osnovu genotipizacije izolata EQ40, EQ39, K1 i G13 zaključuje se da su svi različitih genotipova, ali da pripadaju lozi III.
6. Činjenica da je genotip EQ40, iako nije pohranjen u ToxoDB, osim u Srbiji takođe izolovan u Africi kao i u nekim drugim zemljama južne Evrope, a uzimajući u obzir i opšte razlike u nalazima genotipova *T. gondii* poreklom iz južne Evrope u odnosu na centralnu i severnu Evropu, ukazuje na to da su zemlje južne Evrope region u kojem se dešava razmena i gde se mešaju genotipovi oba kontinenta.
7. Tipizacija alela gena markera virulencije je pokazala identične tipove alela ROP5, ROP18, ROP16 i GRA15 kod sva četiri ispitana soja loze III. Zaključuje se da analiza gena markera virulencije nije u korelaciji sa virulencijom ispoljenom *in vivo* u mišjem modelu. Takođe se zaključuje da je kombinacija ROP5<sub>3</sub>/ROP18<sub>3</sub> niske prediktivne vrednosti za virulenciju što je u suprotnosti sa nekim publikovanim rezultatima.
8. Iz rezultata određivanja virulencije *in vivo* izražene kroz mortalitet inficiranih miševa zaključuje se da su EQ40 (kumulativni mortalitet 69,4%) i K1 (kumulativni mortalitet 38,8%) intermedijarno virulentni, dok su EQ39 (ToxoDB#54, kumulativni mortalitet 6,8%) i G13 (kumulativni mortalitet 10,7%) nisko virulentni.

9. Poređenje kumulativnog mortaliteta sa fenotipom virulencije navodi na zaključak da se *in vitro* virulencija najbolje ogleda kroz litički kapacitet (broj plakova), a zatim po broju parazita po vakuoli nakon 48 h. Takođe se zaključuje da se defekt(i) u procesu invazije, primećeni kod G13 kod kojeg je vreme invazije iznosilo 3 h, *in vivo* ispoljavaju kao niska virulencija.
10. Rezultati ispitivanja fenotipa virulencije *in vitro* navode na zaključak da je mehanizam koji doprinosi intrinzičnoj virulenciji EQ40 i K1 viša metabolička aktivnost koja se ogleda u ekspresiji ENO2, tako što podržava visoke stope rasta i litičnog kapaciteta i čiji se viši nivo u odnosu na nisko virulentne genotipove održava čak nakon 10 dana kultivacije.
11. Uvidom u nivo ekspresije citokina u ranoj infekciji sojem EQ40, i to visokog nivoa IFN- $\gamma$  i IL-12, a niskog IL-10, zaključuje se da se virulencija *T. gondii* kod domaćina odražava u različitom intenzitetu pro-inflamatornog odgovora tipa Th-1. Poređenjem nivoa ekspresije sva tri citokina kod ostalih genotipova loze III kao i kontrolnog soja BGD18 (ToxoDB#1) zaključuje se da se ni kod nisko virulentnih genotipova ne menja tip imunskog odgovora.
12. Prisustvo IL-12p40 u mozgu miševa inficiranih svim ispitivanim genotipovima, u hroničnoj infekciji 42. dana nakon inokulacije kada se očekuje da se parazit u organima nalazi u obliku bradizoita u tkivnim cistama, ukazuje na to da je DC i MF i dalje dostupan antigen.
13. Nizak nivo ekspresije IL-10 u organima miševa u hroničnoj infekciji koji su inficirani genotipovima loze III u odnosu na visok nivo ekspresije utvrđenom kod miševa inficiranih kontrolnim sojem BGD18 (ToxoDB#1), moguća je posledica razlika u sastavu i strukturi antigena poreklom od bradizoita iz tkivnih cista.
14. Blago povišen titar IgG antitela utvrđen MAT testom u serumu miševa inficiranih genotipovima loze III u odnosu na arhetip loze II, iako nije statistički značajan, ukazuje na moguće razlike u sastavu (epitopa) antigena.
15. Činjenica da su svi miševi inficirani genotipovima loze III kao i kontrolnim sojem BGD18 (ToxoDB#1) preživeli re-infekciju visoko virulentnim RH sojem (ToxoDB#10) navodi na zaključak da je imunska zaštita nezavisna od soja korišćenog za imunizaciju. Međutim, nisko virulentan genotip G13, zbog defekta u invaziji, koji je doveo do manje intenzivnog Th-1 tipa imunskog odgovora, vrlo verovatno i manje efikasno kontroliše proliferaciju RH tahizoita. Ovo je evidentno u visokoj ekspresiji svih citokina 30. dana nakon re-infekcije i upućuje na zaključak da nije dobar kandidat za imunizaciju.

## Literatura

1. Aguirre, A.A.; Longcore, T.; Barbieri, M.; Dabritz, H.; Hill, D.; Klein, P.N.; Lepczyk, C.; Lilly, E.L.; McLeod, R.; Milcarsky, J.; et al. The One Health Approach to Toxoplasmosis: Epidemiology, Control, and Prevention Strategies. *EcoHealth*, **2019**, *16*, 378–390, <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01405-7>.
2. Ajzenberg, D. Type I strains in human toxoplasmosis: myth or reality? *Future Microbiol.*, **2010**, *5*, 841-843, doi: 10.2217/fmb.10.55.
3. Ajzenberg, D.; Bañuls, A.L.; Su, C.; Dumètre, A.; Demar, M.; Carne, B.; Dardé, M.L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, **2004**, *34*, 1185-1196, <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.06.007>.
4. Ajzenberg, D.; Yera, H.; Marty, P.; Paris, L.; Dalle, F.; Menotti, J.; Aubert, D.; Franck, J.; Bessières, M.H.; Quinio, D.; Pelloux, H.; Delhaes, L.; Desbois, N.; Thulliez, P.; Robert-Gangneux, F.; Kauffmann-Lacroix, C.; Pujol, S.; Rabodonirina, M.; Bounoux, M.E.; Cuisenier, B.; Duhamel, C.; Duong, T.H.; Filisetti, D.; Flori, P.; Gay-Andrieu, F.; Pratlong, F.; Nevez, G.; Totet, A.; Carne, B.; Bonnabau, H.; Dardé, M.L.; Villena, I. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. *J. Infect. Dis.*, **2009**, *199*, 8, 1155-67. doi: 10.1086/597477.
5. Ajzenberg, D.; Collinet, F.; Mercier, A.; Vignoles, P.; Dardé, M.L. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, **2010**, *48*, 4641-4645.
6. Alexander, D.L.; Mital, J.; Ward, G.E.; Bradley, P.; Boothroyd, J.C. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog.*, **2005**, *1*, 2, e17. doi: 10.1371/journal.ppat.0010017.
7. Aliberti, J.; Reis e Sousa, C.; Schito, M.; Hieny, S.; Wells, T.; Huffnagle, G.B.; Sher, A. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nat. Immunol.*, **2000** *1*, 1, 83-7. doi: 10.1038/76957.
8. Attias, M.; Teixeira, D.E.; Benchimol, M.; Vommaro, R.C.; Crepaldi, P.H.; De Souza, W. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasit. Vectors*, **2020**, *13*, 588, <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04445-z>.
9. Aubert, D.; Villena, I. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne Region, France. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, **2009**, *104*, 2, 290-5. doi: 10.1590/s0074-02762009000200023
10. Baba, M.; Batanova, T.; Kitoh, K.; Takashima, Y. Adhesion of *Toxoplasma gondii* tachyzoite-infected vehicle leukocytes to capillary endothelial cells triggers timely parasite egression. *Sci. Rep.*, **2017**, *7*, 5675. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05956-z>
11. Bahia-Oliveira, L.M.; Jones, J.L.; Azevedo-Silva, J.; Alves, C.C.; Orefice, F.; Addiss, D.G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect Dis.*, **2003**, *9*, 55–62.
12. Barragan, A.; Sibley, L.D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol.*, **2003**, *11*, 9, 426-430, [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00205-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00205-1)
13. Bargieri, D.Y.; Andenmatten, N.; Lagal, V.; Thiberge, S.; Whitelaw, J.A.; Tardieux, I.; Meissner, M.; Ménard, R. Apical membrane antigen 1 mediates apicomplexan parasite attachment but is dispensable for host cell invasion. *Nat. Commun.*, **2013**, *4*, 2552. doi: 10.1038/ncomms3552.

14. Besteiro, S.; Dubremetz, J.F.; Lebrun, M. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cell Microbiol.*, **2011**,13, 6, 797-805. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01597.x.
15. Besteiro, S.; Michelin, A.; Poncet, J.; Dubremetz, J.F.; Lebrun, M. Export of a *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion. *PLoS Pathog.*, **2009**, 5, 2, e1000309. doi: 10.1371/journal.ppat.1000309.
16. Benenson, M.W.; Takafuji, E.T.; Lemon, S.M.; Greenup, R.L.; Sulzer, A.J. Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *N. Engl. J. Med.*, **1982**, 307, 666-669, doi: 10.1056/NEJM198209093071107.
17. Bhadra, R.; Gigley, J.P.; Khan, I.A. The CD8 T-cell road to immunotherapy of toxoplasmosis. *Immunotherapy*, **2011**, 3, 6, 789-801. doi:10.2217/imt.11.68
18. Bichet, M.; Joly, C.; Henni, A.H.; Guilbert, T.; Xémard, M.; Tafani, V.; Lagal, V.; Charras, G.; Tardieux I. The toxoplasma-host cell junction is anchored to the cell cortex to sustain parasite invasive force. *BMC Biol.*, **2014**, 31, 12, 773. doi: 10.1186/s12915-014-0108-y.
19. Bigna, J.J.; Tochie, J.N.; Tounouga, D.N.; Bekolo, A.O.; Ymele, N.S.; Youda, E.L.; Sime, P.S.; Nansseu, J.R. Global, regional, and country seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pregnant women: a systematic review, modelling and meta-analysis. *Sci. Rep.*, **2020**, 10, 12102, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69078-9>
20. Blader, I.J.; Saeij, J.P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS.*, **2009**, 117, 5-6, 458-76. doi: 10.1111/j.1600-0463.2009.02453.x.
21. Black, M.W.; Boothroyd, J.C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. and Molec. Biology Rev.*, **2000**, 64, 3, 607-623, DOI: 10.1128/MMBR.64.3.607-623.2000.
22. Bobić, B.; Nikolić, A.; Klun, I.; Vujanić, M.; Djurković-Djaković, O. Undercooked meat consumption remains the major risk factor for *Toxoplasma* infection in Serbia. *Parassitologia*, **2007**, 49, 4, 227-30.
23. Bohne, W.; Heesemann, J.; Gross, U. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. *Infect Immun.*, **1993**, 61, 3, 1141-5. doi: 10.1128/IAI.61.3.1141-1145.1993.
24. Bonačić Marinović, A.A.; Opsteegh, M.; Deng, H.; Suijkerbuijk, A.W.M.; van Gils, P.F.; van der Giessen, J. Prospects of toxoplasmosis control by cat vaccination. *Epidemics.*, **2019**, 30, 100380. doi: 10.1016/j.epidem.2019.100380.
25. Bouwknegt, M.; Devleeschauwer, B.; Graham, H.; Robertson, L.J.; van der Giessen, J.W. Prioritisation of food-borne parasites in Europe, **2016**. *Euro Surveill.*, 2018, 23
26. Boyle, J.P.; Rajasekar, B.; Saeij, J.P.J.; Ajioka, J.W.; Berriman, M.; Paulsen, I.; Roos, D.S.; Sibley, L.D.; White, M.W.; Boothroyd, J.C. Just one cross appears capable of dramatically altering the population biology of a eukaryotic pathogen like *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, 103, 27, 10514-10519, DOI: 10.1073/pnas.0510319103.
27. Butcher, B.A.; Denkers, E.Y. Mechanism of entry determines the ability of *Toxoplasma gondii* to inhibit macrophage proinflammatory cytokine production. *Infect. Immun.*, **2002**, 70, 5216–5224.
28. Butcher, B.A.; Kim, L.; Panopoulos, A.D.; Watowich, S.S.; Murray, P.J.; Denkers, E.Y. L-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF-alpha in host macrophages. *J. Immunol.*, **2005**, 174, 6, 3148-52.
29. Buxton, D.; Innes, E. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitol.*, **1995**, 110, S11–S16.



30. Buzoni-Gatel, D.; Schulthess, J.; Menard, L.C.; Kasper, L.H. Mucosal defenses against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. *Cell Microbiol.*, **2006**, 8, 535–544
31. Calero-Bernal, R.; Saugar, J.M.; Frontera, E.; Pérez-Martín, J.E.; Habela, M.A.; Serrano, F.J.; Reina, D.; Fuentes, I. Prevalence and Genotype Identification of *Toxoplasma gondii* in Wild Animals from Southwestern Spain. *J. Wildl. Dis.*, **2015**, 51, 1, 233–238. doi: <https://doi.org/10.7589/2013-09-233>
32. Can, H.; Döşkaya, M.; Ajzenberg, D.; Özdemir, H.G.; Caner, A.; İz, S.G.; Döşkaya, A.D.; Atalay, E.; Cetinkaya, C.; Ürgen, S.; Karacali, S.; Ün, C.; Darde, M.L.; Gürüz, Y. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates and toxoplasmosis seroprevalence in stray cats of İzmir, Turkey. *PLoS One.*, **2014**, 9, 8, e104930. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104930> eCollection 2014. PMID: 25127360
33. Cekanaviciute, E.; Dietrich, H.K.; Axtell, R.C.; Williams, A.M.; Egusquiza, R.; Wai, K.M.; Koshy, A.A.; Buckwalter, M.S. Astrocytic TGF- $\beta$  signaling limits inflammation and reduces neuronal damage during central nervous system *Toxoplasma* infection. *J. Immunol.*, **2014**, 193, 1, 139-49. doi: 10.4049/jimmunol.1303284.
34. Cérède O., Dubremetz J. F., Soète M., Deslée D., Vial H., Bout D., Lebrun, M. Synergistic Role of Micronemal Proteins in *Toxoplasma Gondii* Virulence. *J. Exp. Med.*, **2005**, 201, 3, 453–463. doi: 10.1084/jem.2004167
35. Charron, A.J.; Sibley, L.D. Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Traffic.*, **2004**, 5, 11, 855-67. doi: 10.1111/j.1600-0854.2004.00228.x
36. Chapron, G.; Kaczensky, P.; Linnell, J.D.; von Arx, M.; Huber, D.; Andrén, H.; et al. Recovery of large carnivores in Europe's modern human-dominated landscapes. *Science*, **2014**, 346, 1517-1519, doi: 10.1126/science.1257553.
37. Ćirković, V.; Uzelac, A; Miličić, D.; Klun, I.; Djurković-Djaković, O. First detection of *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) (Eucoccidiorida: Sarcocystidae) in river waters in Serbia. *Acta Zool. Bulg.*, **2020**, 72, 15, 79-83.
38. Ćirović, D.; Penezić, A.; Milenković, M.; Paunović, M. Winter diet composition of the golden jackal (*Canis aureus* L., 1758) in Serbia. *Mammal. Biol.*, **2014**, 79, 2, 132-137. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2013.11.003>.
39. Ćirović, D.; Chochlakis, D.; Tomanović, S.; Sukara, R.; Penezić, A.; Tselentis, Y.; Psaroulaki, A. Presence of *Leishmania* and *Brucella* species in the golden jackal *Canis aureus* in Serbia. *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 728516, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/728516>.
40. Ćirović, D.; Teodorović, V.; Vasilev, D.; Marković, M.; Ćosić, N.; Dimitrijević, M.; Klun, I.; Djurković-Djaković, O. A large-scale study of the *Trichinella* genus in the golden jackal (*Canis aureus*) population in Serbia. *Vet. Parasitol.*, **2015**, 3-4, 253-256, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.07.022>.
41. Dardé, M.L. *Toxoplasma gondii*, “New” Genotypes and Virulence. *Parasite*, **2008**, 15, 366–371, doi:10.1051/parasite/2008153366.
42. De Craeye, E.; Speybroeck, N.; Ajzenberg, D.; Darde, M.L.; Collinet, F.; Tavernier, P.; Van Gucht, S.; Dorny, P.; Dierick, K. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wildlife: Common parasites in Belgian foxes and Cervidae? *Vet. Parasitol.*, **2011**, 178, 64-69, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.016>.
43. de Sousa, S.; Ajzenberg, D.; Canada, N.; Freire, L.; da Costa, J.M.C.; Dardé, M.L.; Thulliez, P.; Dubey, J.P. Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. *Vet. Parasitol.*, **2005**, 135, 133–136, doi:10.1016/j.vetpar.2005.08.012.
44. Delorme-Walker, V.; Abrivard, M.; Lagal, V.; Anderson, K.; Perazzi, A.; Gonzalez, V.; Page, C.; Chauvet, J.; Ochoa, W.; Volkmann, N.; Hanein, D.; Tardieux, I. Toxofilin

- upregulates the host cortical actin cytoskeleton dynamics, facilitating *Toxoplasma* invasion. *J. Cell Sci.*, **2012**, 15, 125, 18, 4333-42. doi: 10.1242/jcs.103648.
45. 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. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clin. Infect. Dis.*, **2007**, 45, 7, e88-95. doi: 10.1086/521246.
46. Deng, H.; Cummins, R.; Schares, G.; Trevisan, C.; Enemark, H.; Waap, H.; Srbljanovic, J.; Djurkovic-Djakovic, O.; Pires, S.M.; van der Giessen, J.W.B.; Opsteegh, M. Mathematical modelling of *Toxoplasma gondii* transmission: A systematic review. *Food Waterborne Parasitol.*, **2020**, 9, 22, e00102. doi: 10.1016/j.fawpar.2020.e00102.
47. Denkers, E.Y.; Gazzinelli, R.T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, **1998**, 11, 4, 569-588.
48. Desmonts, G.; Remington, J.S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: Method for increasing sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol.*, **1980**, 11, 562-568, doi:10.1128/jcm.11.6.562-568.1980.
49. Desmonts, G.; Couvreur, J. Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. *N. Engl. J. Med.*, **1974**, 16, 290, 20, 1110-6. doi: 10.1056/NEJM197405162902003.
50. Djurković-Djaković, O.; Dupouy-Camet, J.; Van der Giessen, J.; Dubey, J.P. Toxoplasmosis: Overview from a One Health perspective. *Food Waterborne Parasitol.*, **2019**, 15, e00054. doi:10.1016/j.fawpar.2019.e00054
51. Djurković-Djaković, O.; Klun, I.; Khan, A.; Nikolić, A.; Knezević-Ušaj, S.; Bobić, B.; Sibley, L.D. A human origin type II strain of *Toxoplasma gondii* causing severe encephalitis in mice, *Microbes Infect.*, **2006**, 8, 2206-2212, <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.04.016>.
52. Djurković-Djaković, O. Toksoplazmoza i imunosupresija [Toxoplasmosis and immunosuppression]. *Srp. Arh. Celok. Lek.*, **1998**, 126, 5-6, 197-203.
53. Döşkaya, M.; Caner, A.; Ajzenberg, D.; Değirmenci, A.; Darde, M.L.; Can, H.; Erdogan, D.D.; Korkmaz, M.; Uner, A.; Güngör, C.; Altintas, K.; Gürüz, Y. Isolation of *Toxoplasma gondii* strains similar to Africa 1 genotype in Turkey. *Parasitol. Int.*, **2013**, 62, 5, 471-474. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.06.008> PMID: 23811201
54. Dubey, J.P.; Pena, H.F.J.; Cerqueira-Cézar, C.K.; Murata, F.H.A.; Kwok, O.C.H.; Yang, Y.R.; Gennari, S.M.; Su, C. Epidemiologic significance of *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): the past decade. *Parasitol.*, **2020**, 147, 12, 1263-1289. doi: 10.1017/S0031182020001134.
55. Dubey, J.P.; VanWhy, K.; Verma, S.K.; Choudhary, S.; Kwok, O.C.; Khan, A.; Behnke, M.S.; Sibley, L.D.; Ferreira, L.R.; Oliveira, S.; et al. Genotyping *Toxoplasma gondii* from wildlife in Pennsylvania and identification of natural recombinants virulent to mice. *Vet. Parasitol.*, **2014**, 200, 74-84, doi:10.1016/j.vetpar.2013.11.001.
56. Dubey, J.P. The History and Life Cycle of *Toxoplasma gondii*. Chapter 1, *Toxoplasma Gondii* (2<sup>nd</sup> edition), **2014**, 1-17
57. Dubey, J.P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, **2009**, 39, 8, 877-82, doi:10.1016/j.ijpara.2009.01.005.
58. Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Speer, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.*, **1998**, 11, 267-299, doi:10.1128/CMR.11.2.267.
59. Dubey, J.P.; Ruff, M.D.; Camargo, M.E.; Shen, S.K.; Wilkins, G.L.; Kwok, O.C.; Thulliez, P. Serologic and parasitologic responses of domestic chickens after oral inoculation with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Am. J. Vet. Res.*, **1993**, 54, 10, 1668-72.

60. Dubey, J.P.; Miller, N.L.; Frenkel J.K. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.*, **1970**, *56*, 447-456.  
Dubey, J.P.; Miller, N.L.; Frenkel J.K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J. Exp. Med.*, **1970**, *132*, 636-662.
61. Dubey, J.P.; Miller, N.L.; Frenkel, J.K. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1970** *157*, 11, 1767-70
62. Dumètre, A.; Dubey, J.P.; Ferguson, D.J.P.; Bongrand, P.; Azas, N.; Puech, P.-H. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2013**, *110*, 11535–11540, doi:10.1073/pnas.1308425110.
63. Dzierszinski, F.; Mortuaire, M.; Dendouga, N.; Popescu, O.; Tomavo, S. Differential expression of two plant-like enolases with distinct enzymatic and antigenic properties during stage conversion of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Mol. Biol.*, **2001**, *309*, 1017–1027, doi:10.1006/jmbi.2001.4730.
64. Dzierszinski, F.; Nishi, M.; Ouko, L.; Roos, D.S. Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. *Eukaryot Cell.*, **2004**, *3*, 4, 992-1003. doi:10.1128/EC.3.4.992-1003.2004
65. Dzierszinski, F.; Pepper, M.; Stumhofer, J.S.; LaRosa, D.F.; Wilson, E.H.; Turka, L.A.; Halonen, S.K.; Hunter, C.A.; Roos, D.S. Presentation of *Toxoplasma gondii* antigens via the endogenous major histocompatibility complex class I pathway in nonprofessional and professional antigen-presenting cells. *Infect Immun.* **2007**, *75*, 11, 5200-5209. doi:10.1128/IAI.00954-07
66. Elbez-Rubinstein, A.; Ajzenberg, D.; Dardé, M.L.; Cohen, R.; Dumètre, A.; Year, H.; Gondon, E.; Janaud, J.C.; Thulliez, P. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *J. Infect. Dis.*, **2009**, *15*, 199, 2, 280-5. doi: 10.1086/595793.
67. Elmore, S.A.; Jones, J.L.; Conrad, P.A.; Patton, S.; Lindsay, D.S.; Dubey, J.P. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol.*, **2010**, *26*, 4, 190-6.
68. Etheridge, R.D.; Alaganan, A.; Tang, K.; Lou, H.J.; Turk, B.E.; Sibley, L.D. The *Toxoplasma* pseudokinase ROP5 forms complexes with ROP18 and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice. *Cell Host Microbe.*, **2014**, *15*, 5, 537-550. doi:10.1016/j.chom.2014.04.002
69. Feit, B.; Feit, A.; Letnic, M. Apex Predators Decouple Population Dynamics Between Mesopredators and Their Prey. *Ecosys.*, **2019**, *22*, 1606–1617. <https://doi.org/10.1007/s10021-019-00360-2>.
70. Fernández-Escobar, M.; Calero-Bernal, R.; Benavides, J.; Regidor-Cerrillo, J.; Guerrero-Molina, M.C.; Gutiérrez-Expósito, D.; Collantes-Fernández, E.; Ortega-Mora, L.M. Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in Spanish sheep flocks. *Parasit. Vectors*, **2020**, *5*, 13, 1, 396. doi: 10.1186/s13071-020-04275-z.
71. Fernández-Gil, A.; Quevedo, M.; Barrientos, L.M.; Nuño, A.; Naves, J.; de Gabriel, M.; Ordiz, A.; Revilla, E. Pack size in humanized landscapes: the Iberian wolf population. *Wildlife Biol.* **2020**, *2*, DOI:10.2981/wlb.00594
72. Ferreira-da-Silva, M.F.; Takács, A.C.; Barbosa, H.S.; Gross, U.; Lüder, C.G.K. Primary skeletal muscle cells trigger spontaneous *Toxoplasma gondii* tachyzoite-to-bradyzoite conversion at higher rates than fibroblasts. *Int. J. Med. Microbiol.*, **2009**, *299*, 5, 381-388, <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.10.002>.
73. Fleming, P.J.S.; Huw, N.; Jackson, S.M.; Ballard, G.-A.; Bengsen, A.; Brown, W.Y.; Meek, P.D.; Mifsud, G.; Pal, S.K.; Sparkes, J. Roles for the Canidae in food webs reviewed: Where do they fit? *Food Webs.* **2017**, *12*, 14-34, <https://doi.org/10.1016/j.fooweb.2017.03.001>.

74. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO). Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. Microbiological Risk Assessment Series. FAO/WHO, Rim, **2014**, 23.
75. Fox, B.A.; Bzik, D.J. De novo pyrimidine biosynthesis is required for virulence of *Toxoplasma gondii*. *Nature* **2002**, *415*, 926–929, doi:10.1038/415926a.
76. Fox, B.A.; Gigley, J.P.; Bzik, D.J. *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. *Int. J. Parasitol.*, **2004**, *34*, 3, 323–331.
77. Frenkel, J. K. *Toxoplasma* In and Around Us. *BioScience*, **1973**, *23*, 6, 343-352, <https://doi.org/10.2307/1296513>
78. Frenkel, J.K.; Dubey, J.P.; Miller, N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*, **1970**, *6*, 167, 3919, 893-6. doi: 10.1126/science.167.3919.893.
79. Frenkel, J.K.; Friedlander, S. Pathology of neonatal disease, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Public Health Service Publication No. 141*, Toxoplasmosis, **1951**, 1–150.
80. Freppel, W; Ferguson, D.J.P; Shapiro, K.; Dubey, J.P.; Puech, P.-H.; Dumètre, A. Structure, composition, and roles of the *Toxoplasma gondii* oocyst and sporocyst walls. *Cell Surf.*, **2019**, *5*, 100016, <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2018.100016>.
81. Fulton, J.D.; Turk, J.L. Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. *Lancet*, **1959**, *274*, pp. 1068-1069
82. Galal, L.; Hamidovic, A.; Dardé, M.L.; Mercier, A. Diversity of *Toxoplasma gondii* strains at the global level and its determinants. *Food Waterborne Parasitol.*, **2019**, *15*, e00052. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00052>.
83. Garcia, J.L.; Innes, E.A.; Katzer, F. Current progress toward vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Vaccine: Development and Therapy*. **2014**, *4*, 23-37 <https://doi.org/10.2147/VDT.S57474>
84. Gazzinelli, R.T.; Mendonça-Neto, R.; Lilue, J.; Howard, J.; Sher, A. Innate resistance against *Toxoplasma gondii*: an evolutionary tale of mice, cats, and men. *Cell Host Microbe.*, **2014**, *15*, 2,132-138. doi:10.1016/j.chom.2014.01.004
85. Gazzinelli, R.T.; Wysocka, M.; Hieny, S.; Scharton-Kersten, T.; Cheever, A.; Kühn, R.; Müller, W.; Trinchieri, G.; Sher A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol.*, **1996**, *157*, 2, 798-805.
86. Gazzinelli, R.T.; Eltoun, I.; Wynn, T.A.; Sher, A. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. *J. Immunol.*, **1993**, *151*, 7, 3672-368
87. Gherman, C.M.; Mihalca, A.D. A synoptic overview of golden jackal parasites reveals high diversity of species. *Parasit. Vectors*, **2017**, *10*, 419, doi:10.1186/s13071-017-2329-8.
88. Gigley, J.P.; Rajarshi, B.; Khan I.A. CD8 T Cells and *Toxoplasma gondii*: A New Paradigm. *J. Parasitol. Res.*, **2011**, *2011*, 243796, <https://doi.org/10.1155/2011/243796>
89. Glatman Zaretsky, A.; Silver, J.S.; Siwicki, M.; Durham, A.; Ware, C.F.; Hunter, C.A. Infection with *Toxoplasma gondii* alters lymphotoxin expression associated with changes in splenic architecture. *Infect. Immun.*, **2012**, *80*, 10, 3602-3610. doi:10.1128/IAI.00333-12
90. Gold, D.A.; Kaplan, A.D.; Lis, A.; Bett, G.C.L.; Rosowski, E.E.; Cirelli, K.M.; Bougdour, A.; Sidik, S.M.; Beck, J.R.; Lourido, S.; Egea, P.F.; Bradley, P.J.; Hakimi,

- M.A.; Rasmusson, R.L.; Saeij, J.P. The Toxoplasma Dense Granule Proteins GRA17 and GRA23 Mediate the Movement of Small Molecules between the Host and the Parasitophorous Vacuole. *Cell Host Microbe*, **2015**, 17, 5, 642-52.
91. Goldman, M.; Carver, R.K.; Sulzer, A.J. Reproduction of *Toxoplasma gondii* by internal budding. *J. Parasitol.*, **1958**, 44, 161-171
92. Grigg, M.E.; Suzuki, Y. Sexual recombination and clonal evolution of virulence in Toxoplasma. *Microb. Infect.*, **2003**, 5, 7, 685-690, [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00088-1](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00088-1).
93. Halonen, S.K.; Weiss, L.M. Toxoplasmosis. *Handb. Clin. Neurol.*, **2011**, 114, 125-145, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X>.
94. Halos, L.; Thébault, A.; Aubert, D.; Thomas, M.; Perreta, C.; Geers, R.; Alliota, A.; Escotte-Binet, S.; Ajzenberg, D.; Dardé, M.L.; et al. An innovative survey underlining the significant level of contamination by *Toxoplasma gondii* of ovine meat consumed in France. *Int. J. Parasitol.*, **2010**, 40, 193–200, doi:10.1016/j.ijpara.2009.06.009.
95. Hamidović, A.; Etougbétché, J.R.; Tonouhewa, A.B.N.; Galal, L.; Dobbigny, G.; Houémènou, G.; Da Zoclanclounon, H.; Amagbegnon, R.; Laleye, A.; Fievet, N.; Piry, S.; Berthier, K.; Pena, H.F.J.; Darde, M.L.; Mercier, A. A hotspot of *Toxoplasma gondii* Africa 1 lineage in Benin: How new genotypes from West Africa contribute to understand the parasite genetic diversity worldwide. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2021**, 15, 2, e0008980. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008980>.
96. Hamilton, C.M.; Black, L.; Oliveira, S.; Burrells, A.; Bartley, P.M.; Melo, R.; Chianini, F.; Palarea-Albaladejo, J.; Innes, E.A.; Kelly, P.J.; et al. Comparative virulence of Caribbean, Brazilian and European isolates of *Toxoplasma gondii*. *Parasit. Vectors*, **2019**, 12, 104, doi:10.1186/s13071-019-3372-4.
97. Hassan, M.A.; Olijnik, A.A.; Frickel, E.M.; Saeij, J.P. Clonal and atypical Toxoplasma strain differences in virulence vary with mouse sub-species. *Int. J. Parasitol.*, **2019**, 49, 1, 63-70. doi:10.1016/j.ijpara.2018.08.007
98. Hermann, D.C.; Maksimov, P.; Maksimov, A.; Sutor, A.; Schwarz, S.; Jaschke, W.; Schliephake, A.; Denzin, N.; Conraths, F.J.; Schares, G. *Toxoplasma gondii* in foxes and rodents from the German Federal States of Brandenburg and Saxony-Anhalt: Seroprevalence and genotypes. *Vet. Parasitol.*, **2012**, 185, 78-85, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.10.030>.
99. Hill, D.; Dubey, J.P. Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect.*, **2002**, 8, 10, 634-40.
100. Howe, D.K.; Sibley, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: Correlation of parasite genotype with human disease. *J. of Infect. Dis.*, **1995**, 172, 1561–1566, doi:10.1093/infdis/172.6.1561.
101. Howe, D.K.; Honoré, S.; Derouin, F.; Sibley, L.D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.*, **1997**, 35, 6, 1411-4. doi: 10.1128/JCM.35.6.1411-1414.1997.
102. Hutchinson, W. Experimental Transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature* **206**, 1965, 961–962. <https://doi.org/10.1038/206961a0>
103. Innes, E.A.; Bartley, P.M.; Maley, S.; Katzer, F.; Buxton, D. Veterinary vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, **2009**, 104, 246–251, doi: 10.1590/s0074-02762009000200018.
104. Jeffers, V.; Tampaki, Z.; Kim, K.; Sullivan, W.J. Jr. A latent ability to persist: differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol. Life Sci.*, **2018**, 75, 13, 2355-2373. doi: 10.1007/s00018-018-2808-x. Epub 2018 Mar 30.
105. Jiang, T.; Shwab, E.K.; Martin, R.M.; Gerhold, R.W.; Rosenthal, B.M.; Dubey, J.P.; Su, C. A partition of *Toxoplasma gondii* genotypes across spatial gradients and among host species, and decreased parasite diversity towards areas of human settlement in North

- America. *Int. J. Parasitol.*, **2018**, 48, 611-619, <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.01.008>.
106. Johnson, W.E.; Eizirik, E.; Pecon-Slattery, J.; Murphy, W.J.; Antunes, A.; Teeling, E.; O'Brien, S.J. The Late Miocene Radiation of Modern Felidae: A Genetic Assessment. *Science*, **2006**, 73-77.
107. Kasper, L.H.; Matsuura, T.; Fonseka, S.; Arruda, J.; Channon, J.Y.; Khan, I.A. Induction of gamma delta T cells during acute murine infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.*, 1996, 15, 157, 12, 5521-7.
108. Kato, K. How does *Toxoplasma gondii* invade host cells?. *J. Vet. Med. Sci.* **2018**, 80, 11, 1702-1706. doi:10.1292/jvms.18-0344
109. Keenihan, S.H.; Schettters, T.; Taverne, J. Toxoplasmosis in Brazil. *Trends Parasitol.*, **2002**, 18, 203-204.
110. Kennard, A.; Miller, M.A.; Khan, A.; Quinones, M.; Miller, N.; Sundar, N.; James, E.R.; Roos, D.R.; Conrad, P.A.; Grigg, M.E. Virulence shift in a sexual clade of Type X *Toxoplasma* infecting Southern Sea Otters. *bioRxiv*, 2021, 03, 31, 437793, doi: <https://doi.org/10.1101/2021.03.31.437793>.
111. Khan A.I.; Hwang, S.; Moretto, M. *Toxoplasma gondii*: CD8 T Cells Cry for CD4 Help. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **2019**, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00136>
112. Khan, A.; Taylor, S.; Ajioka, J.W.; Rosenthal, B.M.; Sibley, D.L. Selection at a Single Locus Leads to Widespread Expansion of *Toxoplasma gondii* Lineages That Are Virulent In Mice, *PLoS Genetics* **2009**, 5, e1000404, doi:10.1371/journal.pgen.1000404.
113. Khan, A.; Ajzenberg, D.; Mercier, A.; Demar, M.; Simon, S.; Darde, M.L.; Wang, Q.; Verma, S.K.; Rosenthal, B.M.; Dubey, J.P.; Sibley, L.D. Geographic separation of domestic and wild strains of *Toxoplasma gondii* in French Guiana correlates with a monomorphic version of chromosome 1a. *PLOS Negl. Trop Dis.*, **2014**, 8, 9, e3182
114. Khan, A.; Dubey, J.P.; Su, C.; Ajioka, J.W.; Rosenthal, B.M.; Sibley, L.D. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveals a fourth clonal lineage in North America. *Int. J. Parasitol.*, **2011**, 41, 6, 645-55, doi:10.1016/j.ijpara.2011.01.005.
115. Khan, A.; Fux, B.; Su, C.; Dubey, J.P.; Darde, M.L.; Ajioka, J.W.; Rosenthal, B.M.; Sibley, L.D. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, 104, 37, 14872-14877, DOI: 10.1073/pnas.0702356104.
116. Khan, A.; Taylor, S.; Su, C.; Mackey, A.J.; Boyle, J.; Cole, R.; Glover, D.; Tang, K.; Paulsen, I.T.; Berriman, M.; Boothroyd, J.C.; Pfeifferkorn, E.R.; Dubey, J.P.; Ajioka, J.W.; Roos, D.S.; Wootton, J.C.; Sibley, L.D. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, 9, 2980-92. doi: 10.1093/nar/gki604.
117. Khan, A.; Behnke, M.S.; Dunay, I.R.; White, M.W.; Sibley, L.D. Phenotypic and Gene Expression Changes among Clonal Type I Strains of *Toxoplasma gondii*. *Eukary. Cell*, **2009**, 8, 12, 1828-1836; DOI: 10.1128/EC.00150-09
118. Klun, I.; Djurković-Djaković, O.; Katić-Radivojević, S.; Nikolić, A. Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors. *Vet. Parasitol.*, **2006**, 135, 2, 121-31. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.08.010.
119. Klun, I.; Uzelac, A.; Villena, I.; Mercier, A.; Bobić, B.; Nikolić, A.; Rajnpreht, I.; Opsteegh, M.; Aubert, D.; Blaga, R.; et al. The first isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from horses in Serbia. *Parasit. Vectors*, **2017**, 10, 167, doi:10.1186/s13071-017-2104-x.
120. Komai, T.; Inoue, M.; Okamura, T.; Morita, K.; Iwasaki, Y.; Sumitomo, S.; Shoda, H.; Yamamoto, K.; Fujio, K. Transforming Growth Factor- $\beta$  and Interleukin-10 Synergistically Regulate Humoral Immunity via Modulating Metabolic Signals. *Front Immunol.*, **2018**, 14, 9, 1364. doi: 10.3389/fimmu.2018.01364

121. Konradt, C.; Ueno, N.; Christian, D.A.; DeLong J.H.; Harms Prichard, G.; Herz, J.; Bzik, D.J.; Koshy, A.A.; McGavern D.B.; Lodoen M.B.; Hunter, C.A. Endothelial cells are a replicative niche for entry of *Toxoplasma gondii* to the central nervous system. *Nat. Microbiol.*, **2016**, 1, 16001, <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.1>
122. Krishnamurthy, S.; Deng, B.; Del Rio, R.; Buchholz, K.R.; Treeck, M.; Urban, S.; Boothroyd, J.; Lam, Y.-W.; Ward, G.E. Not a Simple Tether: Binding of *Toxoplasma gondii* AMA1 to RON2 during Invasion Protects AMA1 from Rhomboid-Mediated Cleavage and Leads to Dephosphorylation of Its Cytosolic Tail. *mBio.*, **2016**, 7, 5, e00754-16. doi:10.1128/mBio.00754-16
123. Kuruca, Lj.; Uzelac, A.; Klun, I.; Lalošević, V.; Djurković-Djaković, O. *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic pigs in Serbia. *Acta Vet. Hung.*, **2019**, 67, 204-211, doi: 10.1556/004.2019.022.
124. Kuruca, L.; Klun, I.; Uzelac, A.; Nikolić, A.; Bobić, B.; Simin, S.; Lalošević, V.; Lalošević, D., Djurković-Djaković O. Detection of *Toxoplasma gondii* in naturally infected domestic pigs in Northern Serbia. *Parasitol. Res.*, **2017**, 116, 11, 3117-3123. doi: 10.1007/s00436-017-5623-7.
125. Lambert E.; Barragan, A. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. *Cell. Microbiol.*, **2010**, 12, 3, 292-300, <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01417.x>
126. Lanszki, J.; Szabo, L.; Heltai, M. Feeding habits and trophic niche overlap between sympatric golden jackal (*Canis aureus*) and red fox (*Vulpes vulpes*) in the Pannonian ecoregion (Hungary). *Can. J. Zool.*, **2006**, 84, 1647-1656, <https://doi.org/10.1139/Z06-147>.
127. Laskin, D.L.; Sunil, V.R.; Gardner, C.R.; Laskin, J.D. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction?. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, **2011**, 51, 267-288. doi:10.1146/annurev.pharmtox.010909.105812
128. Lass, A.; Pietkiewicz, H.; Szostakowska, B.; Myjak, P. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **2012**, 311, 101-1108, doi: 10.1007/s10096-011-1414-8.
129. Lawrence, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2009**, 1, 6, a001651. doi:10.1101/cshperspect.a001651
130. Lee, S.H.; Chu, K.B.; Quan, F.S. Parasite Infiltration and Apoptosis in Spleen upon *Toxoplasma gondii* Infection. *Korean J. Parasitol.*, **2019**, 57, 5, 537-541. doi:10.3347/kjp.2019.57.5.537
131. Lehmann, T.; Marcet, P.L.; Graham, D.H.; Dahl, E.R.; Dubey, J.P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, 103, 11423-11428.
132. Lélou, M.; Villena, I.; Dardé, M.L.; Aubert, D.; Geers, R.; Dupuis, E.; Marnef, F.; Pouille, M.L.; Gotteland, C.; Dumètre, A.; et al. Quantitative estimation of the viability of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2012**, 78, 5127-5132, doi:10.1128/AEM.00246-12.
133. Leng, J.; Butcher, B.A.; Denkers, E.Y. Dysregulation of macrophage signal transduction by *Toxoplasma gondii*: Past progress and recent advances. *Parasit. Immunol.*, **2009**, 31, 717-728.
134. Levaditi C.; Schoen, R.; Sanchis Bayarri, V. L'encéphalomyélite toxoplasmique chronique du lapin et de la souris. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, **1928**, 99, 37-40.
135. Lima, T.S.; Lodoen, M.B. Mechanisms of Human Innate Immune Evasion by *Toxoplasma gondii*. *Front Cell Infect Microbiol.*, **2019**, 16, 9, 103. doi: 10.3389/fcimb.2019.00103
136. Lindsay, D.S.; Dubey, J.P.; Blagburn, B.L.; Toivio-Kinnucan, M.A. Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites, and sporozoites. *J. Parasitol.*, **1991**, 77, 126-132.

137. Lunde, M.N.; Jacobs, L. Antigenic differences between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol.*, **1983**, 69, 5, 806-8.
138. Lüder, C.G.K.; Rahman, T. Impact of the host on *Toxoplasma* stage differentiation. *Microb. Cell*, **2017**, 4, 7, 203 – 211, doi: 10.15698/mic2017.07.579
139. Lorenzi, H.; Khan, A.; Behnke, M.; Namasivayan, S.; Swapna, S.L.; Hadjithomas, M.; Karamycheva, S. *et al.* Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. *Nat. Commun.*, **2016**, 7, 10147, <https://doi.org/10.1038/ncomms10147>
140. Marković, M.; Ivović, V.; Štajner, T.; Djokić, V.; Klun, I.; Bobić, B.; Nikolić, A.; Djurković-Djaković, O. Evidence for genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in selected intermediate hosts in Serbia. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, **2014**, 37, 173–179, doi:10.1016/j.cimid.2014.03.001.
141. Martorelli Di Genova, B.; Wilson, S.K.; Dubey, J.P.; Knoll, L.J. Intestinal delta-6-desaturase activity determines host range for *Toxoplasma* sexual reproduction. *PLoS Biol.*, **2019**, 17, 8, e3000364. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000364>
142. Mendez, O.A.; Koshy, A.A. *Toxoplasma gondii*: Entry, association, and physiological influence on the central nervous system. *PLoS Pathog.*, **2017**, 13, 7, e1006351. doi: 10.1371/journal.ppat.1006351.
143. Mercier, A.; Ajzenberg, D.; Devillard, S.; Demar, M.P.; de Thoisy, B.; Bonnabau, H.; Collinet, F.; Boukhari, R.; Blanchet, D.; Simon, S.; Carne, B.; Dardé, M.L. Human impact on genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: example of the anthropized environment from French Guiana. *Infect. Genet. Evol.*, **2011**, 11, 1378–1387, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.05.003>.
144. Mercier, A.; Devillard, S.; Ngoubangoye, B.; Bonnabau, H.; Bañuls, A.-L.; Durand, P.; Salle, B.; Ajzenberg, D.; Dardé, M.L. Additional Haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: Population Structure and Mouse-Virulence of Strains from Gabon. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2010**, 4, e876, doi:10.1371/journal.pntd.0000876.
145. Merritt, E.F.; Johnson, H.J.; Wong, Z.S.; Buntzman, A.S.; Conklin, A.C.; Cabral, C.M.; Romanoski, C.E.; Boyle, J.P.; Koshy, A.A. Transcriptional profiling reveals T cells cluster around neurons injected with *Toxoplasma gondii* proteins. *bioRxiv*, **2020**, 143099, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.09.143099>.
146. Mévélec, M.N.; Lakhri, Z.; Dimier-Poisson, I. Key Limitations and New Insights Into the *Toxoplasma gondii* Parasite Stage Switching for Future Vaccine Development in Human, Livestock, and Cats. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **2020**, 10, 697, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.607198>.
147. Montoya, G.; Liesenfeld, O. Toxoplasmosis. *Lancet*, **2004**, 363, 9425, 1965-1976, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X).
148. Morisaki, J.H.; Heuser, J.E.; Sibley, L.D. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J. Cell Sci.*, **1995**, 108, 6, 2457-64. Namroodi, S.; Yousefi, M.R.; Milanloo, D. *Toxoplasma gondii* serosurvey in golden jackals from Golestan province. Iran, *Int. J. Mol. Cell. Med.*, **2014**, 2, 446-450.
149. Nayeri, T.; Sarvi, S.; Daryani, A. *Toxoplasma gondii* in mollusks and cold-blooded animals: A systematic review. *Parasitol.*, **2021**, 11, 1-33. doi: 10.1017/S0031182021000433.
150. Newsome, T.; Greenville, A.; Ćirović, D.; Dickman, C.R.; Johnson C.N.; Krofel, M.; Letnic, M.; Ripple, W.L.; Ritchie E.G.; Stoyanov, S.; Wirsing, A.J. Top predators constrain mesopredator distributions. *Nat. Commun.*, **2017**, 8, 15469. <https://doi.org/10.1038/ncomms15469>.
151. Neyer, L.E.; Grunig, G.; Fort, M.; Remington, J.S.; Rennick, D.; Hunter, C.A. Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.*, **1997**, 65, 5, 1675-82. doi: 10.1128/IAI.65.5.1675-1682.1997.



152. Nicolle, C.; Manceaux, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Seances Acad Sci.*, **1908**, 147, 763–766.
153. Paige, B.H.; Cowen, D.; Wolf, A. Toxoplasmic encephalomyelitis. V Further observations of infantile toxoplasmosis; intrauterine inception of the disease; visceral manifestations. *Am J Dis Child.*, **1942**, 63, 474–514.
154. Paredes-Santos, T.; Wang, Y.; Waldman, B.; Lourido, S.; Saeij, J.P. The GRA17 Parasitophorous Vacuole Membrane Permeability Pore Contributes to Bradyzoite Viability. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2019**, 9, 321. doi:10.3389/fcimb.2019.00321
155. Pena, H.F.; Gennari, S.M.; Dubey, J.P.; Su, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int. J. Parasitol.*, **2008**, 38, 5, 561-9. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.09.004.
156. Penezić, A. Ishrana šakala (*Canis aureus* L. 1758) na području Srbije [doktorska disertacija]. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, 2016.
157. Peterson, R.O.; Ciucci, P. The wolf as a carnivore. Mech, L.D.; Boitani, L. eds. *Wolves: behavior, ecology, and conservation*, **2003**, Chicago: University of Chicago Press
158. Pereira, A.V.; Gois, M.B.; Silva, M.S.; de Miranda Jr, N.R.; Ferraz Campos, C.B.H.; Schneider, L.C.L; Barbosa, C.M.; Nogueira-Melo, G.A.; Sant'Ana, D.M.G. *Toxoplasma gondii* causes lipofuscinosis, collagenopathy and spleen and white pulp atrophy during the acute phase of infection. *Path. Dis.*, **2019**, 77, 9, ftaa008, <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa008>
159. Peyron, F.; Lobry, J.R.; Musset, K.; Ferrandiz, J.; Gomez-Marin, J.E.; Petersen, E.; Meroni, V.; Rausher, B.; Mercier, C.; Picot, S.; Cesbron-Delauw, M.-F. Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: Predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America). *Microbes Infect.*, **2006**, 8, 2333–2340, doi:10.1016/j.micinf.2006.03.023.
160. Pfaffl, M.W. Quantification Strategies in real-time PCR. In *A-Z of Quantitative PCR*, 1<sup>st</sup> ed.; Bustin, S.A., Eds.; International University Line: La Jolla, CA, USA, **2004**, 87–112.
161. Pfefferkorn, E. R.; Pfefferkorn, L.C. *Toxoplasma gondii*: isolation and preliminary characterization of temperature sensitive mutants. *Exp. Parasitol.*, **1976**, 39, 365-376
162. Pfefferkorn, E.R.; Guyre, P.M. Inhibition of growth of *Toxoplasma gondii* in cultured fibroblasts by human recombinant gamma interferon. *Infect. Immun.*, **1984**, 44, 2, 211-6. doi: 10.1128/iai.44.2.211-216.1984
163. Rahman, M.; Devriendt, B.; Jennes, M.; Gisbert, A.I.; Dorny, P.; Dierick, K.; De Craeye, S.; Cox, E. Early Kinetics of Intestinal Infection and Immune Responses to Two *Toxoplasma gondii* Strains in Pigs. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **2020**, 10, 161. DOI=10.3389/fcimb.2020.00161
164. Ranc, N.; Krofel, M.; Ćirović, D. *Canis aureus* (errata version published in **2019**). The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T118264161A144166860, <https://www.iucnredlist.org/species/118264161/144166860#assessment-information>; accessed 04 June 2019.
165. Rego, W.M.F.; Costa, J.G.L.; Baraviera, R.C.A.; Pinto, L.V.; Bessa, G.L.; Lopes, R.E.N.; Vitor, R.W.A. Association of ROP18 and ROP5 was efficient as a marker of virulence in atypical isolates of *Toxoplasma gondii* obtained from pigs and goats in Piauí, Brazil. *Vet. Parasitol.*, **2017**, 247:19–25.4
166. Robben, P.M.; Mordue, D.G.; Truscott, S.M.; Takeda, K.; Akira, S.; Sibley, L.D. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. *J. Immunol.*, **2004**, 15, 172, 6, 3686-94. doi: 10.4049/jimmunol.172.6.3686.
167. Robert-Gangneux, F.; Meroni, V.; Dupont, D.; Botterel, F.; Garcia, J.M.A.; Brenier-Pinchart, M.P.; Accoceberry, I.; Akan, H.; Abbate, I.; Boggian, K.; et al. Toxoplasmosis in Transplant Recipients, Europe, 2010–2014. *Emerg Infect Dis.*, **2018**, 24, 1497–1504, doi:10.3201/eid2408.180045.

168. Rosowski, E.E., Lu, D.; Julien, L.; Rodda, L.; Gaiser R.A.; Jensen, K.D.C.; Saeij, J.P. Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. *J. Exp. Med.*, **2011**, 208, 1, 195-212
169. Röszer, T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.*, **2015**, 2015, 816460. doi: 10.1155/2015/816460.
170. Sa, Q.; Ochiai, E.; Tiwari, A.; Mullins, J.; Shastri, N.; Mercier, C.; Cesbron-Delauw, M.F.; Suzuki, Y. Determination of a Key Antigen for Immunological Intervention To Target the Latent Stage of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.*, **2017**, 198, 11, 4425-4434. doi: 10.4049/jimmunol.1700062.
171. Saeij, J.P.; Boyle, J.P.; Collier, S.; Taylor, S.; Sibley, L.D.; Brooke-Powell, E.T.; Ajioka, J.W.; Boothroyd, J.C. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science*, **2006**, 314, 5806, 1780-3. doi: 10.1126/science.1133690.
172. Saeij, J.P.J.; Boyle, J.P.; Boothroyd, J.C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol.*, **2005**, 21, 476–481, doi:10.1016/j.pt.2005.08.001.
173. Saeij, J.P.; Frickel, E.-M. Exposing *Toxoplasma gondii* hiding inside the vacuole: a role for GBPs, autophagy and host cell death. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2017**, 40, 72-80, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.021>
174. Sakamoto, C.A.M.; da Costa, A.J.; Gennari, S.M.; Pena, H.F.J.; Toniollo, G.H.; Lopes, W.D.Z.; Bichuette, M.A.; Betini, C.M.; Amarante, A.F.T.; Bresciani, K.D.S. Experimental infection of pregnant queens with two major Brazilian clonal lineages. *Parasitol. Res.*, **2009**, 105, 5, 1311-6. doi: 10.1007/s00436-009-1558-y.
175. Salvioni, A.; Belloy, M.; Lebourg, A.; Bassot, E.; Cantaloube-Ferrieu, V.; Vasseur, V.; Blanié, S.; Liblau, R.S.; Suberbielle, E.; Robey, E.A.; Blanchard, N. Robust Control of a Brain-Persisting Parasite through MHC I Presentation by Infected Neurons. *Cell Rep.*, **2019**, 27, 11, 3254-3268.e8. doi: 10.1016/j.celrep.2019.05.051.
176. Sanecka, A.; Yoshida, N.; Kolawole, E.M.; Patel, H.; Evavold, B.D.; Frickel, E.M. T Cell Receptor-Major Histocompatibility Complex Interaction Strength Defines Trafficking and CD103+ Memory Status of CD8 T Cells in the Brain. *Front Immunol.*, **2018**, 9, 1290. doi: 10.3389/fimmu.2018.01290.
177. Saraf, P.; Shwab, E.K.; Dubey, J.P.; Su, C. On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. *Exp. Parasitol.*, **2017**, 174, 25–30, doi:10.1016/j.exppara.2017.01.009.
178. Sasai, M.; Yamamoto, M. Innate, adaptive and cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Exp. & Mol. Med.*, **2019**, 51, 1-10, <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0353-9>
179. Scharton-Kersten, T.; Nakajima, H.; Yap, G.; Sher, A.; Leonard, W.J. Infection of mice lacking the common cytokine receptor gamma-chain (gamma(c)) reveals an unexpected role for CD4+ T lymphocytes in early IFN-gamma-dependent resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.*, 1998, 15, 160, 6, 2565-9.
180. Scholtzseck, E. Die Deutung von Endodyogenie und Schizogonie bei Coccidien und anderen Sporozoen. *Z. Parasitenk.*, **1973**, 42, 87–104, <https://doi.org/10.1007/BF00329787>
181. Schumacher, A.C.; Elbadawi, L.I.; DeSalvo, T.; Straily, A.; Ajzenberg, D.; Letzer, D.; Moldenhauer, E.; Handly, T.L.; Hill, D.; Dardé, M.L.; Pomares, C.; Passebosc-Faure, K.; Bisgard, K.; Gomez, C.A.; Press, C.; Smiley, S.; Montoya, J.G.; Kazmierczak, J.J. Toxoplasmosis Outbreak Associated With *Toxoplasma gondii*-Contaminated Venison-High Attack Rate, Unusual Clinical Presentation, and Atypical Genotype. *Clin. Infect. Dis.*, **2020**, 15, c1aa285, doi: 10.1093/cid/c1aa285.
182. Selleck, E.M.; Fentress, S.J.; Beatty, W.L.; Degrandi, D.; Pfeffer, K.; Virgin, H.W.<sup>4th</sup>; Macmicking, J.D.; Sibley, L.D. Guanylate-binding protein 1 (Gbp1) contributes to cell-

- autonomous immunity against *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.*, **2013**, 9, 4, e1003320. doi: 10.1371/journal.ppat.1003320.
183. Sgroi, G.; Viscardi, M.; Santoro, M.; et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* in wild boar (*Sus scrofa*) in southern Italy: Epidemiological survey and associated risk for consumers. *Zoonoses Public Health.*, **2020**, 67, 805–813. <https://doi.org/10.1111/zph.12762>
184. Shapira, S.; Harb, O.S.; Caamano, J.; Hunter, C.A. The NF- $\kappa$ B signaling pathway: immune evasion and immunoregulation during toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.*, **2004**, 34, 3, 393–400, <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.005>
185. Shortman, K.; Heath, W.R. The CD8<sup>+</sup> dendritic cell subset. *Immunol. Rev.*, **2010**, 234, 1, 18–31. doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00870.x.
186. Shwab, E.; Zhu, X.; Majumdar, D.; Pena, H.; Gennari, S.; Dubey, J.; Su, C. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitol.*, **2014**, 141, 453–461, doi:<https://doi.org/10.1017/S0031182013001844>.
187. Shwab, E.K.; Jiang, T.; Pena, H.F.; Gennari, S.M.; Dubey, J.P.; Su, C. The ROP18 and ROP5 gene allele types are highly predictive of virulence in mice across globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.*, **2016**, 46, 141–146, doi:10.1016/j.ijpara.2015.10.005.
188. Shwab, E.K.; Saraf, P.; Zhu, X.Q.; Zhou, D.-H.; McFerrin, B.M.; Ajzenberg, D.; Shares, G.; Hammond-Aryee, K.; et al. Human impact on the diversity and virulence of the ubiquitous zoonotic parasite *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2018**, 115, E6956–E6963, <https://doi.org/10.1073/pnas.1722202115>.
189. Simon, S.; de Thoisy, B.; Mercier, A.; Nacher, M.; Demar, M. Virulence of atypical *Toxoplasma gondii* strains isolated in French Guiana in a murine model. *Parasite*, **2019**, 26, 60, doi:10.1051/parasite/2019048.
190. Sibley, L.D.; Boothroyd, J.C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*, **1992**, 359, 6390, 82–5. doi: 10.1038/359082a0.
191. Sibley, L.D.; Qiu, W.; Fentress, S.; Taylor, S.J.; Khan, A.; Hui, R. Forward genetics in *Toxoplasma gondii* reveals a family of rhostry kinases that mediates pathogenesis. *Eukaryot. Cell.*, **2009**, 8, 8, 1085–93. doi: 10.1128/EC.00107-09.
192. Silva, L.A.; Andrade, R.O.; Carneiro, A.C.; Vitor, R.W. Overlapping *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic animals and humans in Southeastern Brazil. *PLoS One*, **2014**, 27, 9, 2, e90237. doi: 10.1371/journal.pone.0090237.
193. Sinai, A.P.; Webster, P.; Joiner, K.A. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J Cell Sci.*, **1997**, 110, 2117–28.
194. Skariah, S.; McIntyre, M.K.; Mordue, D.G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitol. Res.*, **2010**, 107, 2, 253–260. doi:10.1007/s00436-010-1899-6
195. Smith, J.E. A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.*, **1995**, 25, 11, 1301–9. doi: 10.1016/0020-7519(95)00067-c.
196. Splendore, A. Un nuovo parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. *Nota preliminare pel, Rev Soc Sci Sao Paulo*, **1908**, 3, 109–112.
197. Su, C.; Howe, D.K.; Dubey, J.P.; Ajioka, J.W.; Sibley, L.D. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99, 10753–10758, doi:10.1073/pnas.172117099.
198. Su, C.; Khan, A.; Zhou, P.; Majumdar, D.; Ajzenberg, D.; Dardé, M.L.; Zhu, X.Q.; Ajioka, J.W.; Rosenthal, B.M.; Dubey, J.P.; Sibley, L.D. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct

- ancestral lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, 109, 5844-5849, doi: 10.1073/pnas.1203190109.
199. Su, C.; Shwab, E.K.; Zhou, P.; Zhu, X.Q.; Dubey, J.P. Moving towards and integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* **2010**, *137*, 1–11, doi:10.1017/S0031182009991065.
200. Su, C.; Evans, D.; Cole, R.; Kissinger, J.C.; Ajioka, J.W.; Sibley, L.D. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science*, **2003**, 299, 414-416.
201. Subauste, C.S.; Chung, J.Y.; Do, D.; Koniaris, A.H.; Hunter, C.A.; Montoya, J.G.; Porcelli, S.; Remington, J.S. Preferential activation and expansion of human peripheral blood gamma delta T cells in response to *Toxoplasma gondii* in vitro and their cytokine production and cytotoxic activity against *T. gondii*-infected cells. *J Clin Invest.*, 1995, 96, 1, 610-9. doi: 10.1172/JCI118076.
202. Sullivan, W.J. Jr.; Jeffers, V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol. Rev.*, **2012**, *36*, 717–733, doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00305.x.
203. Szabo, S.; Kim, S.T.; Costa, G.L.; Zhang, X.; Fathman, C.G.; Glimcher, L.H. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, **2000**, 100, 655–669.
204. Štajner, T.; Vasiljević, Z.; Vujić, D.; Marković, M.; Ristić, G.; Mičić, D.; Pašić, S.; Ivoić, V.; Ajzenberg, D.; Djurković-Djaković, O. Atypical strain of *Toxoplasma gondii* causing fatal reactivation after hematopoietic stem cell transplantation in a patient with an underlying immunological deficiency. *J Clin Microbiol.*, **2013**, *51*, 2686–2690, doi:10.1128/JCM.01077-13.
205. Takemae, H.; Sugi, T.; Kobayashi, K.; Gong, H.; Ishiwa, A.; Recuenco, F.C.; Murakoshi, F.; Iwanaga, T.; Inomata, A.; Horimoto, T.; Akashi, H.; Kato, K. Characterization of the interaction between *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein 4 and host cellular  $\beta$ -tubulin. *Sci. Rep.* **2013**, *12*, 3, 3199. doi: 10.1038/srep03199.
206. Teodorović, V.; Vasilev, D.; Ćirović, D.; Marković, M.; Ćosić, N.; Djurić, S.; Djurković-Djaković, O. The Wolf (*Canis lupus*) as an Indicator Species for the Sylvatic *Trichinella* Cycle in the Central Balkans. *J. Wildlife Dis.*, **2014**, *50*, 911-915, <https://doi.org/10.7589/2013-12-333>.
207. Tibayrenc, M.; Ayala, F. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol.*, **2002**, *18*, 405.
208. Tiwari, A.; Hannah, R.; Lutshumba, J.; Ochiai, E.; Weiss, L.M.; Suzuki, Y. Penetration of CD8+ Cytotoxic T Cells into Large Target, Tissue Cysts of *Toxoplasma gondii*, Leads to Its Elimination. *Am. J. Pathol.*, **2019**, *189*, 8, 1594-1607. doi: 10.1016/j.ajpath.2019.04.018.
209. Tonkin, M.L.; Boulanger, M.J. The shear stress of host cell invasion: exploring the role of biomolecular complexes. *PLoS Pathog.*, **2015**, *11*, e1004539, doi:10.1371/journal.ppat.1004539.
210. Trouwborst, A.; Krofel, M.; Linnell, J.D.C. Legal implications of range expansions in a terrestrial carnivore: the case of the golden jackal (*Canis aureus*) in Europe. *Biodivers. Conserv.*, **2015**, *24*, 2593-2610, doi:10.1007/s10531-015-0948-y.
211. Tsitsiklis, A.; Bangs, D.J.; Robey, E.A. CD8+ T Cell Responses to *Toxoplasma gondii*: Lessons from a Successful Parasite. *Trends Parasitol.*, **2019**, *35*, 11, 887-898. doi: 10.1016/j.pt.2019.08.005.
212. Turčeková, E.; Hurníková, Z.; Spišák, F.; Miterpáková, M.; Chovancová, B. *Toxoplasma gondii* in protected wildlife in the Tatra National Park (TANAP), Slovakia. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2014**, *21*, 2, 235-8. doi: 10.5604/1232-1966.1108582.
213. Uzelac, A.; Klun, I.; Ćirović, D.; Penezić, A.; Ćirković, V.; Djurković-Djaković, O. Detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in wild canids in Serbia. *Parasitol. Int.*, **2019**, *73*, 101973, doi:10.1016/j.parint.2019.101973.
214. Uzelac, A.; Klun, I.; Štajner, T.; Mercier, A.; Kuruca, Lj.; Bobić, B.; Marković, M.; Djurković-Djaković, O. Population structure of *Toxoplasma gondii* in Serbia. In

- Proceedings of the 14<sup>th</sup> International Congress of Parasitology—ICOPA 2018, Daegu, Korea, 19–24 August 2018; pp. 3204–3206.
215. van der Giessen, J.W.; Deksne, G.; Gómez-Morales, M.A.; Troell, K.; Gomes, J.; Sotiraki, S.; Rozycki, M.; Kucsera, I.; Djurković-Djaković, O.; Robertson, L.J. Surveillance of foodborne parasitic diseases in Europe in a One Health approach. *Par. Epidemiol. Contr.* **2021**, *163*, e00205, <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2021.e00205>.
216. Vilares, A.; Gargaté, M.J.; Ferreira, I.; Martins, S.; Gomes, J.P. Molecular and virulence characterization of *Toxoplasma gondii* strains isolated from humans in Portugal. *Parasitol Res.*, **2017**, *116*, 979–985, doi:10.1007/s00436-017-5374-5.
217. Vilares, A.; Gargate, M.J.; Ferreira, I.; Martins, S.; Julio, C.; Waap, H.; Angelo, H.; Gomes, J.P. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from pigeons and stray cats in Lisbon, Portugal. *Vet. Parasitol.*, **2014**, *205*, 506-511, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.08.006>.
218. Vujančić, M.; Ivović, V.; Kataranovski, M.; Nikolić, A.; Bobić, B.; Klun, I.; Villena, I.; Kataranovski, D.; Djurković-Djaković, O. Toxoplasmosis in naturally infected rodents in Belgrade, Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **2011**, *11*, 1209-1211. doi: 10.1089/vbz.2010.0119
219. Wagner, C.; Holzapfel, M.; Kluth, G.; Reinhardt, I.; Ansorge, H. Wolf (*Canis lupus*) feeding habits during the first eight years of its occurrence in Germany. *Mamm. Biol.*, **2012**, *77*, 3, 196-203
220. Wei, X.Y.; Gao, Y.; Lv, C.; Wang, W.; Chen, Y.; Zhao, Q.; Gong, Q.L.; Zhang, X.X. The global prevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* among foxes: A systematic review and meta-analysis. *Microb. Pathog.*, **2021**, *150*, 104699. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104699.
221. Wolf, A.; Cowen, D. Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man. *Bull. Neur. Inst. NY.*, **1937**, *6*, 306–371.
222. Wolf, A.; Cowen, D.; Paige, B.H. Toxoplasmic encephalomyelitis: IV. Experimental transmission of the infection to animals from a human infant. *J. Exp. Med.* **1940**, *7*, 2, 187-214. doi:10.1084/jem.71.2.187d
223. Yang, N.; Farrell, A.; Nieldman, W.; Melo, M.; Lu, D.; Julien, L.; Marth, G.T.; Gubbels, M.J.; Saeij, J.P. Genetic basis for phenotypic differences between different *Toxoplasma gondii* type I strains. *BMC Genomics*, **2013**, *10*, 14, 467. doi: 10.1186/1471-2164-14-467.
224. Yarovinsky, F.; Sher, A. Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, **2006**, *36*, 3, 255-9. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.12.003. Epub 2006 Jan 13.
225. Zhang Y.H.; He, M.; Wang, Y.; Liao, A.H. Modulators of the Balance between M1 and M2 Macrophages during Pregnancy. *Front. Immunol.*, **2017**, *8*, 120. doi:10.3389/fimmu.2017.00120
226. Zhao, Y.; Yap, G.S. Toxoplasma's Arms Race with the Host Interferon Response: A menage a trois of ROPs. *Cell Host Microbe*, **2014**, *15*, 5, 517-518. doi:10.1016/j.chom.2014.05.002.
227. Zhao, Y.; Marple, A.H.; Ferguson, D.J.; Bzik, D.J.; Yap, G.S. Avirulent strains of *Toxoplasma gondii* infect macrophages by active invasion from the phagosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **2014**, *111*, 17, 6437-6442. doi:10.1073/pnas.13168

## Spisak skraćenica

AIDS	engl. <b>A</b> cquired <b>I</b> mmuno <b>D</b> eficiency <b>S</b> yndrome
AMA 1	engl. <b>A</b> pical <b>M</b> embrane <b>A</b> ntigen <b>1</b>
ANOVA	engl. <b>A</b> nalysis <b>O</b> f <b>V</b> ariance
APĆ	Antigen <b>P</b> rezentujuće <b>Ć</b> elije
pAPĆ	profesionalne Antigen <b>P</b> rezentujuće <b>Ć</b> elije
ARG1	engl. <b>A</b> RGinase <b>1</b>
BAG1	engl. <b>B</b> radyzoite specific <b>A</b> nti <b>G</b> en <b>1</b>
Blimp-1	engl. <b>B</b> lymphocyte- induced <b>m</b> aturation <b>p</b> rotein-1
CCR5	engl. <b>C</b> - <b>C</b> Chemokine <b>R</b> eceptor <b>5</b>
CD	engl. <b>C</b> luster of <b>D</b> ifferentiation
CS3	engl. <b>C</b> ircumSporozoite protein <b>3</b>
CST1	engl. <b>Cy</b> ST wall glycoprotein <b>1</b>
DĆ	Dendritska <b>Ć</b> elija
DMEM	engl. <b>D</b> ulbecco's <b>M</b> odified <b>E</b> agles <b>M</b> edium
DPBS	engl. <b>D</b> ulbecco's <b>P</b> hosphate <b>B</b> uffered <b>S</b> aline
DT	engl. <b>D</b> ye <b>T</b> est
EBI3	engl. Epstein- <b>B</b> arr virus <b>I</b> nduced gene <b>3</b>
EDTA Ly6C	engl. <b>L</b> ymphocyte antigen <b>6</b> complex, locus <b>C1</b>
ENO2	engl. <b>E</b> NOlase <b>2</b>
FAO	engl. <b>F</b> ood and <b>A</b> griculture <b>O</b> rganization
FoxP3	engl. <b>F</b> orkhead <b>box</b> <b>P3</b>
GBP	engl. <b>G</b> uanylate <b>B</b> inding <b>P</b> rotein
gDNK	genomska <b>D</b> ezoksiribo <b>N</b> ukleinska <b>K</b> iselina
GRA	engl. Dense <b>G</b> RAnule protein
HIV	engl. <b>H</b> uman <b>I</b> mmunodeficiency <b>V</b> irus
HFF	engl. <b>H</b> uman <b>F</b> oreskin <b>F</b> ibroblast
HG	engl. <b>H</b> aplo <b>G</b> roup
IDO	Indolamin <b>D</b> i <b>O</b> ksigenaza
Ig	Imunoglobulin
IGRA	engl. <b>I</b> nterferon <b>G</b> amma <b>R</b> elease <b>A</b> ssay
IFN-γ	engl. <b>I</b> nter <b>F</b> ero <b>N</b> gamma

IL	engl. <b>InterLeukin</b>
IRG	engl. <b>Immunity Related GTP-ase</b>
IRGM	engl. <b>Immunity Related GTP-ase M</b>
IRGC	engl. <b>Immunity Related GTP-ase C</b>
iRNK	informaciona <b>RiboNukleinska Kiselina</b>
LCAT	engl. <b>Lecithin-Cholesterol AcetylTransferase</b>
LD	engl. <b>Lethal Dose</b>
LČ	<b>Limfni Čvor</b>
LPS	<b>LipoPoliSaharid</b>
M1	<b>Makrofag 1 (Klasični)</b>
M2	<b>Makrofag 2 (Alternativni)</b>
M <sub>reg</sub>	<b>Makrofag regulatorni</b>
MAT	engl. <b>Modified Agglutination Test</b>
MCP-1	engl. <b>Monocyte Chemoattractant Protein 1</b>
MF	<b>MakroFag</b>
MHC-I	engl. <b>Major Histocompatibility Complex I</b>
MHC-II	engl. <b>Major Histocompatibility Complex II</b>
MIC	engl. <b>MICronemal proteins</b>
MnPCR-RFLP	engl. <b>Multiplex Nested Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism</b>
MOI	engl. <b>Multiplicity Of Infection</b>
MS	engl. <b>MicroSatellite</b>
MyD88	engl. <b>Myeloid Differentiation primary response protein 88</b>
NFκ-B	engl. <b>Nuclear Factor kappa B</b>
NK	engl. <b>Natural Killer</b>
NOS2	engl. <b>Nitric-Oxide Synthase 2</b>
PD1	engl. <b>Programmed Death</b>
PFA	<b>ParaFormAldehyd</b>
PLP1	engl. <b>Perforin-Like Protein 1</b>
QTL	engl. <b>Quantitative Trait Locus</b>
RON	engl. <b>RhOptry Neck proteins</b>
ROP	engl. <b>RhOptry Protein</b>

---

ROP18-UPS	engl. <b>RhOp</b> try kinase <b>18-UP</b> stream Sequence
SAG1	engl. Major Surface <b>AntiGen 1</b>
SEM	engl. <b>Standard Error of the Mean</b>
SFT	engl. <b>Sabin-Feldman Test</b>
SNP	engl. Single Nucleotide <b>P</b> olymorphism
STAg	engl. <b>Soluble <i>Toxoplasma gondii</i> Antigen</b>
STAT	engl. <b>Signal Transducer and Activator of Transcription</b>
T-bet	engl. <b>T-box</b> protein expressed in <b>T</b> cells
TE	engl. <b>Toxoplasmatic Encephalitis</b>
TF	Transkripcioni <b>F</b> aktor
TGF- $\beta$	engl. <b>Transforming Growth Factor beta</b>
TgPRF	engl. <b>Toxoplasma gondii PRoFilin</b>
Th-1	engl. <b>T-Helper</b> Lymphocyte type <b>1</b>
TLR	engl. <b>Toll Like Receptor</b>
TNF	engl. <b>Tumor Necrosis Factor</b>
ToxoDB	engl. <b><i>Toxoplasma gondii</i> DataBase</b>
VERO	espe. <b>VERda RenO</b>
VIR	engl. <b>VIR</b> ulence
WHO	engl. <b>World Health Organization</b>



## Biografija

Aleksandra Uzelac rođena je 24.05.1978. godine u Beogradu. Završila je Američku internacionalnu školu (AISC) na Kipru, program *International Baccalaureate* (IB), a zatim je upisala osnovne studije na Univerzitetu Rutgers u SAD, smer Genetika. Diplomirala je 2001. godine, pa upisala Master program iz Mikrobiologije i Molekularne Genetike na istom Univerzitetu, koji je završila 2004. Iste godine je objavljen i rad u časopisu *Journal of Biological Chemistry* u kojem su prikazani delimični rezultati istraživanja u okviru Master teze. Od 2005. do 2011. bila je zaposlena u istraživačkom centru *Center for Emerging and Re-emerging Pathogens* u okviru medicinskog fakulteta, učestvovala u nekoliko projekata i bila koautor tri naučna rada. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija upisala je 2014. godine kada se zaposlila kao istraživač pripravnik u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za toksoplazmozu na Institutu za medicinska istraživanja. Od 2014. godine do 2021, bila je angažovana na projektu III 41019 MNTRS, pod nazivom: "Kontrola infekcija apikopleksnim patogenima: od novih mesta delovanja leka do predikcije" i učestvovala je u COST akciji FA1408 koja se bavila parazitima prenošenim hranom i vodom i u okviru koje je bila dobitnica stipendije za studijski boravak u Holandiji, kao i stipendije za putovanje na svetski kongres parazitologa (ICOPA) u Južnoj Koreji. Do sada je bila prvi autor na 2, a koautor na 15 naučnih radova u časopisima međunarodnog značaja i učestvovala na nekoliko nacionalnih i međunarodnih skupova. Član je društva parazitologa Srbije i dobitnica godišnje nagrade za 2020. godinu za naučni rad „In vivo and in vitro virulence analysis of four genetically distinct *Toxoplasma gondii* lineage III isolates“.

*Прилог 1***Изјава о ауторству**

Име и презиме аутора Александра Узелац

Број индекса М3016/2014

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

**Биолошка и молекуларна карактеризација сојева лозе III *Toxoplasma gondii* изолованих у Србији**

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

**Потпис аутора**

У Београду, 04.10.2021

---

Прилог

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Александра Узелац**

Број индекса **M3016/2014**

Студијски програм **Молекуларна Биологија**

Наслов рада **Биолошка и молекуларна карактеризација сојева лозе III *Toxoplasma gondii* изолованих у Србији**

Ментор др. Олгица Ђурковић-Ђаковић и др. Душанка Савић-Павићевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, 04.10.2021

## Прилог 3

**Изјава о коришћењу**

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

**Биолошка и молекуларна карактеризација сојева лозе III *Toxoplasma gondii* изолованих у Србији**

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 04.10.2021

**Потпис аутора**

---

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.