

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY



mgr inż. Anna Lass

rozprawa doktorska

WYSTĘPOWANIE OOCYST

TOXOPLASMA GONDII

W ŚRODOWISKU

Promotor: prof. dr hab. n. med. Przemysław Myjak

Praca wykonana w Zakładzie Parazytologii Tropikalnej
Międzywydziałowego Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej GUMed.

Gdańsk 2010

SPIS TREŚCI:

1. Streszczenie	1
2. Wstęp	4
2.1 Rys historyczny i taksonomia.....	4
2.2 Formy rozwojowe <i>T. gondii</i>	5
2.3 Budowa komórki <i>T. gondii</i>	6
2.4 Cykl życiowy <i>T. gondii</i>	9
2.4.1 Cykl życiowy <i>T. gondii</i> u żywiciela ostatecznego.....	9
2.4.2 Cykl życiowy <i>T. gondii</i> u żywiciela pośredniego.....	10
2.5 Oocysty <i>T. gondii</i> , a środowisko.....	12
2.5.1 Występowanie oocyst <i>T. gondii</i> w środowisku.....	12
2.5.2 Przeżywalność oocyst <i>T. gondii</i>	13
2.5.3 Czynniki dezaktywujące oocysty <i>T. gondii</i>	14
2.6 Epidemiologia.....	15
2.6.1 Rola kotów w zanieczyszczeniu środowiska oocystami <i>T. gondii</i>	16
2.6.2 Drogi zarażenia człowieka pasożytem <i>T. gondii</i>	16
2.6.2.1 Droga pokarmowa.....	16
2.6.2.2 Droga przezłożyskowa.....	17
2.6.2.3 Pozostałe drogi.....	17
2.6.3 Epidemie toksoplazmozy na świecie.....	17
2.7 Toksoplazmoza.....	19
2.7.1 Postacie kliniczne toksoplazmozy.....	19
2.7.1.1 Toksoplazmoza nabyta u osób immunokompetentnych.....	20
2.7.1.2 Toksoplazmoza u osób z niedoborem odporności.....	20
2.7.1.3 Toksoplazmoza oczna.....	21
2.7.1.4 Toksoplazmoza wrodzona.....	21
2.8 Inwazje u zwierząt.....	22
2.9 Diagnostyka toksoplazmozy.....	23
2.9.1 Izolacja pasożyta.....	24
2.9.2 Badania histopatologiczne.....	24
2.9.3 Badania immunologiczne.....	24
2.9.3.1 Wykrywanie antygenu.....	24
2.9.3.2 Wykrywanie przeciwciał.....	25
2.9.4 Badanie molekularne.....	27
2.10 Genotypy <i>Toxoplasma gondii</i>	28
2.11 Badania środowiskowe nad <i>Toxoplasma gondii</i>	31
2.11.1 Badanie wody.....	31
2.11.1.1 Techniki koncentracji.....	32
2.11.1.2 Techniki oczyszczania.....	34
2.11.1.3 Metody detekcji <i>T. gondii</i>	35
2.11.2 Badanie prób ziemi.....	38
2.11.3 Badanie prób warzyw i owoców.....	39
2.11.4 Badanie żywotności oocyst <i>T. gondii</i>	39

3. Cel pracy.....	41
4. Materiały i Metody.....	42
4.1 Materiał środowiskowy.....	42
4.1.1 Próby ziemi.....	42
4.1.2 Próby warzyw i owoców.....	43
4.1.3 Próby powietrza.....	44
4.1.4 Próby wody.....	44
4.2 Kontrole dodatnie stosowane w badaniach PCR.....	44
4.3 Wybór genu do badania prób środowiskowych metodą PCR.....	45
4.3.1 Amplifikacja fragmentu genu kodującego białko 65 kDa.....	45
4.3.2 Amplifikacja fragmentu genu SAG2 <i>T. gondii</i>	46
4.3.3 Amplifikacja fragmentu genu B1 <i>T. gondii</i>	47
4.3.4 Amplifikacja fragmentu genu REP 529 bp <i>T. gondii</i>	48
4.4. Wybór metody do identyfikacji prób za pomocą techniki Real-time PCR.....	49
4.4.1 Konstrukcja standardu do badań Real-time PCR.....	49
4.4.2 Porównanie specyficznej i niespecyficznej techniki Real-time PCR.....	50
4.4.2.1 Niespecyficzny Real-time PCR.....	50
4.4.2.2 Real-time PCR z zastosowaniem sond molekularnych.....	51
4.5 Porównanie granicy detekcji PCR i Real-time PCR.....	53
4.6 Izolacja DNA z oocyst <i>T. gondii</i>	53
4.6.1 Porównanie skuteczności komercyjnych zestawów do izolacji DNA.....	53
4.6.1.1 Izolacja DNA przy użyciu instrumentu Fast Prep 120.....	53
4.6.1.2 Izolacja DNA metodą Boom'a.....	55
4.6.1.3 Izolacja DNA na mini kolumnach ze złożem krzemionkowym.....	56
4.6.2 Wstępna dezintegracja oocyst <i>T. gondii</i>	57
4.6.3 Porównanie skuteczności detergentów SDS i Tween 20 w izolacji DNA z oocyst <i>T. gondii</i>	58
4.7 Próby odzyskowe oocyst <i>T. gondii</i> z materiału środowiskowego.....	59
4.7.1 Metody mikroskopowe użyte do wykrywania oocyst <i>T. gondii</i> z prób odzyskowych oraz badania prób środowiskowych.....	60
4.7.1.1 Wykonanie preparatu świeżego.....	60
4.7.1.2 Wykonanie preparatu barwionego metodą Ziehl-Neelsen'a.....	60
4.7.1.3 Wykonanie preparatu mikroskopowego do badania autofluorescencji oocyst <i>T. gondii</i>	60
4.7.2 Próby odzyskowe oocyst <i>T. gondii</i> z piasku.....	61
4.7.3 Próby odzyskowe oocyst <i>T. gondii</i> z warzyw i owoców.....	61
4.7.4 Próby odzyskowe oocyst <i>T. gondii</i> z filtrów żelatynowych do pobierania powietrza.....	62
4.7.5 Próby odzyskowe oocyst <i>T. gondii</i> z wody.....	62
4.8 Strategia pobierania prób środowiskowych.....	62
4.8.1 Pobieranie prób ziemi.....	62
4.8.2 Pobieranie prób warzyw i owoców.....	63
4.8.3 Pobieranie prób powietrza.....	63
4.8.4 Pobieranie prób wody.....	64
4.9 Metody odzyskiwania oocyst <i>T. gondii</i> z prób środowiskowych.....	64

4.9.1 Odzyskiwanie oocyst <i>T. gondii</i> z prób ziemi.....	64
4.9.2 Odzyskiwanie oocyst <i>T. gondii</i> z prób warzyw i owoców.....	65
4.9.3 Odzyskiwanie oocyst <i>T. gondii</i> z prób wody.....	66
4.9.3.1 Filtracja prób wody.....	66
4.9.3.2 Sonifikacja.....	68
4.9.3.3 Opłaszczanie kuleczek magnetycznych przeciwciałami 4B6 anty <i>Toxoplasma gondii</i>	69
4.9.3.4 Reakcja IMS (immunomagnetyczna separacja).....	70
4.9.3.5 Kontrola procesu IMS – immunofluorescencja z przeciwciałami 4B6.....	71
4.9.4 Odzyskiwanie oocyst <i>T. gondii</i> z prób powietrza.....	72
4.10 Badanie prób środowiskowych metoda mikroskopową.....	72
4.11 Określenie odsetka prób dodatnich metodami molekularnymi.....	73
4.11.1 Izolacja DNA z prób środowiskowych.....	73
4.11.2 Detekcja DNA <i>Toxoplasma gondii</i> metodą PCR.....	73
4.11.3 Rozdział elektroforetyczny produktów PCR i wizualizacja wyników.....	73
4.11.4 Detekcja DNA <i>Toxoplasma gondii</i> metodą Real-time PCR.....	74
4.11.5 Określenie początkowej liczby kopii w badanej próbce za pomocą Real-time QPCR.....	75
4.11.5.1 Przygotowanie krzywej standardowej.....	75
4.11.5.2 Sposób wyznaczanie początkowej liczby kopii matrycy.....	76
4.12 Sekwencjonowanie prób dodatnich.....	76
4.12.1 Amplifikacja fragmentów genu B1.....	77
4.12.2 Oczyszczanie DNA.....	77
4.12.3 Reakcja sekwencyjna.....	77
4.12.4 Oczyszczanie produktów reakcji sekwencyjnej z terminatorów.....	78
4.12.5 Analiza badanej sekwencji nukleotydowej.....	78
4.13 Genotypowanie prób dodatnich.....	78
4.13.1 Genotypowanie metodą RFLP.....	78
4.13.1.1 Amplifikacja fragmentów genu SAG2 <i>T. gondii</i>	78
4.13.1.2 Trawienie produktów amplifikacji.....	78
4.13.2 Genotypowanie metodą sekwencjonowania.....	79
4.14 Aparatura.....	81
5 Wyniki.....	83
5.1 Wyniki selekcji genu do detekcji DNA <i>T. gondii</i> za pomocą PCR.....	83
5.2 Wybór metody do identyfikacji DNA <i>T. gondii</i> za pomocą techniki Real-time PCR.....	83
5.3 Porównanie czułości detekcji PCR i Rea-time PCR z wykorzystaniem klonowanej kontroli <i>T. gondii</i>	84
5.4 Wyniki izolacji DNA z oocyst <i>T. gondii</i>	85
5.4.1 Wyniki izolacji DNA z oocyst <i>T. gondii</i> zestawami komercyjnymi.....	85
5.4.2 Wyniki zastosowania etapów wstępnej dezintegracji oocyst <i>T. gondii</i> poprzedzających izolację DNA zestawem komercyjnym Genomic Mini (A&A Biotechnology).....	86
5.5 Wyniki prób odzyskowych.....	88
5.5.1 Wyniki badań mikroskopowych.....	88
5.5.1.1 Wyniki prób odzyskowych z piasku.....	88

5.5.1.2 Wyniki prób odzyskowych z warzy i owoców.....	89
5.5.1.3 Wyniki prób odzyskowych z wody.....	90
5.5.1.4 Wyniki prób odzyskowych z filtrów do pobierania prób powietrza.....	90
5.5.2 Wyniki badań molekularnych.....	92
5.5.2.1 Wyniki PCR.....	92
5.5.2.2 Wyniki Real-time PCR.....	94
5.5.2.3 Wpływ procedur odzysku oocyst <i>T. gondii</i> na straty materiału.....	98
5.5.3 Porównanie granicy detekcji <i>T. gondii</i> metodą mikroskopową i molekularną.....	98
5.6 Wyniki badania prób środowiskowych.....	99
5.6.1 Wyniki badania prób ziemi.....	99
5.6.1.1 Odsetek prób dodatnich uzyskanych techniką PCR i Real-time PCR.....	99
5.6.1.2 Wyniki testu inhibicji PCR.....	103
5.6.1.3 Wyniki genotypowania prób dodatnich.....	104
5.6.1.4 Wyniki analizy ilościowej techniką Real-time QPCR.....	106
5.6.1.5 Wyniki badań mikroskopowych.....	108
5.6.2 Wyniki badania prób warzyw i owoców.....	109
5.6.2.1 Odsetek prób dodatnich uzyskanych metoda PCR i Real-time PCR.....	109
5.6.2.2 Wyniki testu inhibicji PCR.....	111
5.6.2.3 Wyniki genotypowania prób dodatnich.....	112
5.6.2.4 Wyniki analizy ilościowej techniką Real-time QPCR.....	113
5.6.2.5 Wyniki badań mikroskopowych.....	114
5.6.3 Wyniki badania prób wody.....	115
5.6.4 Wyniki badania prób powietrza.....	115
5.6.5 Wyniki sekwencjonowania amplifikowanych fragmentów genu B1 <i>T. gondii</i> dodatnich prób środowiskowych.....	115
6 Dyskusja.....	116
6.1 Analiza wyników dotyczących opracowania i optymalizacji metodyki detekcji oocyst <i>T. gondii</i>	116
6.1.1 Analiza wyników metody izolacji DNA oocyst <i>T. gondii</i>	116
6.1.2 Analiza wyników doboru genu do wykonania PCR w celu specyficznej detekcji DNA <i>T. gondii</i>	118
6.1.3 Analiza wyników doboru metody detekcji oraz analizy ilościowej DNA <i>T. gondii</i> techniką Real-time PCR.....	118
6.1.4 Analiza wyników doboru metodyki pobierania prób środowiskowych i odzysku oocyst <i>T. gondii</i>	121
6.1.5 Weryfikacja skuteczności przyjętych metod badawczych na podstawie analizy wyników prób odzyskowych.....	123
6.2 Analiza wyników badania prób środowiskowych.....	125
6.2.1 Analiza wyników badania prób ziemi.....	125
6.2.2 Analiza wyników badania prób warzyw i owoców.....	130
6.2.3 Analiza wyników badania prób wody.....	133
6.2.4 Analiza wyników badania prób powietrza.....	134
6.2.5 Analiza wyników genotypowania dodatnich prób środowiskowych.....	134
6.2.6 Problem określania żywotności oocyst <i>T. gondii</i>	135
7 Wnioski.....	138
8 Literatura.....	140

9 Indeks skrótów.....	154
10 Załączniki.....	155
11 Spis tabel.....	190
12 Spis rycin.....	192

1. STRESZCZENIE

Toxoplasma gondii jest pierwotniakiem wywołującym toksoplazmozę – jedną z najbardziej rozpowszechnionych inwazji pasożytniczych człowieka na świecie. Ludzie zarażają się głównie drogą pokarmową - przez spożywanie surowego bądź niedogotowanego mięsa zawierającego cysty pasożyta. Możliwa jest także transmisja przez przypadkowe połknięcie oocyst znajdujących się w środowisku zanieczyszczonym odchodami zarażonego kota (żywiciel ostateczny pasożyta). Oocysty są wytrzymałe na niesprzyjające warunki środowiskowe oraz inaktywację chemiczną (mogą przetrwać w wodzie nawet 54 miesiące, a w glebie ponad rok, zachowując zdolności inwazyjne). Zatem, podstawowe matryce środowiskowe: woda gleba, powietrze, a także spożywane w stanie surowym warzywa i owoce mogą być ważnym źródłem zagrożenia dla zdrowia człowieka. W dostępnej literaturze brakuje wystarczających informacji o rozpowszechnieniu oocyst *T. gondii* w środowisku. Przez długi czas badania w tym kierunku były silnie ograniczone z powodu braku skutecznych metod detekcji. Dopiero rozwój specyficznych i czułych metod odzysku oocyst *T. gondii* i identyfikacji pasożyta (m.in. technika immunomagnetycznej separacji i metody molekularne), jaki dokonał się w ostatnim czasie, dał nadzieję na szybką, specyficzną detekcję *T. gondii* w tym materiale. Dotychczas tylko kilka prac odnosiło się do wykrywania oocyst *T. gondii* w naturalnie zanieczyszczonej wodzie. Znikoma ilość informacji dotyczy dystrybucji oocyst w glebie. Natomiast brak jest doniesień na temat występowania pasożyta na spożywanych warzywach i owocach oraz w powietrzu. W badaniach środowiskowych bardzo rzadko uwzględniano genotyp *T. gondii*, a jest to informacja istotna z punktu widzenia zagrożenia dla zdrowia człowieka.

Celem pracy było kompleksowe zbadanie występowania oocyst *Toxoplasma gondii* w środowisku (wodzie, ziemi, powietrzu oraz na warzywach i owocach) oraz określenie genotypu wykrytych pierwotniaków. Badania miały

określić tym samym, jakie jest realne ryzyko zarażenia się człowieka pasożytem przez kontakt z zanieczyszczonym naturalnym otoczeniem.

Łącznie zebrano 437 prób środowiskowych z terenu i okolic Trójmiasta oraz Elbląga. Badaniu poddano: 151 prób ziemi (piaskownice dla dzieci, piach z terenu osiedli miejskich, ziemia z ogródków działkowych oraz gospodarstw wiejskich), 216 prób owoców i warzyw (kupowanych w sklepach i na bazarach oraz zebranych z przydomowych ogródków i działek), 50 prób wody (woda wodociągowa, z kąpielisk, ze studni odkrytych i głębinowych), 20 prób powietrza (z terenów osiedli miejskich). Oocysty *T. gondii* odzyskiwano z prób metodami: filtracji, flotacji, flokulacji i immunomagnetycznej separacji (odpowiednio do rodzaju materiału). W celu detekcji pasożyta wykonano badania mikroskopowe oraz molekularne: PCR i Real-time PCR na obecność DNA *T. gondii* z wykorzystaniem starterów komplementarnych do fragmentu genu B1 pierwotniaka. Próby, które były dodatnie w badaniu PCR poddano genotypowaniu metodą analizy restrykcyjnej produktów amplifikacji fragmentów genu SAG2 *T. gondii* oraz sekwencjonowaniu. Dodatkowo, wykonano ilościowe badanie DNA metodą Real-time QPCR w celu oszacowania ładunku patogennego prób dodatnich. Przeprowadzono testy odzysku i detekcji oocyst *T. gondii* z prób środowiskowych, eksperymentalnie zanieczyszczonych różną liczbą oocyst pasożyta i określono granice detekcji przy przyjętych metodach badawczych.

Metodą PCR DNA *T. gondii* wykryto w 15 % prób ziemi i 5 % prób warzyw i owoców, natomiast metodą Real-time PCR odpowiednio w 23 % i 9 %. W żadnej z badanych prób wody oraz powietrza nie zanotowano obecności DNA pasożyta. Wyniki sekwencjonowania prób dodatnich z genem B1 potwierdziły, że uzyskane sekwencje są zgodne z sekwencją *T. gondii* zamieszczoną w Banku Genów (AF179871). Genotypowanie wykazało, że próby środowiskowe były zanieczyszczone typem SAG2 I i SAG2 II *T. gondii* – oba są niebezpieczne dla człowieka. Ilościowe badanie DNA wykazało natomiast, że ponad połowa prób ziemi była zanieczyszczona liczbą poniżej 10 oocyst pasożyta, a pozostałe próby zawierały od kilkudziesięciu do kilkuset

oocyst *T. gondii*. Szacunkowe zanieczyszczenie prób owoców i warzyw było niewielkie (średnio 3 oocysty na próbę).

Tak kompleksowe badania środowiskowe, których celem było wykrycie *T. gondii*, były prowadzone po raz pierwszy, zarówno w Polsce jak i na świecie. W pracy wykorzystano cały zestaw nowoczesnych metod biologii molekularnej, co poprawia jakość badań. Wobec skąpej metodyki do identyfikacji *T. gondii* w materiale środowiskowym, wiele zastosowanych rozwiązań wymagało adaptacji i optymalizacji.

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że gleba oraz warzywa i owoce zanieczyszczone oocystami *T. gondii* mogą stanowić realne ryzyko zarażenia się ludzi tym pasożytem. Uzyskanie produktów PCR pierwotniaka z badanego piasku jest pierwszym doniesieniem w Polsce i drugim na świecie, dotyczącym wykrywalności tego pasożyta w tym materiale technikami molekularnymi. Także po raz pierwszy udowodniono obecność DNA *T. gondii* na warzywach i owocach przeznaczonych do spożycia. Badania dostarczyły informacji, które mogą przyczynić się do polepszenia programu profilaktyki przeciw toksoplazmowej w Polsce.

2. WSTĘP

2.1 RYS HISTORYCZNY I TAKSONOMIA

Toxoplasma gondii jest szeroko rozpowszechnionym na całym świecie wewnątrzkomórkowym pasożytem ssaków i ptaków. Po raz pierwszy został on wykryty w 1908 roku przez C. Nicolle i L. Manceaux (Instytut Pasteura, Francja) u północnoafrykańskiego gryzonia *Ctenodactylus gondii* [Kruszewski i Miller, 2004; Kadłubowski i Kurnatowska, 1979]. Niezależnie, w tym samym czasie, pasożyt został opisany również przez A. Splendore u królików laboratoryjnych [Garcia, 2007]. Nazwę gatunkową *Toxoplasma gondii* utworzono od nazwy żywiciela (*C. gondii*) oraz w nawiązaniu do łukowatego kształtu komórki pierwotniaka (gr. *toxon* = łuk). Przynależy on do typu *Apicomplexa*, obejmującego ponad pięć tysięcy gatunków pasożytniczych pierwotniaków [Zaremba i Borowski, 2001], charakteryzujących się spolaryzowaną strukturą komórki i charakterystycznym rozmieszczeniem organelli w apikalnym końcu komórki. Innymi przedstawicielami tego typu są, m. in. patogeny ludzkie i/lub zwierzece z rodzaju *Plasmodium*, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Babesia* czy *Sarcocystis*. Powszechnie przyjęty podział systematyczny *T. gondii* pokazano w Tabeli 1.

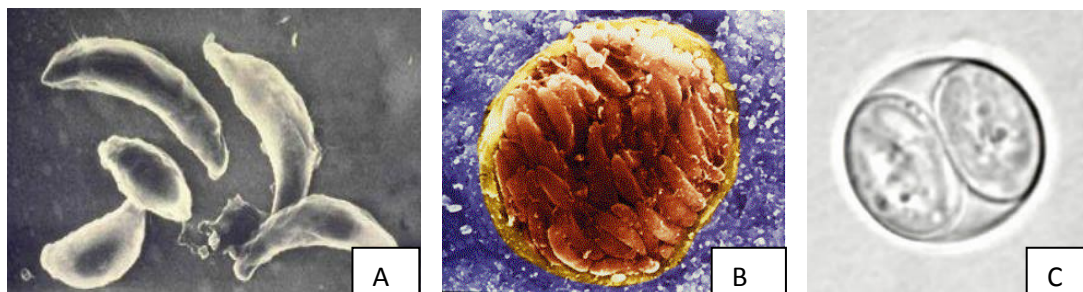
Tabela 1. Pozycja taksonomiczna *Toxoplasma gondii* [Długońska, 2005; Zaremba i Borowski, 2001; Niewiadomska i wsp., 2001].

podział systematyczny	
nadkrólestwo	<i>Eucaryota</i>
królestwo	<i>Protista</i>
dział	<i>Protozoa</i>
typ	<i>Apicomplexa</i> = <i>Sporozoa</i>
klasa	<i>Perkinsiea</i>
podklasa (gromada)	<i>Coccidea</i>
rząd	<i>Eucoccidiidae</i>
podrząd	<i>Eimeriina</i>
rodzina	<i>Sarcocystidae</i>
rodzaj	<i>Toxoplasma</i>
gatunek	<i>Toxoplasma gondii</i>

Po zidentyfikowaniu pasożyta w tkankach *C. gondii*, pojawiały się nowe doniesienia o wykryciu toksoplazm w organizmach zrażonych ludzi bądź zwierząt. W 1923 r. opisano obecność *T. gondii* w siatkówce dziecka z wodogłowiem, w 1937 r. udokumentowano przypadek toksoplazmozy wrodzonej u ludzi, a w 1940 r. - śmiertelnej toksoplazmozy u osoby dorosłej. Wprowadzony w 1948 r. test Sabina i Feldmana potwierdził obecność zarażeń pasożytem *T. gondii* u ludzi na całym świecie. W latach pięćdziesiątych miały miejsce odkrycia wskazujące na sposób zarażania się pasożytem. Udowodniono m.in. możliwość zarażenia się *T. gondii* przez spożywanie surowego lub niedogotowanego mięsa, a także wykryto inwazyjne formy pasożyta w odchodach kotów. Jednakże kompletny cykl życiowy *T. gondii* pozostawał nieznany aż do 1970 r., kiedy to został przedstawiony przez Dubeya i wsp. (1970). Rozwój nowoczesnych technik badawczych, m.in. mikroskopii elektronowej oraz kontrastowo-fazowej pozwolił, po wieloletnich badaniach, poznać szczegółową budowę *T. gondii* oraz dokładnie zrozumieć cykl rozwojowy tego pierwotniaka.

2.2 FORMY ROZWOJOWE *T. gondii*

W cyklu życiowym pasożyta wyróżnia się następujące formy rozwojowe: tachyzoity, bradyzoity, cysty tkankowe oraz sporozoity, sporocysty i oocysty [Dubey i wsp., 1998]. Tachyzoity zamknięte są w tzw. pseudocystach, bradyzoity w cystach tkankowych, a sporozoity w sporocystach znajdujących się wewnątrz oocysty. (Rycina 1).

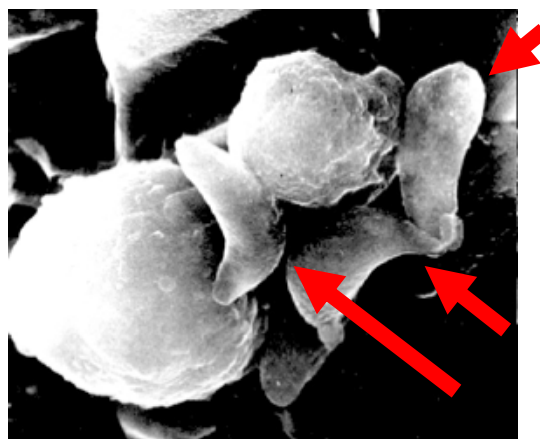


Rycina 1. Formy rozwojowe *Toxoplasma gondii*: A) tachyzoity (wg prof. Jaroslava Flegra, Univerzity Karlovy, iForum 2009, www.cuni.cz/IFORUM) B) cysta tkankowa z bradyzoitami (wg DJP Feruson/University of Oxford, cosmosmagazine.com), C) sporulująca oocysta zawierająca 2 sporocysty ze sporozoitami (4 w każdej sporocysty) (wg dpd.cdc.gov., imagelibrary).

Tachyzoity są formami „agresywnymi” pasożyta, ulegającymi intensywnym podziałom w komórkach jądrzastych żywicieli pośrednich oraz nabłonku jelita żywiciela ostatecznego [Garcia, 2007]. Nazwę tachyzoit (gr. *tachys* = szybko) wprowadził Frenkel w 1973 r. zamiast terminu trofozoit (gr. *trophicos*), którym wcześniej określano tę formę (inny funkcjonujący w literaturze termin to endozoit). Tachyzoity mogą ulegać przemianie w bradyzoity (gr. *bradys* = wolno), określane także mianem cystozoitów, które są formami „spoczynkowymi”, występującymi w cystach tkankowych (znajdujących się głównie w ośrodkowym układzie nerwowym oraz mięśniach). Ich biologiczną rolą jest umożliwienie pasożytowi przetrwania w organizmie gospodarza (przeważnie do końca życia) oraz rozprzestrzenianie *T. gondii* wśród mięsożernych żywicieli pośrednich i żywicieli ostatecznych (kotowate) [Dubey i wsp., 1998].

2.3 BUDOWA KOMÓRKI *T. gondii*

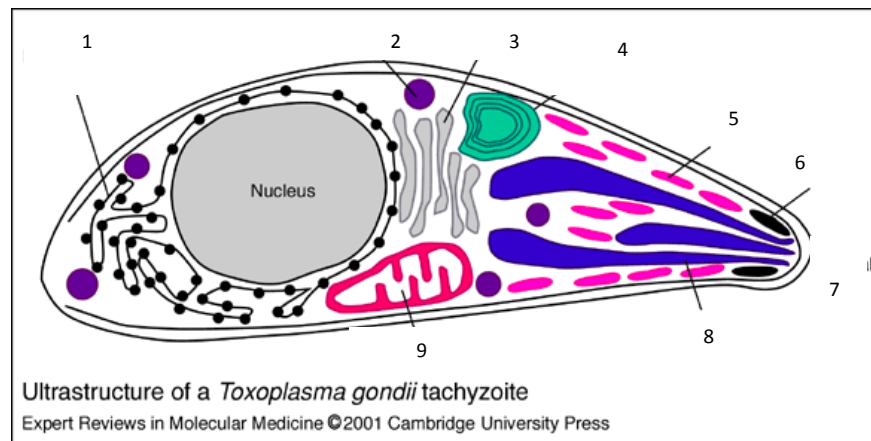
Postać wegetatywna (tachyzoit) *T. gondii* ma kształt półksiężycowaty, przypominający cząstkę pomarańczy. Jest asymetryczna – o jednym końcu zaokrąglonym, a drugim ostro wydłużonym (tzw. biegun apikalny, odgrywający zasadniczą rolę przy wnikaniu pasożyta do komórki gospodarza) (Rycina 2).



Rycina 2. Tachyzoity *Toxoplasma gondii* obserwowane w mikroskopie elektronowym (wg Carmello, 2001).

Komórka otoczona jest trójwarstwową pellikulą, składającą się z plazmalemy oraz dwóch wewnętrznych ściśle połączonych błon tworzących charakterystyczny kompleks błonowy. W apikalnym końcu komórki znajduje się

tw. kompleks apikalny (ciało biegunowe) złożony z charakterystycznych pierścieni, konoidu i specyficznych organelli wydzielniczych: roptrii i mikronem. Pierścienie stanowią część cytoszkieletu. Pierścień polarny 1, który otacza konoid jest zakończeniem kompleksu błonowego, natomiast pierścień polarny 2 to miejsce, z którego odchodzą 22 mikrotubule podpelikalne, sięgające do około 2/3 długości komórki. Od pierścieni apikalnych (prekonoidalnych), do wnętrza komórki wchodzi dwie mikrotubule apikalne. Są one swoistym rusztowaniem kierującym roptrie i mikronemy w kierunku konoidu tak, aby umożliwić sekrecję ich zawartości z apikalnego końca komórki. Konoid jest niewielką, stożkową strukturą, która odgrywa mechaniczną rolę przy inwazji pasożyta do komórek gospodarza. Składa się ze skręconych filamentów, które umożliwiają jego obracanie i kurczenie. Maczugowate roptrie (zazwyczaj kilka) znajdują się między jądrem komórkowym a konoidem. Ich wąski koniec, tzw. szyja znajduje się wewnątrz konoidu, a drugi koniec, tzw. worek poza nim. W apikalnym końcu komórki znajdują się także niewielkie, owalne mikronemy. Roptrie i mikronemy są organellami wydzielniczymi, niezbędnymi przy inwazji komórek żywiciela. Ponadto w komórce wyróżnia się, m.in. granule o dużej gęstości (organella sekrecyjne) charakterystyczne dla *Apicomplexa* oraz typowe organella komórkowe (aparat Golgiego, siateczka śródplazmatyczna szorstka i gładka, mitochondria). Jądro komórkowe zawiera DNA w ilości około 87 mln pz, w postaci 11 chromosomów (2 – 10 mln pz). Pozajądrowe fragmenty DNA stanowi DNA mitochondrialne (6×10^3 pz) oraz DNA apikoplastowe (35×10^3 pz) [Wilson i Williamson, 1997]. Schemat przedstawiający ultrastrukturę komórki *T. gondii* przedstawiony jest na Rycinie 3 .



Rycina 3. Ultrastruktura komórki *Toxoplasma gondii* (Expert Reviews in molecular Medicine, 2001, Cambridge University Press). 1 – reticulum endoplazmatyczne, 2 – granule o dużej gęstości, 3 - aparat Golgiego, 4 – apikoplast, 5 – mikronemy, 6 – konoid, 7 – koniec apikalny, 8 – roprtie, 9 – mitochondrium.

Komórka tachyzoitu ma wielkość 6 μm długości i 2 μm szerokości. Jądro komórkowe położone jest centralnie, a liczba roptrii (często z zawiniętym końcem) waha się pomiędzy 8 – 10. Zazwyczaj obecnych jest także kilka ziarenek amylopektyny [Dubey i wsp., 1998].

Bradyzoity strukturalnie nie różnią się wiele od tachyzoitów. Są przeważnie nieco węższe i dłuższe (7 μm x 1,5 μm). Jądro komórkowe znajduje się bliżej dolnego (zaokrąglonego) bieguna komórki. Posiadają więcej ziaren amylopektynowych i mniej granul o dużej gęstości niż tachyzoity. Są także mniej podatne na działanie enzymów proteolitycznych. Liczba roptrii wynosi od 1 do 3 zależnie od wieku cysty tkankowej [Dubey i wsp., 1998]. Cysty tkankowe zawierające bradyzoity są zróżnicowane pod względem wielkości. Młode cysty tkankowe są małe (około 5 μm) i zawierają zazwyczaj jedynie dwa bradyzoity. Starsze, dojrzałe cysty są większe i mogą zawierać tysiące bradyzoitów. Cysty zlokalizowane w mózgu żywiciela są sferoidalne i mają średnicę nie przekraczającą 70 μm , a występujące w mięśniach szkieletowych są wydłużone i mierzą około 100 μm . Cysty otoczone są własną otoczką oraz błoną komórkową zniszczonej komórki gospodarza [Dubremetz, 1998]. Otoczka cysty tkankowej jest elastyczna i cienka (< 0,5 μm).

Także sporozycy morfologicznie przypominają tachyzoity, mają 6 – 8 μm długości oraz 2 μm szerokości. Posiadają jednak więcej mikronem, roptrii

i ziaren amylopektynowych. Ponadto zawierają ciała lipidowe (rzadkie u tachyzoitów i nieobecne u bradyzoitów) [Dubey i wsp., 1998]. Sporozycyty zamknięte są w oocystach. Oocysty są kulistego kształtu i mają średnicę 10 – 12 μm . Po sporulacji stają się bardziej owalne i mierzą 11 – 14 μm . Ściana oocysty zbudowana jest z trzech warstw [Speer i wsp., 1998]. Każda sporulująca oocysta zawiera dwie sporocysty, w których znajdują się po cztery sporozycyty.

2.4 CYKL ŻYCIOWY *T. GONDII*

Toxoplasma gondii jest organizmem dwużywieliem. Rozmnażanie płciowe (gametogonia) może następować tylko u żywicieli ostatecznych, którymi są zwierzęta kotowate (*Felidae*), w tym u kota domowego (*Felis catus*). U żywicieli pośrednich (człowiek, niektóre ssaki i ptaki) następuje rozmnażanie bezpłciowe pasożyta (schizogonia) [Tenter i wsp., 2000]. Cykl rozwojowy pierwotniaka ilustruje Rycina 4.

2.4.1 Cykl życiowy *T. gondii* u żywiciela ostatecznego

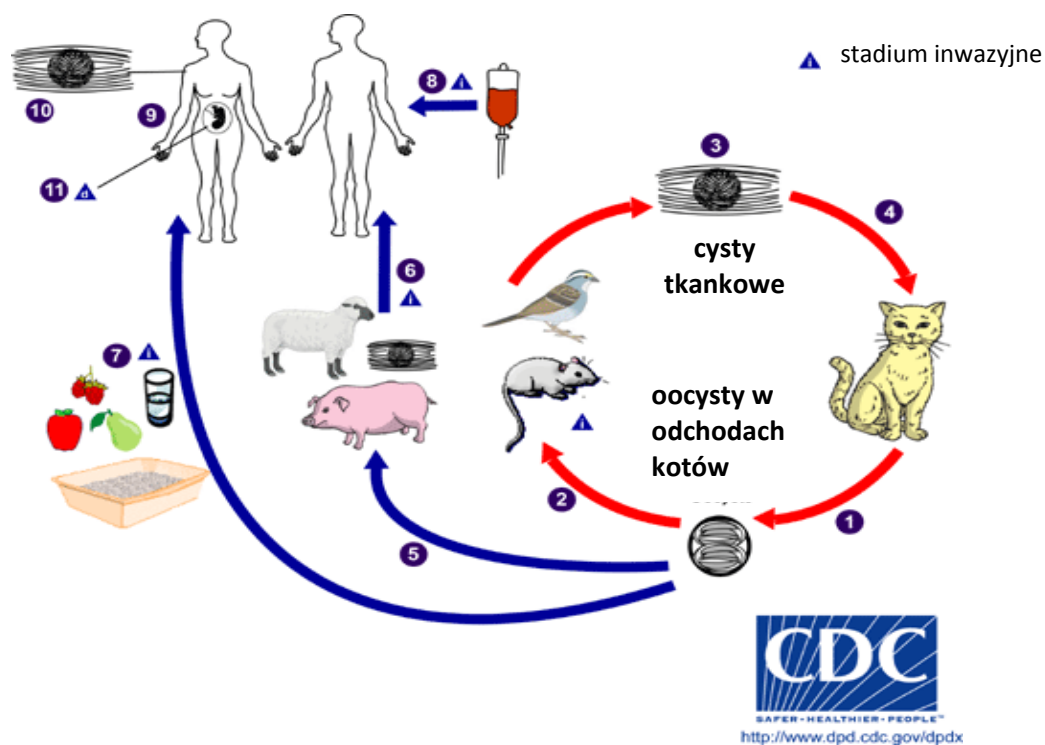
Koty przeważnie zarażają się przez spożycie mięsa upolowanych gryzoni lub ptaków, zawierającego cysty z bradyzoitami, bądź też oocystami znajdującymi się w środowisku (woda lub pokarm) zanieczyszczonym odchodami kota zarażonego *T. gondii*. Jelitowa część cyklu obejmuje wegetatywne rozmnażanie komórek pasożyta, gametogenezę i tworzenie oocyst. Formy inwazyjne pasożyta atakują komórki nabłonkowe jelita cienkiego żywiciela ostatecznego (inwazja obejmuje jelito czcze, potem kręte i okrężnicę). Tam mają miejsce podziały endodiogeniczne lub endopoligeniczne, prowadzące do powiększania się populacji w sposób bezpłciowy oraz następuje faza cyklu płciowego zapoczątkowana powstawaniem schizontów. Te ostatnie dzielą się na merozoity, z których część przekształca się w gametocyty. Sporogonia prowadzi do powstania z gametocytów mikro - i makrogamet, które następnie łączą się w zygotę (przekształcającą się w oocystę). Niedojrzałe oocysty są uwalniane z komórek epitelialnych i wydalane do środowiska wraz z kałem zarażonego kota. Codziennie przez okres od jednego do trzech tygodni wydalanych jest kilka milionów oocyst (maksimum przypada na 5 – 8 dzień).

Zatem krótki okres wydalania oocyst jest zbalansowany produkcją i rozsiewem dużej ich liczby. Okres poprzedzający wydalanie oocyst przez koty różni się w zależności od połkniętej formy pasożyta i trwa: 3 - 10 dni po połknięciu bradyzoitów zawartych w cystach tkankowych, 19 dni lub więcej od połknięcia tachyzoitów lub oocyst [Dubey i Frenkel, 1972; Dubey, 1996; Dubey, 2002]. Oocysty stają się inwazyjne dopiero po sporulacji (po wykształceniu się wewnątrz oocysty sporocyst zawierających sporozoioty). Następuje to w ciągu 1 - 21 dni w określonej temperaturze (11 - 25°C) oraz dogodnych warunkach aerobowych i wilgotnościowych [Dubey i wsp., 1970]. W sprzyjających warunkach oocysty pozostają inwazyjne dla człowieka i zwierząt nawet do 2 lat [Dubey, 1998; Frenkel i wsp., 1975].

2.4.2 Cykl życiowy u żywiciela pośredniego

Formami inwazyjnymi dla żywicieli pośrednich są tachyzoity, bradyzoity lub sporozoioty (podobnie jak u żywiciela ostatecznego). Po wniknięciu do ustroju żywiciela sporozoioty lub bradyzoity ulegają przemianie w tachyzoity. W tej formie pasożyty intensywnie namnażają się endodiogenicznie w komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego oraz enterocytach. Następnie drogą krwi i limfy (wewnątrz monocytów i granulocytów obojętnochłonnych) rozprzestrzeniają się po organizmie, penetrując do kolejnych komórek w różnych narządach i tkankach. W okresie ostrej inwazji w komórkach gospodarza powstają tzw. pseudocysty zawierające liczne tachyzoity. Uwalnianie się pasożytów prowadzi do niszczenia komórek i atakowania kolejnych. Proces ten prowadzi bezpośrednio do powstawania stanów zapalnych i ognisk martwiczych w organizmie. U żywiciela z prawidłowo działającym układem immunologicznym po fazie ostrej inwazji następuje faza przewlekła, charakteryzująca się powstawaniem cyst tkankowych zawierających dużą liczbę bradyzoitów. Z czasem cysty ulegają otoczeniu tkanką łączną i wysyceniu solami wapnia. Cysty potencjalnie mogą rozwijać się w każdej tkance i narządzie, jednak wykazują tendencję do formowania się w miejscach słabiej chronionych immunologicznie tj. w tkance nerwowej (ośrodkowy układ nerwowy i siatkówka), mięśniach poprzecznie prążkowanych i sercu. Przeważnie utrzymują się w organizmie żywiciela do końca jego życia, nie

powodując żadnych zmian zapalnych lub nieznaczne uszkodzenie otaczających tkanek w przypadku pęknięcia cysty (okresowe uwalnianie toksoplazm przedłuża utrzymywanie się odporności swoistej). U żywicieli z osłabionym układem immunologicznym (np. AIDS, wrodzone niedobory odporności, immunosupresja) może dojść do reaktywacji inwazji w wyniku pęknięcia cyst i przemiany bradyzoitów w tachyzoity. U kobiet ciężarnych, które uległy zarażeniu pierwotnemu (w czasie ciąży lub bezpośrednio przed) toksoplazmy mogą pokonać barierę łożyskową i wywołać inwazję wrodzoną u płodu.



Rycina 4. Cykl życiowy *Toxoplasma gondii* (www.ars.usda.gov, United States Department of Agriculture). 1 - wydalanie oocyst *T. gondii* przez żywiciela ostatecznego do środowiska, 2 - połknięcie inwazyjnych oocyst przez dzikich żywicieli pośrednich, 3 - wykształcenie cyst tkankowych, 4 - spożycie zarażonego mięsa przez żywiciela ostatecznego, 5 - połknięcie oocyst przez zwierzęta hodowlane i wykształcenie cyst tkankowych, 6 - spożycie zarażonego mięsa przez ludzi, 7 - połknięcie przez człowieka oocyst znajdujących się w środowisku, 8 - zarażenie się człowieka przez transfuzję krwi zanieczyszczonej tachyzoitami *T. gondii*, 9 - zarażenie płodu przez tachyzoity obecne w organizmie matki, 10 - wykształcenie cyst tkankowych w organizmie człowieka, 11 - rozwinięcie inwazji wrodzonej u płodu.

2.5 OOCYSTY *T. GONDII*, A ŚRODOWISKO

2.5.1 Występowanie oocyst *T. gondii* w środowisku

Oocysty *T. gondii* wydalane są do środowiska zewnętrznego wraz z kałem zarażonych kotów w bardzo dużej ilości (kilka milionów dziennie). Rozsiewane są w środowisku głównie przez wiatr, wodę, nawóz oraz przez dżdżownicę i stawonogi; mogą zanieczyszczać wodę powierzchniową, glebę, warzywa i owoce [Dubey i Beattie, 1988; Dubey i wsp., 1970; Frenkel i wsp., 1975; Smith i Frenkel, 1978; Ruiz i Frenkel, 1980; Dumetre i Darde, 2005]. Oocysty mogą występować tam, gdzie bytują koty i gdzie dogodne warunki pozwalają na ich przeżywanie (zwłaszcza wilgotne i zacienione miejsca). Miejsca sprzyjające kontaminacji ludzi to między innymi: ogrody, parki, podwórka, systemy wody pitnej (od rezerwuarów do kranów), stawy i jeziora przeznaczone do rekreacji, zanieczyszczone bezpośrednio lub pośrednio przez odchody kotów. Wystąpienie inwazji u zwierząt hodowlanych dostarcza informacji na temat zanieczyszczonych paszy źródeł takich jak: łąki wokół farm, miejsca nawadniania, stawy, strumienie, pasza do karmienia, gdzie koty mogą wydalać odchody.

Lokalne ryzyko zanieczyszczenia ziemi przez oocysty *T. gondii* zależy od stężenia odchodów zarażonych kotów oraz przeżywalności oocyst i ich dyfuzji w ziemi. Zachowania defekacyjne kotów są ogólnie znane. Odchody są zwykle zakopywane w miejscu głównego bytowania zwierząt, a także na granicy terytorium [Turner i Beteson, 2000]. Koty często wykorzystują to samo miejsce do defekacji, a pojedyncza lokalizacja może być wykorzystana przez różne osobniki, gdy ich liczba na danym terenie jest duża [Uga, 1996; Afonso i wsp., 2008]. W ziemi oocysty *T. gondii* przeważnie występują na powierzchni, bądź na głębokości do 10 cm [Frenkel i wsp., 1975], ale ich transport poprzez ziemię jest nieznan.

Zanieczyszczenie warzyw i owoców oocytami *T. gondii* następuje najczęściej przez ich bezpośrednie narażenie na kontakt z odchodami kotów lub nawadnianie skontaminowaną wodą [Dumetrè i Dardé, 2005].

Z powodu odporności oocyst *T. gondii* i możliwość zarażania się kotów podczas każdej pory roku, nie zanotowano sezonowości w występowaniu oocyst w środowisku. Jednakże obfite opady deszczu mogą zwiększać zanieczyszczenie zbiorników wodnych przez przemywanie gleby i wypłukiwanie z niej oocyst [Bowie i wsp., 1997; Miller i wsp., 2002]. Powiązanie wystąpienia ostrych przypadków zarażeń *T. gondii* i szczytem opadów deszczu wykazano podczas wodno pochodnej epidemii toksoplazmozy w Viktorii (Kanada) w 1995 r. [Bowie i wsp., 1997].

Obecność kotów w pobliżu ludzkich domów oraz mniejsza powierzchnia do „składowania” odchodów kocich na terenach miejskich może zwiększać możliwość kontaminacji środowiska oocystami *T. gondii* [Bahia-Oliveira i wsp., 2003]. Populacje kotów wolnożyjących (*Felis catus*) mogą osiągać wysokie lokalne zagęszczenie na terenach zurbanizowanych [Macdonald, 1983; Liberg i Sandell, 1988]. Miejsca takie jak parki, ogrody będące miejscem rekreacji i zabaw dla ludzi są szczególnie narażone na zasiedlanie przez grupy tych zwierząt [Afonso i wsp., 2008]. Natomiast na terenach rolniczych (wiejskich) oocysty mogą być wydalane daleko od domów. Znalezienie odchodów może być trudne, ponieważ są one szybko rozkładane w naturalnych warunkach (około 1 tygodnia), ponadto koty mają tendencję do ich zakopywania [Frenkel i wsp., 1975; Aramini i wsp., 1999].

2.5.2 Przeżywalność oocyst *T. gondii*

Oocysty są formami przetrwanymi pasożyta, bardzo odpornymi na niekorzystne warunki środowiskowe, a także na różne procesy chemiczne służące np. uzdatnianiu wody pitnej. Wynika to, m. in. ze specyficznej budowy ścian oocyst *T. gondii*, gwarantujących wysoką wytrzymałość na zniszczenie. Badania wykazały, że ściana zarówno oocyst jak i sporocyst *T. gondii* zbudowana jest z trzech warstw [Speer i wsp., 1998].

Niesporulujące oocysty *T. gondii* tracą swą zdolność do sporulacji (nabywania inwazyjności) po zamrożeniu (1 dzień w - 21°C lub 7 dni w - 6°C) lub ogrzewaniu (50°C, 10 min.) [Dubey, 1970; Frenkel i Dubey, 1973]. Warunki zwykłej chłodni są niewystarczające aby przeciwdziałać rozwojowi inwazyjności

[Lindsay i wsp., 2002]. Sporulujące oocysty mogą pozostawać inwazyjne w wodzie przez przynajmniej 54 miesiące w 4°C [Dubey, 1998], a w ziemi do 18 miesięcy w różnych temperaturach [Frenkel i wsp., 1975]. Generalnie, wzrost temperatury powoduje skrócenie czasu przeżywalności oocyst. Natomiast zamrażanie może nie być wystarczające, aby zabić sporulujące oocysty. Mogą one przeżyć 28 dni po stałym mrożeniu w -21°C [Frenkel i Dubey, 1973]. W dodatku wykazano, że zmienne temperatury w nieznacznym stopniu wpływają na czas przeżywania oocyst w wodzie i ziemi, i w konsekwencji oocysty mogą pozostawać inwazyjne nawet po kilku zimach [Frenkel i wsp., 1975; Frenkel i Dubey, 1973]. Oocysty prawdopodobnie przeżywają również w wodzie słonej, gdyż inwazje powodowane przez *T. gondii* były notowane u ssaków morskich [Dubey i Beattie, 1988]. Udowodniono, że oocysty mogą być usuwane przez ostrygi z eksperymentalnie zanieczyszczonej wody morskiej [Lindsay i wsp., 2001]. Zatem wydaje się, że te mięczaki mogą być dla konsumujących je ludzi lub ssaków morskich potencjalnym źródłem inwazji *T. gondii*. Wcześniej taką możliwość wykazano dla oocyst *C. parvum* [Fayer i wsp., 1998; Freire-Santos i wsp., 2000]. Także chłodne i wilgotne warzywa i owoce mogą dostarczać optymalnego środowiska dla przeżywania oocyst [Dumetrè i Dardé, 2005]. Kniel i wsp. (2002) wykazali 8-tygodniowy okres przeżycia oocyst *T. gondii* na malinach przechowywanych w 4°C, co potwierdza te przypuszczenia. Te owoce były wcześniej wskazane jako ważne źródło inwazji *Cyclospora cayetanensis* u ludzi, kokcydium blisko spokrewnionym z *T. gondii* [Ho i wsp., 2002]. Proces suszenia lub też bezpośrednia ekspozycja na światło słoneczne są śmiertelne dla sporulujących oocyst *T. gondii* [Dubey i Beattie, 1988; Kutičić i Wikerhauser, 1996; Yilmaz i Hopkins, 1972].

2.5.3 Czynniki dezaktywujące oocysty *T. gondii*

Obecnie nie ma specjalnych zaleceń ani opracowanych metod inaktywacji inwazyjnych oocyst *T. gondii* w wodzie pitnej [Wainwright i wsp., 2007]. Wykazują one nadzwyczajną odporność na różne procedury inaktywacyjne, a w szczególności na czynniki chemiczne [Dubey i Beattie, 1988; Dubey i wsp., 1970; Dubey i wsp., 1970; Kutičić i Wikerhauser, 1996; Dubey i wsp., 1996; Dubey i wsp., 1998]. Na przykład w 4°C oocysty pozostają

żywe w wodnym 2% kwasie siarkowym lub 2,5% dwuchromianie potasu przez kilka lat. Co więcej, są one odporne na roztwory odkażające takie jak roztwór chlorku sodu. Odporność na reagenty chemiczne nie jest odosobnioną cechą wśród kokcydiów. Inny organizm - *Cryptosporidium* spp. jest odporny na procedury dezynfekujące takie jak np. chlorowanie wody uzdatnianej do picia [Rose i wsp., 2002]. Z powodu odporności na chemiczne i fizyczne czynniki inaktywujące, oocysty *T. gondii* mogą być obecne w wodzie lub żywności [Dumertè i Dardé, 2005]. Do ich rutynowej inaktywacji na warzywach i owocach zaproponowano promieniowanie gamma [Dubey i wsp., 1996; Dubey i wsp., 1998], a skuteczność niszczenia oocyst w wodzie pitnej przez promieniowanie UV wykazała ostatnio Wainwright i wsp. (2007).

2.6 EPIDEMIOLOGIA

Inwazje *Toxoplasma gondii* są szeroko rozpowszechnione na całym świecie, wśród ludzi i zwierząt (koty, psy, świnie, szczury, bydło, owce, kury). Na podstawie badań serologicznych wykazano, że około 30 % ludności zetknęło się z tym pasożytem [Wong i Remington, 1993; Petersen i Dubey, 2001]. Częstość zarażenia populacji ludzkiej (monitorowana obecnością swoistych przeciwciał) zależy od klimatu, warunków sanitarno–epidemiologicznych panujących na danym terenie jak i sposobu odżywiania i wzrasta wraz z wiekiem. Najwyższy odsetek odczynów dodatnich, sięgający 90 % występuje w czwartej dekadzie życia. Najwięcej przypadków zarażeń przypada na kraje, w których w dużych ilościach spożywane jest surowe lub niedogotowane mięso (np. Francja), gdzie panują sprzyjające warunki klimatyczne do przeżywania oocyst wydanych do środowiska (umiarkowany i ciepły) a także tam, gdzie bytuje duża liczba dziko żyjących kotów (np. Ameryka Środkowa). Toksoplazmoza jest natomiast zdecydowanie mniejszym problemem w rejonach chłodniejszych (np. Skandynawia) oraz w krajach o klimacie gorącym i suchym [Desmonts i wsp., 1985; Frenkel i wsp., 1975; Ruiz i Frenkel, 1980; Dupouy-Camet i wsp., 1993]. Występowanie toksoplazmozy w dużej mierze odzwierciedla stan sanitarny danego kraju, panujące zwyczaje żywieniowe oraz poziom oświaty zdrowotnej [Pawłowski 1999]. W Polsce około 60% populacji posiada dodatni odczyn serologiczny [Kruszewski i Miller 2004].

Odsetek surowic dodatnich w ostatnich latach w Zakładzie Parazytologii Tropikalnej w Międzywydziałowym Instytucie Medycyny Morskiej i Tropikalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, wynosił około 40%. Wśród dzieci w wieku 10 - 15 lat, badanych na terenie Wielkopolski, zarażonych było 31% [Pawłowski, 1995]. Z uwagi na możliwość przenikania tachyzoitów *T. gondii* przez łożysko do płodu, często badaną serologicznie grupą osób są kobiety ciężarne. Na terenie Wielkopolski dodatnie odczyny serologiczne stwierdzono u około 54 – 59% kobiet ciężarnych i krwiodawców [Patrzalek i wsp., 1990; Umiński i wsp., 1994; Pawłowski, 1995]. Z przeprowadzonych badań wynika ponadto, że statystycznie wyższy odsetek seropozytywnych kobiet ciężarnych występuje na wsi niż w środowisku miejskim [Paul, 2005].

2.6.1 Rola kotów w zanieczyszczeniu środowiska oocystami *T. gondii*

Kotowate (także kot domowy), pełnią podstawową rolę w epidemiologii toksoplazmozy. Przeprowadzone w Wielkopolsce badania serologiczne kotów wykazały ich zarażenie w 70,6%. Zaobserwowano także, że odsetek ten wzrasta wraz z wiekiem zwierząt: od 42 % u kotów 4 – 12 miesięcznych do 95% u kotów powyżej 5 lat. Co więcej, nie było znacznej różnicy w stopniu zarażenia kotów dzikich i domowych (78% i 66%) [Wąsiatycz, 1998]. Wydalanie oocyst ma miejsce głównie podczas pierwotnego zarażenia, przeważnie u młodych kotów (poniżej 1 roku życia) i trwa przez okres 1 - 3 tygodni. Istnieje także możliwość wtórnego wydalania oocyst po nadkażeniu lub przy zmniejszonej odporności kota, choć ma to miejsce przez krótszy czas i w zmniejszonej liczbie.

2.6.2 Drogi zarażenia człowieka pasożytem *T. gondii*

2.6.2.1 Droga pokarmowa

Zarażenie ludzi następuje najczęściej drogą pokarmową przez spożycie *T. gondii* (głównie mięso baranie, kozie, wieprzowe, wołowe) bądź niektórych przetworów mięsnych nie poddanych zabijającej cysty obróbce termicznej (metki, salami itp.), a także wędlin, mleka lub jaj pochodzących od zarażonych zwierząt. Odsetek zarażonych zwierząt domowych wynosi: 10 – 38 % świń, 15 – 72 % owiec, 47 % kóz, 20 – 90 % kurcząt [Paul, 2005]. Wykazano, że osoby

mające na kontakt ze zwierzętami i/lub surowym mięsem z racji wykonywanego zawodu znacznie częściej wykazują dodatnie odczyny serologiczne niż pozostałe grupy zawodowe [Sroka i wsp., 2003]. Możliwe jest również zarażenie przez przypadkowe połknięcie oocyst znajdujących się w środowisku zanieczyszczonym odchodami kota (w wodzie, glebie, na spożywanych warzywach i owocach) [Dubey, 1998; Dubey i wsp., 1998; Dubremetz, 1998; Dziubek i Żarnowska-Prymek, 1999, Cook i wsp., 2000]. Prawdopodobnie połknięcie pojedynczej oocysty (z zanieczyszczonym pokarmem lub wodą) może być wystarczające do zarażenia człowieka [Fayer i wsp., 2004]. Określenie jaki udział w zarażeniu populacji ludzkiej mają cysty obecne w mięsie zarażonych zwierząt i oocysty zanieczyszczające środowisko jest trudne do określenia [Pawłowski, 1999].

2.6.2.2 Droga przezłożyskowa

Może również dojść do zarażenia tachyzoitami *T. gondii* aktywnie przenikającymi przez łożysko do płodu w czasie trwania czynnej toksoplazmozy u matki (w czasie ciąży).

2.6.2.3 Pozostałe drogi

Inne drogi zarażenia dotyczą, m.in. transfuzji krwi zanieczyszczonej tachyzoitami *T. gondii* (mogą one przeżyć we krwi konserwowanej do 50 dni), przeszczepu zarażonych narządów oraz pracy z zainfekowanym materiałem w laboratorium [Paul, 1998; Herwaldt, 2001].

2.6.3 Epidemie toksoplazmozy na świecie

W Polsce stwierdza się tylko pojedyncze przypadki toksoplazmozy, jednak na świecie sporadycznie opisywane są epidemie wywołane piciem wody zanieczyszczonej oocystami *T. gondii*, masowego spożycia zarażonego mięsa lub niedostateczną higieną w trakcie przygotowywania posiłków [Won i wsp., 1997]. Wszystkie epidemie ostrej toksoplazmozy powiązane ze środowiskiem zanieczyszczonym oocystami *T. gondii* (Tabela 2) wiązały się z obecnością zarażonych kotowatych, których odchody zanieczyszczały glebę lub zbiorniki wodne.

Tabela 2. Epidemie ostrej toksoplazmozy u ludzi wywołane połknięciem oocyst *T. gondii* obecnych w glebie lub wodzie.

źródło oocyst <i>T. gondii</i>	kraj	rok	liczba przypadków toksoplazmozy	odnośnik literaturowy
epidemie wodnopochoodne				
strumienie wody w dżungli zanieczyszczone oocystami <i>T. gondii</i> przez dzikie koty	Panama	1979	39	Benenson i wsp., 1982
zbiornik wody pitnej, niefiltrowanej, zanieczyszczony odchodami dzikich i domowych kotów	Kanada	1995	110	Bowie i wsp., 1997
rezerwuar niefiltrowanej wody pitnej	Brazylia	2000	290	Keenihan i wsp., 2002
epidemie ziemiopochodne				
brak dokładnych danych	USA	1976	10	Stagno i wsp., 1980
stajnia koni wyścigowych	USA	1977	37	Teutsch i wsp., 1979
tereny wiejskie (rolnicze)	Brazylia	1982	nie określono	Coutinho i wsp., 1982

Zebranie prób środowiskowych powinno być wykonane tak szybko, jak to możliwe po pierwszym zanotowanym przypadku choroby. Jednakże jest to trudne do wykonania, ponieważ kliniczna toksoplazmoza może wystąpić 2 do 3 tygodni po inwazji i w tym czasie oocysty *T. gondii* mogą zniknąć ze źródła kontaminacji [Teutsch i wsp., 1979; Stagno i wsp., 1980; Isaac-Renton i wsp., 1998].

2.7 TOKSOPLAZMOZA

Seropozytywność nie jest jednoznaczna z chorobą. Liczba osób aktywnie chorujących na toksoplazmozę nabytą jest znacznie niższa niż liczba osób zarażonych pasożytem (posiadających przeciwciała anty-*T. gondii*).

W zależności od zastosowanego kryterium toksoplazmoza została podzielona na poszczególne jednostki chorobowe (Tabela 3).

Tabela 3. Podział toksoplazmozy za względu na kryteria [wg Kruszewskiego i Millera, 2004].

kryterium	podział
moment zarażenia	- wrodzona - nabyta
przebieg	- utajona - przewlekła - podostra - ostra
objawy kliniczne	- bezobjawowa (utajona) - objawowa
sposób zarażenia	- pierwotna - nawrotowa
umiejscowienie zmian patologicznych	- narządowa lub układowa - uogólniona

2.7.1 Postacie kliniczne toksoplazmozy

Obraz kliniczny toksoplazmozy oraz nasilenie objawów zależy przede wszystkim od: kondycji układu immunologicznego żywiciela, drogi zarażenia (inwazja wrodzona i nabyta), intensywności inwazji oraz zjadliwości szczepów *T. gondii*. U większości zarażonych osób wykazujących prawidłową funkcję układu odpornościowego choroba przebiega bezobjawowo (w ponad 80%) lub

ogranicza się do samoustępujących zmian w węzłach chłonnych (objawy występują tylko w 1 przypadku na 250 zarażonych) [Śpiwak i Małafiej, 1996]. Toksoplazmoza może jednak przybrać bardzo ciężki przebieg u osób z osłabioną funkcją układu immunologicznego, np. w przypadku AIDS, przy terapii immunosupresyjnej, transplantacji narządów czy u pacjentów z chorobami nowotworowymi [Luft i Remington, 1992; Israelski i Remington, 1993] oraz u niedojrzałych płodów [Wong i Remington, 1994; Beazley i Egerman, 1998].

2.7.1.1 Toksoplazmoza nabyta u osób immunokompetentnych

Toksoplazmoza węzłowa jest najczęstszą postacią kliniczną toksoplazmozy nabytej, zarówno u dzieci jak i dorosłych. Objawia się powiększeniem węzłów chłonnych (najczęściej szyjnych przednich i bocznych), którym mogą towarzyszyć objawy ogólne (stany podgorączkowe, bóle głowy i gardła, apatia, senność, osłabienie, bóle mięśni). Symptomy limfadenopatii pojawiają się najczęściej w ciągu kilku tygodni od zarażenia [Garcia, 2007; Kocięcka, 1999; Paul, 2005]. Niektórzy autorzy opisują przebieg toksoplazmozy jako zespół mononukleozopodobny, a także postać brzuszna (bóle brzuszne przypominające zapalenie wyrostka robaczkowego, zaburzenia łaknienia, wymioty, powiększenia węzłów chłonnych krezkowych) [Kocięcka, 1999; Kadłubowki, 1999; Paul, 2005]. Toksoplazmoza z zajęciem CUN, narządów wewnętrznych (m. in. serce, płuca, wątroba) lub mięśni szkieletowych jest u tej grupy osób rzadkością.

2.7.1.2 Toksoplazmoza u osób z niedoborem odporności

Toksoplazmoza, będąca przeważnie niegroźną inwazją pasożytniczą u osób immunokompetentnych, staje się bardzo niebezpieczna dla pacjentów z niedoborem odporności (wrodzonym lub nabytym). Do grupy osób podwyższonego ryzyka zalicza się przede wszystkim osoby zarażone wirusem HIV. Uczynnienie się nabytej wcześniej toksoplazmozy prowadzi często do rozwoju neurotoksoplazmozy manifestującej się objawami o różnorodnym nasileniu (m. in. zaburzenia orientacji i równowagi, drgawki, osłabienie, zaburzenia widzenia, bóle stawowe, śpiączka). Przebieg choroby jest bardzo

ciężki i nierzadko prowadzi do zgonu (czas przeżycia wynosi 9 – 15 miesięcy). Może także dojść do rozwinięcia się toksoplazmozy wielonarządowej (z zajęciem serca, mięśni szkieletowych, płuc, wątroby lub nerek). Podobne zagrożenie występuje u pacjentów po przeszczepach narządów (głównie serca i nerek) oraz biorców szpiku kostnego. W tym przypadku dochodzi do rozwinięcia się pierwotnej toksoplazmozy w wyniku przyjęcia zarażonego organu albo też reaktywacji choroby [Dziubk i Żarnowska–Prymek, 1999; Kadłubowki, 1999, Kraszewski i Miller, 2004].

2.7.1.3 Toksoplazmoza oczna

Toksoplazmoza oczna jest najczęściej następstwem wcześniejszej inwazji wrodzonej bądź reaktywacji zarażenia pierwotnego. Zmiany oczne mogą ujawniać się po wielu latach, głównie w stanach obniżonej odporności. Dochodzi wówczas do pęknięcia cyst i powstawania lokalnych uszkodzeń narządu wzroku, dotyczących głównie siatkówki i naczyńówki. Objawami są najczęściej: zaburzenia widzenia, mroczki przed oczami, światłowstręt, nadmierne łzawienie. Czasami może dojść do uszkodzenia nerwu wzrokowego i utraty wzroku. Najcięższe uszkodzenia oka dotyczą ostrych przypadków toksoplazmozy wrodzonej (atak tachyzoitów) i obejmują: małowocze lub niedorozwój gałek ocznych [Dziubk i Żarnowska–Prymek, 1999; Paul 2005; Garcia, 2007].

2.7.1.4 Toksoplazmoza wrodzona

Toksoplazmoza wrodzona dotyczy dzieci tych matek, które uległy pierwotnemu zarażeniu pasożytem *T. gondii* w okresie ciąży lub w czasie krótko ją poprzedzającym. Zarażenie pierwotne *T. gondii* kobiet ciężarnych zachodzi w świecie z częstością między 0,1 – 1% [Beazley i Egerman, 1998]. W przybliżeniu, w 40% przypadków dochodzi do inwazji płodu. Ryzyko nabycia toksoplazmozy wrodzonej oraz ciężkość uszkodzeń płodu zależy od czasu, w którym doszło do zarażenia matki. Ryzyko zarażenia płodu jest najmniejsze w pierwszym (około 17%), a największe w trzecim trymestrze ciąży (około 65%). Natomiast skutki inwazji są najcięższe w pierwszym trymestrze ciąży. Po wnikięciu toksoplazm do płodu najpierw następuje inwazja uogólniona, którą

stopniowo zaczynają ograniczać przeciwciała przenikające przez łożysko od immunokompetentnej matki. Pasożyt osiedla się następnie w narządach i tkankach nabywających najpóźniej swoistą odporność - w mózgu i siatkówce, gdzie powstaje stan przewlekłej inwazji aktywnej, co objawia się w postaci tzw. triady Sabina-Pinkertona obejmującej: wodogłowie lub małogłowie, zwapnienia śródmózgowe oraz zapalenia siatkówki – naczyńówki. Mogą wystąpić także objawy uogólnione (powiększenie wątroby i śledziona, żółtaczkę, zaburzenia oddychania, wymioty, biegunka, drgawki, zapalenie mózgu, porażenie mięśniowe, zmiany w narządzie wzroku) [Milewska - Bobula, 1999]. W drugim trymestrze ciąży uszkodzenia są łżejsze, a w trzecim inwazja przebiega bezobjawowo. Uważa się, że tylko 10% zarażonych noworodków ma objawy toksoplazmozy wrodzonej. Większość dzieci rodzi się pozornie zdrowa, ale badania wykazały, że u blisko 90% z nich w ciągu kilku lat pojawiają się później wady wzroku, słuchu (z utratą włącznie) i układu nerwowego, m. in.: padaczka, zaburzenia motoryki, zaburzenia mowy, zmiany emocjonalne, upośledzenie funkcji poznawczych i intelektualnych [Tenter, 2000; Milewska – Bobula, 1999].

W Polsce, wg szacunkowych danych epidemiologicznych, liczba zarażonych noworodków (ze stwierdzonymi objawami klinicznymi) wynosi 240 – 480 rocznie [Niemiec i Chazan, 1999; Lipka i Milewska-Bobula, 2001].

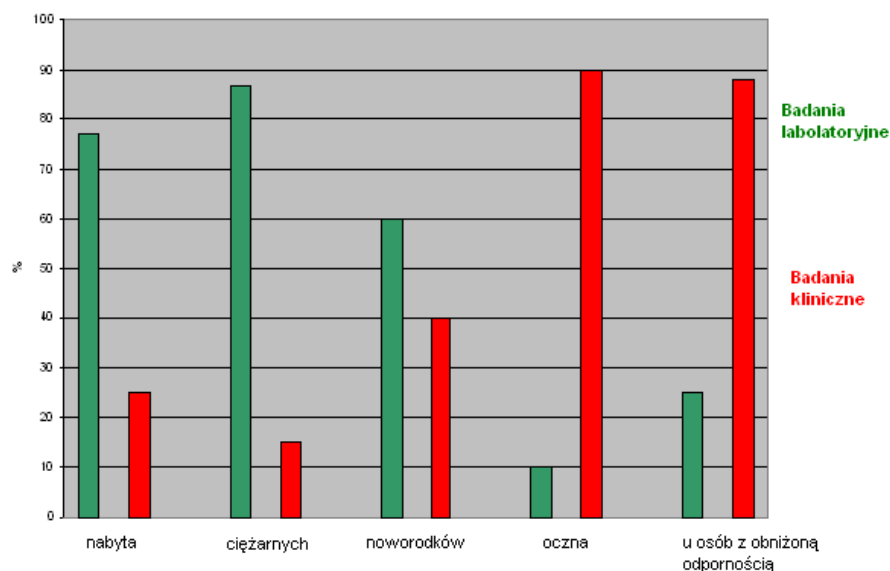
2.8 INWAZJE U ZWIERZĄT

Badania dowiodły, że już pojedyncza oocysta *T. gondii* jest zdolna do wywołania inwazji u świni [Dubey i wsp., 1996] lub myszy [Dubey i wsp., 1997]. Połknięcie oocyst znajdujących się w wodzie, glebie lub pokarmie jest prawdopodobnie najczęstszą drogą inwazji *T. gondii* u nie-mięsożernych ssaków i ptaków. Zwierzęta hodowlane mogą wykazywać bardzo wysoką seroprewelencję na całym świecie, sięgającą 100% [Tenter i wsp., 2000]. Owce i kozy pasące się na pastwisku wykazują wysoką seroprewelencję w wielu krajach. Inwazje *T. gondii* są problemem weterynaryjnym i ekonomicznym. Pasożyt ten jest m. in. odpowiedzialny za 12% aborcji w stadach owiec. Indukowane oocystami wybuchy epidemii letalnej toksoplazmozy były notowane także na farmach świń [Dubey i Beattie, 1988]. Niezależnie od seroprewelencji, rozpowszechnienie *T. gondii* w tkankach mięsnych zwierząt jest wyższe

u owiec, kóz i świń niż u drobiu, koni czy bydła [Tenter i wsp., 2000]. Z kolei ludzie mogą ulec inwazji spożywając mięso zwierząt zarażonych *T. gondii*.

2.9 DIAGNOSTYKA TOKSOPLAZMOZY

Rozpoznawanie toksoplazmozy następuje w oparciu o wyniki badań klinicznych oraz laboratoryjnych (Rycina 5). Diagnostyka tej choroby ma szczególne znaczenie dla określonych grup pacjentów: kobiet ciężarnych, płodów i noworodków podejrzanych o toksoplazmozę wrodzoną oraz osób z nieprawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym. Od właściwego rozpoznania inwazji uzależnione jest zarówno leczenie jak i zapobieganie toksoplazmozie.



Rycina 5. Odsetki przypadków toksoplazmozy rozpoznawanych badaniem laboratoryjnym i klinicznym w zależności od kategorii badanych osób.

Stosowane obecnie laboratoryjne metody diagnostyczne, służące wykrywaniu obecności *T. gondii* oraz mówiące o przebiegu zarażenia obejmują metody bezpośrednie (izolacja pasożyta, badania histopatologiczne, wykrywanie krążącego antygenu), metody pośrednie (testy serologiczne) i badania molekularne (wykrywanie DNA pasożyta).

2.9.1 Izolacja pasożyta

W celu izolacji pasożyta z materiału diagnostycznego stosuje się metodę biologiczną lub hodowlę *in vitro*. Metoda inokulacji myszy (w której sprawdza się serokonwersję bądź wykrywa się toksoplazmy w płynie otrzewnowym lub mózgu zwierząt) jest bardzo czuła (100%), ale rzadko stosowana do rutynowych badań ze względu na długi czas oczekiwania na wynik (około 4 tygodni). W metodzie *in vitro*, gdzie hoduje się pasożyty wewnątrzkomórkowe, czas oczekiwania na wynik jest krótszy (2 – 4 dni), ale czułość obniża się nawet do 50 %. Materiał badawczy pochodzi głównie od osób z obniżoną czynnością układu odpornościowego i może nim być: płyn mózgowo-rdzeniowy, krew, materiał biopsyjny, łożysko, płyn owodniowy.

2.9.2 Badania histopatologiczne

W tej metodzie poszukuje się tachyzoitów lub złogów antygeny pasożyta (dowody bezpośrednie), bądź charakterystycznych zmian dla ostrych przypadków nabytych (dowody pośrednie) w materiale biopsyjnym, płynach ustrojowych, szpiku czy materiałach sekcyjnych. W celu uwidocznienia pasożyta stosuje się metody barwienia (peroksydaza-antyperoksydaza, hematoksylina-eozylna, Giemsa) oraz metodę immunofluorescencji pośredniej i immunohistochemiczną.

2.9.3 Badania immunologiczne

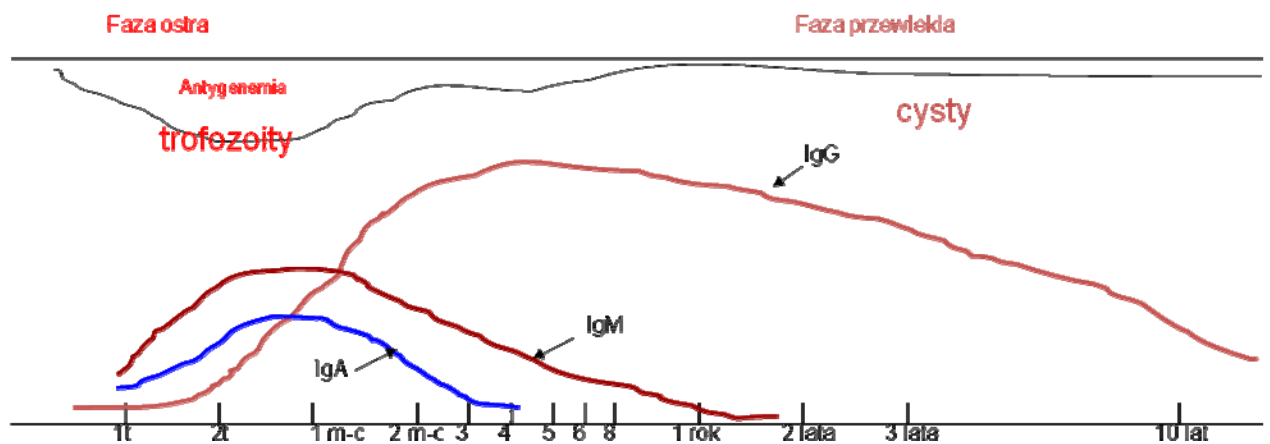
2.9.3.1 Wykrywanie antygeny

Ważną metodą bezpośrednią potwierdzającą aktywność inwazji *T. gondii* jest wykrycie we krwi lub płynach ustrojowych (płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn wewnątrzgałkowy, płyn owodniowy, mocz) rozpuszczalnego antygeny pasożyta. Wykorzystuje się w tym celu metody immunoenzymatyczne (testy ELISA), aglutynację lateksową czy Western blotting [Bitowska i Dzbeński, 1989; Hassan i wsp., 1997]. Antygen krążący *T. gondii* może być wykrywany przede wszystkim w czasie wczesnej, pierwotnej fazy choroby (w organizmie człowieka krąży 2 – 3 tygodnie).

2.9.3.2 Wykrywanie przeciwciał

W diagnostyce toksoplazmozy najczęściej wykorzystywane są badania serologiczne. Mogą dostarczyć informacji czy pacjent jest zarażony, w jakiej fazie jest choroba (aktywna czy przewlekła) oraz kiedy nastąpiło zarażenie. Wysoka efektywność badań serologicznych wynika z tego, że antygeny pasożyta bardzo silnie pobudzają układ odpornościowy żywiciela do powstania zarówno swoistej odporności komórkowej jak i humoralnej. Polegają na wykrywaniu w organizmie zarażonych osób (we krwi lub płynach ustrojowych) specyficznych przeciwciał anti-*T. gondii* [Pinon i wsp., 2001].

Toksoplazmy pojawiają się we krwi (i czasem też w innych płynach ustrojowych) po kilkunastu – kilkudziesięciu godzinach od zarażenia. U osób immunokompetentnych w odpowiedzi na stymulację antygenową powstają specyficzne przeciwciała toksoplazmowe. Najpierw pojawiają się przeciwciała klasy IgM (po około tygodniu), osiągając najwyższe stężenie po około miesiącu od zarażenia. Zanikają przeważnie w ciągu kilku miesięcy, chociaż w niektórych przypadkach mogą utrzymać się nawet do 2 lat. Równocześnie z IgM (lub z niewielkim opóźnieniem) pojawiają się w krążeniu przeciwciała klasy IgA. Charakteryzują się podobną dynamiką do IgM, z tym, że zanikają nieco wcześniej. Przyjmuje się, że czas zanikania IgA wyznacza granicę ostrej fazy toksoplazmozy. Przeciwciała obu wymienionych klas nie przechodzą przez łożysko. Najpóźniej we krwi pojawiają się przeciwciała klasy IgG (około drugiego tygodnia po zarażeniu). Ich miano osiąga najwyższe wartości po upływie 2 - 3 miesięcy i może utrzymywać się na wysokim poziomie nawet przez wiele lat. Następnie stężenie stopniowo zmniejsza się, ale może być wykrywane w niskim mianie do końca życia zarażonej osoby. Dynamika syntezy swoistych przeciwciał w przypadku toksoplazmozy nabytej przedstawiona jest na Rycinie 6. Przeciwciała klasy IgG przenikają przez łożysko do płodu i utrzymują się u noworodka do około roku.



Rycina 6. Dynamika syntezy swoistych przeciwciał w przypadku toksoplazmozy nabytej [wg Zielińska i Dzbeński, 1976].

Wyniki badań serologicznych, które mogą wskazywać na wczesny okres zarażenia *T. gondii* to: serokonwersja, niska awidność przeciwciał IgG, znaczący wzrost przeciwciał klasy IgG (kilkukrotny) w kolejnych badaniach, obecność immunoglobulin IgM i/lub IgA, wysoki poziom przeciwciał IgG (> 300 IU).

O zarażeniu noworodka może świadczyć wzrost stężenia przeciwciał IgG (w stosunku do stężenia przeciwciał u matki) oraz wykrycie przeciwciał IgM i IgA, które wytwarzane są przez płód. Przeciwciała IgA mogą być również wykorzystane w diagnostyce prenatalnej, gdyż pojawiają się już w 23 tygodniu ciąży. Termin zarażenia jest informacją szczególnie ważną dla kobiet ciężarnych, gdyż wiąże się z prognozą co do możliwości wystąpienia toksoplazmozy wrodzonej. Można go określić oznaczając awidność przeciwciał IgG, czyli siłę wiązania się przeciwciał z antygenem. Niska awidność (< 20 % związanych przeciwciał) oznacza początkowy okres inwazji, natomiast wysoka awidność (> 30 % związanych przeciwciał) wskazuje na przewlekłą fazę zarażenia [Bitkowska i wsp. 2000; Dzbeński, 1999].

Testy wykrywające przeciwciała

Testy serologiczne charakteryzują się wysoką czułością i swoistością, aczkolwiek w przypadku pacjentów z zaburzoną funkcją układu odpornościowego i niedojrzałych płodów są niewystarczające. Możemy

podzielić je na przesiewowe (skriningowe) oraz potwierdzające (Tabela 4). Pomimo, że obecnie istnieje wiele serologicznych metod diagnostycznych, to żadna nie jest idealna. Niezmiernie ważne jest, aby dobrać odpowiednią metodę do postaci klinicznej toksoplazmozy oraz poprawności funkcjonowania układu immunologicznego pacjenta.

Tabela 4. Testy serologiczne (przesiewowe i potwierdzające) stosowane w diagnostyce toksoplazmozy.

testy serologiczne	
Przesiewowe	potwierdzające
<ul style="list-style-type: none"> • Immunofluorescencyjne • Immunoenzymatyczne • Aglutynacyjne 	<ul style="list-style-type: none"> • próba barwna Sabina–Feldmana • testy różnicujące klasy przeciwciał: <ul style="list-style-type: none"> ➤ ELISA, ➤ ISAGA, ➤ ELIFA, ➤ immunofluorescencja, • testy potwierdzające syntezę swoistych przeciwciał (głównie IgG): <ul style="list-style-type: none"> ➤ ELIFA, ➤ immunobloting • test ELISA – IgG określający awidność przeciwciał.

2.9.4 Badania molekularne

Polimerazowa reakcja łańcuchowa (PCR = ang. Polymerase Chain Reaction) jest bardzo dobrą metodą wykrywania *T. gondii*, szczególnie przydatną, gdy wyniki rutynowych badań serologicznych nie dają jednoznacznych wyników [Dzbeński, 1999]. Zastosowanie PCR w diagnostyce

laboratoryjnej toksoplazmozy poprzedziło zidentyfikowanie w 1989 r. fragmentu genu B1 *T. gondii* przez Burg i wsp. Do tej pory na świecie do identyfikacji DNA *T. gondii* w materiale ludzkim stosowano także inne geny kodujące specyficzne białka pasożyta. Materiałem badawczym są najczęściej płyny ustrojowe, biopsjaty tkankowe oraz popłuczyny oskrzelowe [Grover i wsp., 1990; Grob i wsp., 1992; Ho–Yen i wsp., 1992; Aouizerate i wsp., 1993]. Wynik badania PCR może być niekiedy trudny do interpretacji. Amplifikowany fragment DNA może pochodzić zarówno od trofozoitów (obecnych w ostrej fazie inwazji) jak i cyst (charakterystycznych dla fazy przewlekłej). Dodatni wynik PCR może także dotyczyć pasożytów unieszkodliwionych w wyniku leczenia. Zatem odpowiedni dobór materiału badawczego jak i ostrożność w interpretacji wyników badania ma duże znaczenie.

2.10 GENOTYPY *TOXOPLASMA GONDII*

Toxoplasma gondii uznawany jest za pojedynczy gatunek, wewnątrz którego wyróżnia się wiele szczepów. Badania nad strukturą populacji tego pasożyta wykazały jej wysoko klonalny charakter. Objawia się to między innymi w rzadko spotykanej izolacji szczepów o identycznym genotypie z różnych żywicieli na wielkim obszarze geograficznym. Analiza genetyczna populacji wykazała, że *T. gondii* składa się z trzech zasadniczych wewnątrzgatunkowych typów tzw. linii klonalnych (oznaczonych jako I, II, III), które występują zarówno u człowieka jak i u zwierząt. Szczepy należące do poszczególnych linii wykazują zróżnicowaną zjadliwość wobec myszy [Boothroyd, 1993]. Szczep zjadliwy dla myszy to taki, którego dawka ≤ 100 tachyzoitów (podawanych dootrzewnowo) wywołuje ostre objawy choroby i śmierć zwierzęcia. Szczep o niskiej zjadliwości nie wywołuje żadnych objawów chorobowych nawet przy dawce ≥ 1000 pasożytów na mysz i jedynie cysty powstające w mózgach zarażonych zwierząt świadczą o zarażeniu [Fuentes i wsp., 2001, Sibley i Boothroyd, 1992] (Tabela 5).

Tabela 5. Zjadliwość szczepów *T. gondii* wykazywana w stosunku do myszy laboratoryjnych [wg Howe i Sibley, 1995] oraz zdolność do wywoływania toksoplazmozy u ludzi.

szcypy <i>T. gondii</i> należące do typu	zjadliwość wobec myszy laboratoryjnych	powiązanie z toksoplazmozą u ludzi
I	wysoka	tak
II	niska	tak
III	zróżnicowana	bardzo rzadko

U ludzi z terenu Europy oraz Ameryki Północnej najczęściej wykrywano genotyp II pasożyta [Howe i wsp., 1997; Mondragorn i wsp., 1998; Owen i Trees, 1999; Behzadi i wsp., 2003; Nowakowska i wsp., 2006; Edvinsson i wsp., 2006]. Chociaż w niektórych przypadkach odnotowano dominację typu I [Aspinall i wsp., 2003; Fuentes i wsp., 2001; Grigg i wsp., 2001]. Obserwowano także przypadki inwazji mieszanej typami I i II [Aspinall i wsp., 2003]. Typ III jest odpowiedzialny raczej za inwazje u zwierząt, u ludzi izolowany był rzadko. Atypowe (i rekombinowane) szczepy *T. gondii*, będące wynikiem częstych zmian genetycznych najczęściej występują w rejonach, gdzie cykl życiowy *Toxoplasma* zachodzi między kotowatymi a bardzo szerokim wachlarzem dzikich żywicieli pośrednich, np. w Afryce czy Brazylii [Ajzenberg i wsp., 2004]. W Europie lub USA takie atypowe szczepy są rzadkością.

Nie udało się dotąd jednoznacznie przypisać genotypu pasożyta do postaci toksoplazmozy u ludzi. Wydaje się jednak, że typ II dominuje w przypadkach toksoplazmozy wrodzonej [Howe i wsp., 1997; Nowakowska i wsp., 2006; Behzadi i wsp., 2003] oraz u osób z upośledzonym systemem immunologicznym [Howe i wsp., 1997; Edvinsson i wsp., 2006], a typ I związany jest z ostrymi przypadkami toksoplazmozy nabytej u osób immunokompetentnych [Carme i wsp., 2002; Behzadi i wsp., 2003] i z nabytą toksoplazmozą oczną [Grigg i wsp., 2001; Świtaj i wsp., 2006].

Większość zwierząt hodowlanych (owce, świnie, kurczaki) badanych na terenie Europy zarażonych było typem II *T. gondii* [Dubey i Chunlei Su, 2009]. Typ III izolowano głównie od dzikich zwierząt [Dardé, 2004].

Trzy linie klonalne obejmują ponad 95% szczepów izolowanych w Europie i Ameryce Północnej [Długońska, 2008]. Mając na uwadze rozprzestrzenienie pasożyta na całej kuli ziemskiej oraz szeroki wachlarz żywicieli pośrednich, zróżnicowanie genetyczne *T. gondii* jest zaskakująco małe [Howe i Sibley, 1995; Dytnerka i wsp., 2004]. Zmienność w obrębie pojedynczej linii klonalnej jest niewielka (różnice w sekwencji nukleotydowej linii wynoszą tylko 1 - 2 %). Wyjątek stanowią jedynie polimorficzne rejony mikrosatelitarne. Zwiększoną różnorodność szczepów obserwuje się na terenie Ameryki Pd. Przetrawanie struktury klonalnej *T. gondii* przypisuje się dwóm cechom cyklu życiowego pasożyta: przenoszenia na drodze oralnej (infekcyjne cysty tkankowe u żywicieli pośrednich umożliwiają transmisję pasożyta w obrębie łańcucha pokarmowego) oraz znikomej możliwości równoczesnego zarażenia się kota różnymi szczepami pasożyta (ograniczenie częstości zmian genetycznych).

Opisano już ponad 50 markerów do typowania *T. gondii*. Klasyfikacja poszczególnych szczepów odbywa się na podstawie analizy różnych loci z zastosowaniem takich metod jak: losowa amplifikacja polimorficznych fragmentów DNA (RAPD = ang. Random Amplification of Polymorphic DNA), analiza polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych (RFLP = ang. Restriction Fragment Length Polymorphism), analiza mikrosatelitarna, sekwencjonowanie DNA [Dardé, 2004]. Część badanych genów okazała się zbyt mało polimorficznych, aby zostały użyte do typowania bądź pozwalały na identyfikację tylko dwóch linii klonalnych. Wiele z dotychczas przeprowadzonych badań genotypów *T. gondii* opiera się na PCR/RFLP polimorficznego genu SAG2, który pozwala wyróżnić trzy linie populacyjne [Mondragorn i ws., 1988; Howe i wsp., 1997; Fuentes i wsp., 2001]. Opisywano także analizę RFLP opartą na wielu loci [Howe i Sibley., 1995; Nowakowska i wsp., 2006], oraz analizę polimorfizmu nukleotydowego w rejonach mikrosatelitarnych (MS). Polimorfizm długości MS (różnice w dwunukleotydowych tandemowych powtórzeniach) badany był przez sekwencjonowanie metodą Sanger [Ajzenberg i wsp., 2004]. Do określania typów *T. gondii* zastosowano także analizę dwóch pojedynczo nukleotydowych

polimorfizmów w genie GRA6 przez pirosekwencjonowanie [Edvinsson i wsp., 2006].

Ustalanie genotypu *T. gondii* przeprowadzano do tej pory głównie na próbach pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowaną toksoplazmozą lub zwierząt (zarówno hodowlanych jak i dzikich). W badaniach prób środowiskowych pod kątem zanieczyszczenia pasożytem *T. gondii* genotypowanie nie było do tej pory uwzględniane.

2.11 BADANIA ŚRADOWISKOWE NAD *T. GONDII*

Brak jest wystarczających danych o występowaniu oocyst *T. gondii* w środowisku. Prowadzone do tej pory, nieliczne badania, dotyczą głównie prób wody, rzadko ziemi. Badania warzyw, owoców oraz powietrza nie były jeszcze wykonywane. Nie uwzględniano w tych badaniach genotypów *T. gondii*, a jest to informacja istotna z punktu widzenia zagrożenia dla zdrowia człowieka. Problemem jest brak opracowanych specyficznych i czułych metod detekcji oocyst *T. gondii*.

2.11.1 Badania wody

Woda jest brana pod uwagę jako źródło inwazji *T. gondii* ze względu na długi okres żywotności oocyst w środowisku [Dubey, 1998] oraz odporność na różne procedury chemiczne i proces uzdatniania [Dubey i wsp., 1970; Dubey, 1998]. Dotychczas tylko w kilku publikacjach opisywano występowanie oocyst *T. gondii* w naturalnie zanieczyszczonej wodzie [Isaac–Renton i wsp., 1998; Villena i wsp., 2004; Sroka i wsp., 2006; Kourenti i Karanis, 2006; Dumetrè i Dardé, 2007; Aubert i Villena, 2009].

Przez ostatnie lata opisano kilka metod odzysku i detekcji oocyst *T. gondii* z wody, opartych w dużej mierze na metodach stosowanych z dobrym skutkiem do pozyskiwania oocyst *Cryptosporidium* oraz cyst *Giardia*. Niestety, nie są one jeszcze tak dobrze opracowane i wystandaryzowane, jak w przypadku wyżej wymienionych pasożytów. Obecnie dostępne metody wykrywania oocyst *T. gondii* obejmują najczęściej:

- zagęszczanie przez filtrację wielkoobjętościową [Isaac – Renton i wsp., 1998; Villena i wsp., 2004; Aubert i Villena, 2009] lub niskoobjętościową [Dumetre i Darde, 2005; Sroka i wsp., 2006; Dumetrè i Dardé, 2007], wirowanie prób o małej objętości [Dubey i wsp., 1995; Kourenti i wsp., 2003], flokulację [Isaac–Renton i wsp., 1998, Kourenti i wsp., 2003; Kourenti i Karanis, 2004; Kourenti i Karanis, 2006; Sotiriadou i Karanis, 2008];
- oczyszczanie przez flotację [Dubey i Beattie, 1998; Isaac–Renton i wsp., 1998; Villena i wsp., 2004; Sroka i wsp., 2006; Kourenti i Karanis, 2004; Kourenti i Karanis, 2006; Sotiriadou i Karanis, 2008] lub immunomagnetyczną separację (IMS) [Dumetrè i Dardé, 2005; Dumetrè i Dardé, 2007];
- specyficzną detekcję przez metody mikroskopowe [Dubey i wsp., 1970], biometodę [Dubey i wsp., 1995; Isaac–Renton i wsp., 1998; Villena i wsp., 2004; Aubert i Villena, 2009], IFA/UV [Dumetrè i Dardé, 2005; Dumetrè i Dardé, 2007], PCR [Schwab i McDewitt, 2003; Kourenti i Karanis, 2004; Villena i wsp., 2004; Sroka i wsp., 2006; Kourenti i Karanis, 2006; Dumetrè i Dardé, 2007; Aubert i Villena, 2009; Sotiriadou i Karanis, 2008].

Metody te są zwykle łączone w celu ulepszenia detekcji. Doniesienia dotyczące ich skuteczności często opierały się na badaniach odzysku prowadzonych w warunkach laboratoryjnych – z użyciem wody dejonizowanej lub wodociągowej oraz dużej ilości inokulum. Dopiero badania prowadzone na próbach środowiskowych wody (naturalnie mętnej, zanieczyszczonej różnego rodzaju szczątkami materii organicznej i nieorganicznej) oraz przy użyciu niewielkiej liczby poszukiwanych organizmów wykazały ogromne ograniczenie efektywności poszczególnych metod w wykrywaniu oocyst *T. gondii*.

2.11.1.1 Techniki koncentracji

Etap zagęszczania materiału badawczego odzyskiwanego z wody jest kluczowy, gdyż przeważnie na tym właśnie etapie dochodzi do utraty największej ilości materiału badawczego.

Flokulacja chemiczna jest metodą prostą i niedrogą. W 2003 r. Kourenti zaprezentował wyniki porównania wydajności metody chemicznej flokulacji oraz wirowania w różnych wartościach g w odzysku oocyst *T. gondii* z wody. Próby wody destylowanej o objętości 1L były zanieczyszczane oocytami *T. gondii* (10^4 i 10^5). Przy dodaniu do próby 10^5 sporulujących oocyst, odzysk metodą flokulacji wyniósł 93,1% z zastosowaniem $Fe_2(SO_4)_3$, 96,5% dla $Al_2(SO_4)_3$ oraz 82,5% metodą wirowania. Przy obniżeniu ilości inokulum do 10^4 oocyst wydajność opisywanych metod spadła, dając odpowiednio odzysk 70,4%, 41,5% oraz 52,5%. Podobne wyniki uzyskano z oocystami niesporulującymi. Zatem okazało się, że metody te dawały dobry wynik izolacji oocyst *T. gondii* z wody tylko przy dużej kontaminacji próby. Przy czym istotny jest fakt prowadzenia doświadczeń w warunkach odbiegających mocno od występujących w naturze (mała objętość próby, woda niemętna, duża liczba oocyst w inokulum). Dalszy rozwój metody odzysku oocyst *T. gondii* z wody z udziałem flokulacji z Al^{3+} przedstawili Kourenti i Karanis w 2006 r. Badano dziesięciolitrowe próby wody powierzchniowej (z rzek, studni oraz wodę morską). Jednak autorzy dodawali oocysty *T. gondii* już do osadów poflokulacyjnych, które poddawano kolejno oczyszczaniu i detekcji molekularnej. Zatem wydajność procesu flokulacji dla oocyst tego pierwotniaka nadal nie została określona.

Filtracja jest zdecydowanie częściej wykorzystywana do izolacji oocyst *Toxoplasma* spp. z wody. Mimo większej czasochłonności (przez procedurę elucji), jest metodą lepszą od flokulacji ze względu na możliwość badania dużych objętości prób oraz dobre wyniki odzysku przy mętnej wodzie. Ma to zasadnicze znaczenie szczególnie przy badaniu wody powierzchniowej [Villena i wsp., 2004; Aubert i Villena, 2009; Dumetrè i Dardé, 2003; Dumetrè i Dardé, 2007]. Wydajność filtracji w różnych warunkach została wcześniej określona dla innych pierwotniaków izolowanych z wody (*Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp.) o podobnych rozmiarach do oocyst *T. gondii*. Wykazano, że filtry z membranami polikarbonyłowymi lub z octanu celulozy (CAM) są użyteczne do filtrowania objętości 50 – 100 L. Co więcej, udowodniono, że lepsze wyniki odzysku z mętnej wody mogą dawać filtry kapsułowe z powodu prostszej

procedury elucji (49% do 12%) [Dumetrè i Dardé, 2003; Nieminski i wsp., 1995]. Dobre rezultaty w izolowaniu (oo)cyst z rodzaju *Cyclospora* i *Giardia* z wody dało zastosowanie filtrów kapsułowych Gelman Envirochek (GES i GEHV) oraz IDEXX Filtra-Max Systems. Te systemy, m.in. zostały włączone jako ulepszenie standardowych procedur monitorowania pierwotniaków w wodzie [Dumetrè, 2003; Anonymous 1999; USEPA (1999) Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. Office of Water. EPA-821-R-99-006.]. Filtry kapsułowe Envirochek pozwalają na filtrację większości wodno pochodnych związków i eliminują w znacznym stopniu zanieczyszczenia oraz większość inhibitorów PCR, obecnych w próbach środowiskowych [Mathenson i wsp., 1998]. Porównanie wydajności odzysku oocyst *T. gondii* z użyciem filtrów Gelman Envirochek standard (GES) oraz Gelman Envirochek High Volume (GEHV) nie wykazało znaczących różnic [Villena i wsp., 2004]. Filtrację z zastosowaniem filtrów GES wykorzystano z powodzeniem w kolejnych badaniach wody powierzchniowej pod kątem zanieczyszczenia *T. gondii* [Dumetrè i Dardé, 2007; Aubert i Villena, 2009].

2.11.1.2 Techniki oczyszczania

W wodzie środowiskowej oocysty *T. gondii* są przeważnie związane ze szczątkami i inhibitorami PCR. Podczas procesu zatężania wszystkie zanieczyszczenia akumulują się. Etap oczyszczania jest zatem kluczowy, gdyż ma za zadanie oddzielić oocysty *T. gondii* od zanieczyszczeń, które mogą wpływać istotnie na efektywność technik detekcji, np. PCR. Często stosowaną metodą oczyszczania przy dużej liczbie oocyst jest flotacja cukrowa. Jest to metoda niedroga i prosta w wykonaniu. Wykazuje dobry odzysk czystych oocyst *T. gondii* z mocno zanieczyszczonych zawiesin. Wykazano jednak, że stare i/lub uszkodzone oocysty wykazują większy ciężar niż młode [Dumetrè i Dardé; 2004]. Powoduje to różnice w odzysku w zależności od żywotności oocyst i wskazuje jednocześnie na pewną nieprzewidywalność metody (brak możliwości standaryzacji), bo nie jest możliwe, aby z góry określić wiek i kondycję oocyst znajdujących się w próbce badanej. Kolejną, istotną wadą metody jest brak możliwości dostatecznego usunięcia inhibitorów PCR. Alternatywą dla flotacji jest procedura immunomagnetycznej separacji (IMS)

ostatnio rozwinięta do odzysku i oczyszczania oocyst *T. gondii*. Użycie początkowo rekomendowanych przeciwciał mAb3G4 przeciwko ścianie oocyst dało średni odzysk między 45 – 83% w warunkach eksperymentalnych [Dumetrè i Dardé, 2005]. Niestety, testy przeprowadzone z naturalnie zanieczyszczoną wodą wykazały znaczny spadek efektywności tego przeciwciała (odzysk oocyst poniżej 20%). Zastosowanie bardziej specyficznych przeciwciał mAb4B6 skierowanych przeciwko ścianie sporocyst *T. gondii* dało odzysk (włączając proces filtracji) 14 – 45% w wodzie pitnej zanieczyszczonej 1 - 10 oocyst/L i 18 - 32,5% w wodzie powierzchniowej zanieczyszczonej 10 oocyst/L [Dumetrè i Dardé, 2007]. Wcześniej technika IMS została wprowadzona z dużym powodzeniem do badań nad *Cryptosporidium* i *Giardia* (znacznie poprawiając odzysk tych pierwotniaków) [Rochelle i wsp., 1999]. Obecnie jest to powszechna metoda monitorowania wody (programy AFNOR, 2001, U.S. EPA, 2001). W Polsce technikę IMS zastosowano do oczyszczania oocyst *Cryptosporidium spp.* z prób wody pitnej oraz pobieranych ze zbiorników powierzchniowych z okolic Poznania [Sulima P., 2001].

2.11.1.3 Metody detekcji *T. gondii*:

Specyficzne i czułe metody są opracowane dla innych pierwotniaków, ale jeszcze nie zostały dostatecznie rozwinięte dla wykrywania oocyst *T. gondii*.

Metody mikroskopowe i biometoda są niewystarczające, aby sprostać potrzebom czulej i prostej detekcji.

Mikroskopia świetlna może być wystarczająca do wykrywania oocyst *T. gondii* w wysoko skontaminowanych próbach, ale jest zbyt mało czuła i specyficzna przy niskim zanieczyszczeniu. Oocysty *T. gondii* mogą być mylone z oocytami *Hammondia spp.* i *Neospora spp.*, dwoma blisko spokrewnionymi kokcydiami, które również mogą występować w środowisku [Frenkel i Dubey, 1975; Dubey i wsp., 2002]. Dodatkowo, różne zanieczyszczenia, np. resztki organiczne, tworząc niejednolite tło utrudniają detekcję oocyst *T. gondii*.

Badanie w świetle UV ułatwia detekcję, ponieważ zarówno niesporulujące jak i sporulujące oocysty wykazują typową niebieską

autofluorescencję, jednakże jest to cecha wykazywana także przez inne kokcydia (*Neospora*, *Hammondia*, *Cyclospora*). Poza tym, nie wszystkie oocysty znajdujące się w badanej zawieszynie wykazują autofluorescencje jednocześnie, co prowadzi do fałszywie negatywnych wyników (szczególnie przy niewielkiej liczbie oocyst).

Lepszy wynik można osiągnąć stosując połączenie detekcji oocyst za pomocą badania ich autofluorescencji w świetle UV i immunofluorescencji z użyciem specyficznych przeciwciał. Jednak ta technika najczęściej służy badaniom prowadzonym w warunkach eksperymentalnych (np. do liczenia oocyst) lub jako metoda wspomagająca detekcję molekularną [Dumetrè i Dardé, 2005; Dumetrè i Dardé, 2007]. Brak jest komercyjnego zestawu do wykrywania oocyst *T. gondii* za pomocą metody immunofluorescencji.

Biometoda jest przede wszystkim stosowana do określania żywotności oocyst *T. gondii*. Próbowano używać jej także jako metody detekcji pierwotniaka w badaniach środowiskowych, ale kilkoro badaczy wykazało zawodność tego podejścia. Jest to metoda bardzo czasochłonna i mniej czuła niż np. PCR (co najmniej o połowę). Biometoda nie wykrywa niesporulujących, ani uszkodzonych oocyst *T. gondii* (które mogą tracić inwazyjność podczas procedur odzysku) [Isaac-Renton i wsp., 1998; Villena i wsp., 2004].

Zastosowanie metod molekularnych może prowadzić do specyficznej, czulej i szybkiej detekcji oocyst *T. gondii* w próbach środowiskowych, tak jak to ma miejsce w przypadku wykrywania innych pierwotniaków, np. *Cryptosporidium* spp. Jednakże do tej pory metodyka nie została dostatecznie rozwinięta, aby można było stosować technikę PCR w rutynowych badaniach prób środowiskowych. Większość starterów specyficznych do sekwencji genów *T. gondii* zostało zaprojektowanych i użytych do badania prób klinicznych (płynów ustrojowych i tkanek). Wykrywanie *tego* pasożyta w próbach środowiskowych za pomocą metod molekularnych jest rzadkością. Detekcja oocyst *T. gondii* oparta na PCR nie jest prosta. Izolacja DNA pasożyta jest trudna z powodu bariery jaką jest bardzo wytrzymała, kilkuwarstwowa ściana oocyst. Ściana ta wymaga zniszczenia przed właściwą ekstrakcją DNA.

Procedury w tym celu rozwinięte dla innych blisko spokrewnionych z *T. gondii* kokcydiów obejmują: cykle zamrażania/rozmarzania, rozcieranie szklanymi kuleczkami i trawienie proteinazą K [Dumetrè i Dardé, 2003]. Jednakże nie ma standardowego protokołu dla oocyst *T. gondii*. Kolejnym poważnym problemem jest obecność w próbach środowiskowych różnych substancji, które mogą hamować PCR, powodując redukcję czułości metody nawet o 100 – 1000 razy [Johnson i wsp., 1995]. Rozpuszczalne substancje, takie jak kwasy humusowe, glina, polisacharydy, są najważniejszymi inhibitorami PCR. Inhibicja PCR była notowana w badaniach prób wody środowiskowej na obecność *T. gondii* [Villena i wsp., 2004; Kourenti i Karanis, 2006; Aubert i Villena, 2009], nawet w 50% prób. Należy zaznaczyć, że w tych przypadkach oczyszczanie prób środowiskowych wykonywano za pomocą flotacji cukrowej, która w ograniczonym stopniu usuwa inhibitory PCR. Oczyszczanie oocyst przez IMS często jest wystarczające do usunięcia inhibitorów [Johnson i wsp., 1995], a dalsze oczyszczenie osiąga się przez zwykłą izolację DNA. Wykazano, że IMS w połączeniu z PCR może wykryć przynajmniej 1 oocystę *Cryptosporidium* w 5 - 100 L próbach wody pitnej oraz 1 - 5 oocyst w 20 L prób wody z rzek [Hallier-Soulier i Guillot, 1999]. Jednakże przez wiele lat technika IMS była niedostępna dla *T. gondii*. Ogólnie znane są różne substancje, które wpływają na polepszenie wydajności PCR: DMSO (dimetylosulfotlenek), BSA (surowicza albumina wołowa), PEG (glikol polietylenowy), formamid, glicerol. Dodanie BSA do badanych prób środowiskowych wody na obecność *T. gondii* pozwoliło częściowo znieść inhibicję PCR [Villena i wsp., 2004; Aubert i Villena, 2009], chociaż nie wszyscy badacze potwierdzają skuteczność tego rozwiązania [Kourenti i Karanis, 2006]. Rozbieżności mogą jednak wynikać z różnej natury inhibitorów, które znalazły się w badanych próbach.

Do tej pory tylko w kilku pracach dotyczących występowania oocyst *T. gondii* w wodzie środowiskowej zastosowano różne odmiany techniki PCR (PCR, nested PCR, Real-time PCR) (Tabela 6). W każdym przypadku wykrywano inny gen *T. gondii*. Dzięki zastosowaniu ilościowej techniki Real-time PCR (PCR w czasie rzeczywistym), oprócz podniesienia specyficzności przez zastosowanie sond molekularnych (najczęściej typu Taqman), można

określić w przybliżeniu ładunek patogenny próby (liczbę oocyst *T. gondii*, którą skontaminowana była badana próba). Takie badania nie były jednak do tej pory wykonywane.

Tabela 6. Odmiany techniki PCR oraz geny stosowane do wykrywania DNA *T. gondii* w próbach środowiskowych wody.

rodzaj PCR	amplifikowany fragment genu	odnośnik literaturowy
nested PCR	18S rRNA	Kourenti i Karanis, 2006
Real-time PCR	REP	Aubert i Villena, 2009
Real-time PCR	B1	Villena i wsp., 2004
PCR	65 kDa	Sroka i wsp., 2006
PCR	REP	Dumetre i Darde, 2007
PCR	B1	Schwab i McDewitt, 2003

2.11.2 Badanie prób ziemi

Lokalne ryzyko zanieczyszczenia ziemi przez oocysty *T. gondii* zależy od stężenia odchodów zarażonych kotów oraz od przeżywalności i dyfuzji oocyst w ziemi. Ponieważ młode zainfekowane koty wydalają miliony oocyst dziennie [Dubey i Beattie, 1998], to ich lokalne stężenie powinno być przynajmniej rzędu kilkuset/g. Detekcja oocyst w ziemi była już wcześniej kilkakrotnie opisana [Ruiz i wsp., 1973; Coutinho i wsp., 1982; Dubey i wsp., 1995; Frenkel i wsp., 1995; Kniel i wsp., 2002]. Z powodu dużej ilości zanieczyszczeń znajdujących się w glebie odzysk oocyst z tego materiału nie jest łatwy. Ich izolacja z naturalnie zanieczyszczonej gleby była wykonywana zwykle przez homogenizację próby, filtrację, standardową flotację cukrową i/lub biometodę. Pozytywne wyniki wahały się od 10/924 próby zebrane z placów zabaw dla dzieci w Panama City [Frenkel i wsp., 1995] do 4/15 prób pochodzących z podwórka domowego uczęszczanego przez koty [Ruiz i wsp., 1973]. Dumetrè i Dardé (2005) sugerowali, że być może oczyszczanie przez procedurę flotacji CsCl (chlorek cezu) lub połączenie flotacji z technikami opartymi na zastosowaniu specyficznych przeciwciał mogłoby poprawić wyniki detekcji, ale procedury nie zostały do tej pory opracowane. Afonso i wsp. (2008) badając dystrybucję oocyst *T. gondii* w odniesieniu do zachowań kotów zamieszkujących gęsto zaludnione aglomeracje miejskie użyli Real-time PCR do wykrywania

fragmentu genu REP pasożyta. Granica wykrywalności DNA wynosiła przynajmniej 1000 oocyst na próbę ziemi.

2.11.3 Badanie prób warzyw i owoców

Do tej pory nie podejmowano prób wykrywania oocyst *T. gondii* na warzywach lub owocach. Brak jest opracowanych i wystandaryzowanych metod detekcji w tym kierunku. Dumetère i Dardé (2005) sugerowali, że do wykrywania *T. gondii* w próbach warzyw i owoców mogłyby być zaadaptowane metody laboratoryjne z użyciem narzędzi molekularnych, bazujące na standardowym protokole do wykrywania *C. cayetanensis* [Anonymous (1997)] ze starterami o odpowiedniej sekwencji. Wykrywano natomiast obecność na warzywach i owocach innych pierwotniaków. W Polsce, były to mikrosporidia w próbach zebranych na terenie Wielkopolski, gdzie zastosowano do detekcji metodę FISH [Jendrzejewski i wsp., 2007].

2.11.4 Badanie żywotności oocyst *T. gondii*

Obecnie nie istnieją metody, dzięki którym można określić proporcje pomiędzy żywymi oraz martwymi oocystami *T. gondii* w różnych próbach środowiskowych. Jediną dostępną metodą określania żywotności oocyst *T. gondii* jest biometoda (inokulacja myszy laboratoryjnych). Jednak ma ona poważne ograniczenia, które utrudniają jej zastosowanie w rutynowych badaniach prób środowiskowych. Jest metodą niepraktyczną z uwagi na długi czas oczekiwania na wynik. Nie daje informacji na temat liczby żywych oocyst obecnych w badanej próbce, ponieważ już pojedyncza oocysta może indukować zarażenie u myszy [Dubey i Beattie, 1988; Dumetère i Dardé, 2003]. Nie wykryje także oocyst, które mogą być częściowo uszkodzone (w konsekwencji nieinfekcyjne) przez proces odzysku. Alternatywą dla tej metody jest wykrywanie RNA *T. gondii* (wykrycie kwasu rybonukleinowego świadczy o tym, że pasożyt jest żywy). W tym celu można by było zastosować technikę FISH (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*) lub RT-PCR (odwrotna transkrypcja). Jednakże metody te nie są jeszcze opracowane dla *T. gondii*.

Natomiast opisano już testy określające żywotność cyst/ocyst *Cryptosporidium* spp., oraz *Giardia* spp. Jednym z nich jest test DAPI/PI [Freire-Santos i wsp., 2000]. Użycie fluorogennych barwników do *T. gondii* nie jest możliwe, prawdopodobnie z powodu różnic w składzie ścian ocyst *T. gondii* i *Cryptosporidium*, oraz obecności dodatkowej ściany sporocyst u *Toxoplasma*. Poza tym, autofluorescencja ocyst *T. gondii* interferuje z fluorescencją DAPI. Stosowano także detekcję mRNA metodą RT-PCR i FISH. Ostatnio opisany został nietoksyczny i nieinwazyjny test dla ocyst *C. cayetanensis* [Tenter i wsp., 2000]. Kiedy są umieszczone w jednolitym wirującym polu elektrycznym, ocysty wykazują spektrum elektrorotacji zależnie od ich żywotności i stadium sporulacji. Metoda ta także nie została jeszcze zaadaptowana dla *T. gondii*.

Jak wynika z powyższego, wykrywanie ocyst *T. gondii* w próbach środowiskowych nie jest proste. Pomimo wieloletnich wysiłków badaczy na świecie, do tej pory nie udało się opracować jednego, skutecznego protokołu badań od pobrania próby po specyficzną i czułą detekcję pasożyta.

3. CEL PRACY

Celem badań przeprowadzonych w projekcie było:

1. zbadanie występowania oocyst *Toxoplasma gondii* w środowisku: wodzie, powietrzu, ziemi oraz na sprzedawanych warzywach i owocach;
2. określenie genotypu wykrytych pierwotniaków (typ I-III).

Badania miały odpowiedzieć na podstawowe pytanie - jakie jest rzeczywiste zanieczyszczenie środowiska pierwotniakiem *T. gondii* w Polsce, a tym samym, czy istnieje zagrożenie zarażenia się ludzi przez kontakt ze środowiskiem.

Ustalenie wzajemnych proporcji występowania oocyst *T. gondii* w środowisku i ich patogenności może być pomocne w opracowaniu skutecznego programu profilaktyki przeciwtoksoplazmowej w Polsce, skierowanego szczególnie do kobiet ciężarnych i planujących ciążę.

4. MATERIAŁY I METODY

4.1 MATERIAŁ ŚRODOWISKOWY

W celu określenia stopnia skażenia środowiska oocystami *Toxoplasma gondii* łącznie zebrano 437 prób środowiskowych: ziemi, wody, powietrza, warzyw oraz owoców. Materiał badawczy pobierano z miejsc, w których często bytują koty mogące wydalać oocysty *T. gondii* oraz takich, które sprzyjają rozprzestrzenianiu się zanieczyszczenia pasożytem i stwarzają potencjalne ryzyko zarażenia się człowieka. Obszar objęty badaniami stanowiło Trójmiasto i jego okolice oraz Elbląg i okolice.

Próby kolekcjonowano od kwietnia 2006 roku do września 2009 roku. Brano pod uwagę, m.in.: warunki sprzyjające przeżywaniu oocyst (temperatura, wilgotność), liczbę kotów wolnożyjących mogących wydalać oocysty, warunki atmosferyczne sprzyjające rozprzestrzenianiu się zanieczyszczenia pasożytem, okres, w którym istnieje największa możliwość kontaktu człowieka z potencjalnie zanieczyszczonym środowiskiem.

4.1.1 Próby ziemi

Badaniom poddano łącznie 151 prób ziemi zebranych na terenie oraz w okolicach Trójmiasta i Elbląga od kwietnia 2006 do września 2009 roku. Próby zbierano z obszarów miejskich oraz okolicznych wsi. Zbierane próby przynależą do trzech zasadniczych grup, wyłonionych na podstawie specyfiki miejsca pobierania (m. in. charakter i przeznaczenie) (Tabela 7).

Tabela 7. Podział zebranych prób gleby ze względu na specyfikę miejsca pobrania.

Lp.	charakter miejsca pobrania prób	liczba zebranych prób
1	piaskownice, place zabaw, parki na terenie miast	93
2	tereny wokół bloków oraz domków jednorodzinnych na terenie miasta (śmietniki, piasek pod balkonami, ziemia w ogrodzie przydomowym, piach gospodarczy)	33
3	ogródki działkowe miejskie oraz gospodarstwa wiejskie	25

Szczegółowy wykaz pobranych prób ziemi (z uwzględnieniem miejsca pobrania) zawarty jest w Załączniku 2.

4.1.2 Próby warzyw i owoców

Badaniom poddano łącznie 175 prób owoców i warzyw sprzedawanych na bazarach i w sklepach oraz 41 prób warzyw i owoców uprawianych w przydomowych ogródkach (Tabela 8). Próby pobierano od czerwca 2006 roku do sierpnia 2008 roku. Analizie poddano truskawki, marchew, rzodkiewkę i sałatę. Na jedną próbę brano odpowiednio: 1 kg truskawek, ½ kg marchwi, 1 sałatę, 2 pęczki rzodkiewek (około 20 sztuk).

Tabela 8. Podział zebranych prób warzyw i owoców.

Lp	rodzaj próby	sprzedawane w sklepach i na targowisku	uprawiane w ogródkach przydomowych	razem
1	truskawki	60	0	60
2	rzodkiewka	54	6	60
3	sałata	35	15	50
4	marchew	27	19	46
5	razem	175	41	216

Szczegółowy wykaz pobranych prób warzyw i owoców zawarty jest w Załączniku 3.

4.1.3 Próby powietrza

Ogółem przebadano 20 prób powietrza. Próby pobierano w miastach między sierpniem i wrześniem 2009 roku, w miejscach znajdujących się w pobliżu m. in. śmietników, piaskownic, ogródków przybalkonowych. Szczegółowy wykaz pobranych prób powietrza znajduje się w Załączniku 4.

4.1.4 Próby wody

Przebadano ogółem 50 prób wody pobieranych między wrześniem 2008, a wrześniem 2009 roku. Badano wodę wodociągową (kranową), wodę ze studni odkrytych, wodę ze studni głębinowych oraz z jezior, rzek (Tabela 9). Na jedną próbę przypadało 50 L wody wodociągowej oraz 10 L wody powierzchniowej.

Tabela 9. Podział prób wody ze względu na miejsce pobrania.

Lp	rodzaj próby	liczba prób
1	woda wodociągowa (kranowa)	17
2	studnie odkryte	5
3	studnie głębinowe	11
4	kąpieliska (jeziora, rzeki)	17
5	razem	50

Szczegółowy wykaz pobranych prób wody znajduje się w Załączniku 5.

4.2 KONTROLE DODATNIE STOSOWANE W BADANIACH PCR

Jako kontrole dodatnie w PCR zastosowano:

- DNA *Toxoplasma gondii* wyizolowane ze szczepu RH (genotyp I) otrzymane od prof. T. Dzbeńskiego z Państwowego Zakładu Higieny;
- DNA *Toxoplasma gondii* wyizolowane z tkanek i mózgow myszy zarażonych szczepem DX (genotyp II) i szczepem ME 49 (genotyp II) pochodzące od prof. H. Długońskiej z Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego.

4. 3 WYBÓR GENU DO BADANIA PRÓB ŚRODOWISKOWYCH METODĄ

PCR

Celem pierwszego etapu badań był wybór najbardziej efektywnej reakcji, umożliwiającej wykrywanie DNA *T. gondii* (PCR). Do badań wykorzystano genomowe DNA wyizolowane ze szczepu RH *T. gondii* (genotyp I). Na tej kontroli przetestowano startery flankujące fragmenty genów kodujących specyficzne białka *T. gondii*: SAG2, 65 KDa, B1, RE. Zoptymalizowano warunki reakcji dla wybranych genów. Przeprowadzono w tym celu szereg eksperymentów. Testowano skład mieszaniny reakcyjnej: polimerazy DNA różnych producentów (polimeraza RUN /A&A Biotechnology/, polimeraza AmpliTaq Gold /Applied Biosystems/, polimeraza RED /Sigma - Aldrich Sp. z o.o./) i jej stężenie, stężenie nukleotydów, stężenie starterów, stężenie jonów Mg^{2+} (miareczkowanie magnezu przez dodawanie do mieszaniny reakcyjnej 25 mM $MgCl_2$ w ilości: 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 i 5 μ l). Sprawdzano także liczbę cykli amplifikacji (w zakresie 30 – 45) oraz profil termiczny PCR. W celu wybrania najbardziej optymalnej temperatury przyłączania się starterów do matrycy DNA wykonywano PCR gradientowy w termocyklerze Mastercycler (Eppendorf AG) na serii 12 probówek o identycznym składzie mieszaniny reakcyjnej w gradiencie temperatury przyłączania starterów: 50 – 65°C.

Badano PCR pod kątem czułości (przeprowadzając eksperymenty na seryjnych rozcieńczeniach matrycy kontrolnej) oraz powtarzalności (przez powtórzenie dwukrotne każdego eksperymentu).

Poniżej przedstawiono warunki PCR (skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo - czasowy), dla których osiągnięto najlepsze wyniki optymalizacji.

4.3.1 Amplifikacja fragmentu genu kodującego białko 65 KDa

Detekcja oparta jest na amplifikacji fragmentu genu kodującego białko antygenowe *T. gondii* 65 KDa w dwóch kolejnych reakcjach przy użyciu tej samej pary starterów. Produkt pierwszej reakcji o wielkości 262 pz, o ile nie jest wykrywalny po przeprowadzeniu elektroforezy żelowej, poddaje się

reamplifikacji. Sekwencje starterów oraz warunki PCR zostały opracowane przez firmę DNA – Gdańsk II (Gdańsk). Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo czasowy PCR (Tabela 10) podano poniżej.

PCR Master mix:

25 μ l mieszaniny reakcyjnej zawiera: 2,5 μ l 10 x bufor do PCR DELTA, 2 mM $MgCl_2$, 0,2 mM każdego dNTP (Fermentas, Litwa), 0.25 μ M każdego startera, 1U polimerazy DNA (DELTA), 1 μ l matrycy DNA.

Tabela 10. Profil temperaturowo - czasowy PCR (gen 65 kDa):

etap PCR	temperatura [°C]	czas	liczba cykli	
			PCR I	PCR II
denaturacja wstępna	94	2 min	1	
denaturacja	94	30 s	35	30
przyłączenie starterów	64	1 min.		
wydłużanie produktów PCR	72	30 s		
wydłużanie końcowe	72	2 min.	1	

4.3.2 Amplifikacja fragmentu genu SAG2 *T. gondii*

Gen SAG2 koduje białko antygenowe SAG2 (p22) *T. gondii*. Jest to gen jednokopijny. Amplifikacji poddaje się fragment końca 3' oraz 5' genu, wykorzystując nested PCR. Krótkie fragmenty otrzymane w wyniku pierwszej reakcji wykorzystuje się jako matrycę w drugiej reakcji PCR. Końcowe produkty mają długość: 221 pz dla końca 3' i 241 pz dla końca 5'. Startery do reakcji zostały zaprojektowane przez Howe i wsp. (1997) (Tabela 11), skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo czasowy PCR (Tabela 12) podano poniżej.

Startery:Tabela 11. Sekwencje starterów specyficznych do fragmentów genu SAG2 *T. gondii*.

	startery zewnętrzne	startery wewnętrzne
koniec 5'	SAG2 F4 5'GCTACCTCGAACAGGAACAC3' SAG2 R4 5'GCATCAACAGTCTTCGTTGC 3'	SAG2 F 5'GAAATGTTTCAGGTTGCTGC 3' SAG2 R2 5'GCAAGAGCGAACTTGAACAC3'
koniec 3'	SAG2 F3 5'TCTGTTCTCCAAGTGA CTCC3' SAG2 R3 5'TCAAAGCGTGCATTATCGC 3'	SAG2 F2 5'ATTCTCATGCCTCCGCTTC 3' SAG2 R 5'AACGTTTCACGAAGGCACAC 3'

PCR Master mix:

25 µl mieszaniny reakcyjnej zawiera: 2.5 µl 10 x GeneAmp PCR Buffer II (Applied Biosystems, USA), 2 mM MgCl₂ (Applied Biosystems, USA), 0.2 mM każdego dNTP (Fermentas, Litwa), 0.4 µM każdego startera (DNA - Gdansk II, Polska), 1.25 U AmpliTaq Gold polymerase (Applied Biosystems, USA), 2 µl matrycy DNA.

Tabela 12. Profil temperaturowo - czasowy PCR (gen SAG2):

etap PCR	temperatura [°C]	Czas	liczba cykli	
			PCR I	PCR II
denaturacja wstępna	95	15 min	1	
denaturacja	94	30 s	35	35
przyłączenie starterów	60	30 s		
wydłużanie produktów PCR	72	30 s		
wydłużanie końcowe	72	7 min.	1	

4.3.3 Amplifikacja fragmentu genu B1 *T. gondii*

Gen B1 koduje jeden z antygenów *T. gondii*, którego rola nie została dotąd poznana. Gen B1 występuje w 35 kopiach w komórce pasożyta. Daje to większą szansę wykrycia pasożyta w badanej próbce, w porównaniu z użyciem genów jednokopijnych. Produkt PCR wynosi 194 pz [Burg i wsp.,1989]. Sekwencje starterów, skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy PCR (Tabela 13) podano poniżej.

Startery:

TOXO1: 5' GGA ACT GCA TCC GTT CAT GAG 3'

TOXO2 5' TCT TTA AAG CGT TCG TGG TC 3'

PCR Master mix:

25 µl mieszaniny reakcyjnej zawiera: 2.5 µl 10 x GeneAmp PCR Buffer II (Applied Biosystems, USA), 2,5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems, USA), 0.3 mM każdego dNTP (Fermentas, Litwa), 0.25 µM każdego startera (DNA - Gdansk II, Polska). 1,25 U AmpliTaq Gold polymerase (Applied Biosystems, USA), 3 µl matrycy DNA.

Tabela 13. Profil temperaturowo - czasowy PCR (gen B1):

etap PCR	temperatura [°C]	czas	liczba cykli
denaturacja wstępna	95	15 min	1
denaturacja	92	30 s	35
przyłączenie starterów	55	50 s	
wydłużanie produktów PCR	72	30 s	
wydłużanie końcowe	72	7 min.	1

4.3.4 Amplifikacja fragmentu genu REP 529 bp *T. gondii*

Gen REP, występujący w komórce pasożyta w 200 – 300 kopiach, koduje element repetytywny *T. gondii*. W pracy użyto starterów zaprojektowanych przez Cassaing S., i wsp. (2006), ograniczających odcinek DNA o długości 133 pz. Sekwencje starterów, skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki temperaturowo-czasowe PCR podano poniżej.

Startery:

TOXO F 5' AGG CGA GGG TGA GGA TGA 3'

TOXO R 5' TCG TCT CGT GGA TCG CAT 3'

PCR Master mix:

25 µl mieszaniny reakcyjnej składa się z: 2.5 µl 10 x GeneAmp PCR Buffer II (Applied Biosystems, USA), 2 mM MgCl₂ (Applied Biosystems, USA), 0.2 mM każdego z dNTP (Fermentas, Litwa), 0.25 µM każdego startera (DNA - Gdansk II, Polska), 0.5 U AmpliTaq Gold polymerase (Applied Biosystems, USA), 2 µl matrycy DNA.

Tabela 14. Profil temperaturowo - czasowy PCR (gen REP):

etap PCR	temperatura [°C]	czas	liczba cykli
			PCR I
denaturacja wstępna	95	15 min	1
denaturacja	95	5 s	35
przyłączanie starterów	60	10 s	
wydłużanie produktów PCR	72	15 s	
wydłużanie końcowe	72	10 min.	1

4. 4 WYBÓR METODY DO IDENTYFIKACJI PRÓB ZA POMOCĄ TECHNIKI REAL-TIME PCR

Real-time PCR (PCR w czasie rzeczywistym) wykorzystano w badaniach w celu określenia odsetka prób dodatnich i porównania skuteczności tej techniki w wykrywaniu DNA *T. gondii* ze standardową reakcją PCR oraz do określenia ładunku patogennej próby (liczbę oocyst *T. gondii* obecnych w badanej próbce środowiskowej) przy wykorzystaniu Real-time QPCR.

4.4.1 Konstrukcja standardu do badań Real-time PCR

Skonstruowano standard do przeprowadzenia Real-time QPCR (ilościowe badanie DNA) przez wklonowanie fragmentu genu B1 *T. gondii* do wektora plazmidowego. Klonowanie zostało wykonane w laboratorium firmy A&A Biotechnology (Gdynia).

Najpierw wykorzystując standardową reakcję PCR amplifikowano fragment genu B1 *T. gondii* o długości 129 pz (wykorzystując startery podane

w punkcie 4.4.2.2.2) w celu uzyskania fragmentu insertowego. Wektor pJET (Fermentas) trawiono enzymem restrykcyjnym EcoRV. Następnie wykonano reakcję ligacji wektora i insertu. Po wyselekcjonowaniu klonów wykonano izolację plazmidowego DNA. Tak przygotowany standard poddawano reakcji PCR i produkt amplifikacji sprawdzano na żelu agarozowym w celu zweryfikowania poprawności klonowania (sprawdzano wielkość amplifikowanego fragmentu, która powinna odpowiadać pożądanemu fragmentowi genu B1 *T. gondii*).

4.4.2 Porównanie specyficznego i niespecyficznego techniki Real-Time PCR

Porównano wykrywanie DNA *T. gondii* metodą niespecyficzną oraz specyficzną.

4.4.2.1 Niespecyficzny Real-time PCR

Wykorzystując kontrole dodatnie *T. gondii* przeprowadzono próby Real-time PCR z zastosowaniem niespecyficznego metody detekcji opartej na barwniku SYBR Green oraz starterów flankujących gen B1 *T. gondii* zaprojektowane przez Burg i wsp. (1989). Zoptymalizowano warunki reakcji. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki czasowo-temperaturowe Real-time PCR (Tabela 15) przedstawiono poniżej. Reakcje przeprowadzono wykonując dla każdego eksperymentu krzywą topnienia w celu kontroli próby niespecyficznymi produktami reakcji.

Real-time PCR Master Mix:

Mieszanina reakcyjna zawierała: 10 µl 2 x Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene, USA), 200 nM każdego ze starterów oraz 2 µl matrycy DNA w 25 µl objętości.

Tabela 15. Profil temperaturowo – czasowy Real-time PCR (gen B1, detekcja niespecyficzna):

etap reakcji		temperatura [°C]	czas	liczba cykli
denaturacja wstępna		95	10 min.	1
amplifikacja	denaturacja	92	30 s	40
	przyłączanie starterów	55	50 s	
	wydłużanie produktów PCR	72	30 s	
krzywa topnienia	denaturacja	92	30 s	1
	przyłączanie starterów	55	50 s	
	wydłużanie końcowe	72	30 s	

4.4.2.2 Real-time PCR z zastosowaniem sond molekularnych

Wykorzystując kontrole dodatnie *T. gondii* przeprowadzono próby Real-time PCR z zastosowaniem specyficznej metody detekcji opartej na sondach molekularnych typu TaqMan. Zoptymalizowano warunki reakcji dla dwóch wybranych układów.

Dobór warunków polegał na dobraniu optymalnego stężenia sondy oraz starterów. Poniżej podano warunki reakcji, dla których osiągnięto najlepsze rezultaty.

4.4.2.2.1 Układ I

Pierwszy układ opracowany przez Mei-Hui Lin i wsp. (2000) wykrywa fragment genu B1 *T. gondii* o długości 98 pz (lokalizacja na genie B1 41 – 169 pz). Sekwencje starterów i sondy oraz skład mieszaniny reakcyjnej i profil temperaturowo-czasowy reakcji (Tabela 16) podano poniżej.

Startery:

5' TCCCCTCTGCTGGCGAAAAGT 3'

5' AGCGTTCGTGGTCAACTATCGATTG 3'

Sonda:

FAM 5' TCTGTGCAACTTTGGTGTATTCGCAG 3' TAMRA

Real-time PCR Master mix:

25 µl mieszaniny reakcyjnej zawiera: 12,5 µl 2 x Brilliant II QPCR Master Mix (Stratagene), 0,5 µM każdego ze starterów, 80 nM sondy TaqMan, 2 µl matrycy DNA.

Tabela 16. Profil temperaturowo – czasowy Real-tiem PCR (gen B1, układ I, detekcja specyficzna):

etap reakcji	temperatura [°C]	czas	ilość cykli
denaturacja wstępna	95	10 min.	1
denaturacja	95	15 s	40
hybrydyzacja starterów /wydłużanie produktu	60	1 min.	

4.4.2.2 Układ II

Układ ten został zaprojektowany przez Arkush i wsp. (2003) do wykrywania fragmentu genu B1 *T. gondii* o długości 129 pz (pozycja na genie B1 694 – 886 pz). Sekwencje starterów i sondy oraz skład mieszaniny reakcyjnej i profil temperaturowo-czasowy reakcji (Tabela 17) podano poniżej.

Startery:

5' TCGAAGCTGAGATGCTCAAAGTC 3'

5' AATCCACGTCTGGGAAGAACTC 3'

Sonda:

FAM 5' ACCGCGAGATGCACCCGCA 3' TAMRA

Real-time Master mix:

25 µl mieszaniny reakcyjnej zawiera: 12,5 µl 2 x Brilliant II QPCR Master Mix (Stratagene), 400 nM każdego ze starterów, 80 nM sondy TaqMan, 2 µl matrycy DNA.

Tabela 17. Profil temperaturowo - czasowy Real-tiem PCR (gen B1, układ II, detekcja specyficzna):

Etap reakcji	temperatura [°C]	czas	ilość cykli
denaturacja wstępna	95	10 min.	1
denaturacja	95	15 s	40
hybrydyzacja/wydłużanie	60	1 min.	

4. 5 PORÓWNANIE GRANICY DETEKCJI PCR I REAL-TIME PCR

Wykorzystując standard Real-time PCR (4.4.1) porównano granice detekcji PCR oraz Real-time PCR.

Określono stężenie DNA standardu w [ng/μl] za pomocą spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), postępując według instrukcji podanych przez producenta. Następnie wyznaczono liczbę kopii DNA korzystając z programu: „Calculator for determining the number of copies of a template” (URI Genomics & Sequencing Center).

Następnie przygotowano serię dziesięciokrotnych rozcieńczeń standardu w zakresie: 5×10^8 – 0,5 kopii DNA przypadającej na jeden μl próby. Wykonano Real-time PCR wykorzystując Układ II (4.4.2.2.2) oraz PCR (4.3.3) specyficzny dla genu B1 *T. gondii*.

4. 6 IZOLACJA DNA Z OOCYST *T. GONDII*

Do przeprowadzenia testów użyto sporulujące oocysty *Toxoplasma gondii* (szczep PRU) otrzymane w ramach współpracy od profesor Marie-Laure Darde z Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Limoges, Francja. Zawiesinę oocyst *T. gondii* w 2 % H₂SO₄ o stężeniu 1500 oocyst / μl przechowywano w temperaturze 4°C.

4.6.1 Porównanie skuteczności komercyjnych zestawów do izolacji DNA

Przetestowano trzy metody izolacji DNA z oocyst *T. gondii* pod kątem czułości i powtarzalności wyników. W tym celu przygotowano zawiesiny: 10^4 , 10^3 , 10^2 i 10 oocyst *T. gondii* w 0,5 ml wody jałowej. Każde rozcieńczenie wykonano w „tripleksie”. Otrzymane po izolacji matryce DNA były poddawane PCR z zastosowaniem starterów flankujących fragment genu B1 *T. gondii* (4.3.3).

4.6.1.1 Izolacja DNA przy użyciu instrumentu FastPrep 120

Jest to metoda łącząca mechaniczne rozdrabnianie komórek i chemiczną ekstrakcję DNA. Używany jest zestaw odczynników Fast DNA Spin kit (For Soil) (Qbiogene) oraz urządzenie Fast Prep 120 (BIO 101 Savant). Badany materiał umieszczany jest w specjalnych probówkach zawierających Lysing Matrix

(mieszanka ceramicznych i silikonowych cząstek) oraz bufor lizujący. Podczas wytrząsania próbek w urządzeniu FastPrep następuje mechaniczna homogenizacja materiału i liza komórek. Następnie próbki są wirowane w celu oddzielenia zanieczyszczeń od DNA.

Do próbki MultiMix2 dodawano 0,5 ml wodnej zawiesiny oocyst *T. gondii* oraz 400 µl buforu CLS – VF, 200 µl buforu PPS oraz 20 µl 10 % roztworu PVP. Dokładnie zakręcano próbkę i wytrząsano w urządzeniu Fast Prep przez 10 s przy amplitudzie 5, 5. Następnie próbkę wirowano 5 min. przy 12 tyś. obr./min. Supernatant przenoszono do czystej 1,5 ml próbki Eppendorfa i dodawano 600 µl zawiesiny Binding Matrix. Całość delikatnie mieszano przez odwracanie próbki i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 min., a następnie wirowano przez 1 min. przy 12 tyś. obr./min. Supernatant odrzucano, a do osadu dodawano 500 µl SEWS – M i rozprowadzano przez pipetowanie. Próbki wirowano 1 min. przy 12 tyś. obr./min., usuwano supernatant i odwirowywano ponownie przez 10 s przy 12 tyś. obr./min. Usuwano nadmiar SEWS – M. Do próbki dodawano 100 µl DES, mieszano przez pipetowanie i inkubowano 3 min. w temperaturze pokojowej. Następnie próbkę wirowano 2 min. przy 12 tyś. obr./min. Supernatant, w którym znajduje się DNA przenoszono do nowej 1,5 ml próbki Eppendorfa. DNA oczyszczano następnie używając zestawu firmy A&A Biotechnology w następujący sposób. Do próbki dodawano 400 µl roztworu G, wortexowano i całość nanoszono na minikolumnę do oczyszczania DNA. Wirowano przez 30 s przy 12 tyś. obr./min. Przesącz usuwano, a do kolumny dodawano 600 µl buforu A1 i wirowano przez 30 s przy 12 tyś. obr./min. Przesącz odrzucano, a do kolumny dodawano 300 µl A1. Wirowano przez 2 min. przy 12 tyś. obr./min. Następnie kolumnę przenoszono do nowej 1,5 ml próbki Eppendorfa. Złóże na dnie kolumny pokrywano 30 µl TE i inkubowano przez 3 min. w temperaturze pokojowej. Na koniec wirowano kolumnę przez 1 min. przy 12 tyś. obr./min. Otrzymane w ten sposób DNA przechowywano w temperaturze – 20°C do wykonania PCR.

4.6.1.2 Izolacja DNA metodą Boom 'a

W metodzie tej próbę badaną inkubuje się wstępnie z Proteinazą K i następnie z buforem lizującym w celu uwolnienia treści komórek i degradacji białek. Do wychwytywania kwasów nukleinowych wykorzystuje się silikonowe cząstki magnetyczne (silika). DNA związane na powierzchni cząstek jest oddzielane od reszty zanieczyszczeń w polu magnetycznym. Zanieczyszczenia są usuwane za pomocą buforów płuczających. Oczyszczone DNA uwalniane jest z silikonowych cząstek pod wpływem temperatury (60°C) i buforu elucyjnego. Do ekstrakcji DNA używa się zestawu NucliSENS miniMAG (BioMerieux), w którego skład wchodzi odczynnik do izolacji DNA oraz panel magnetyczny.

Do 1,5 ml próbówki Eppendorfa zawierającej 0,5 ml wodnej zawiesiny oocyst *T. gondii* dodawano proteinazę K (1 : 1) i inkubowano 30 min. w temperaturze 50°C. Następnie przenoszono zawiesinę do próbówki z buforem lizującym i krótko worteksowano. Inkubowano całość 10 min. w temperaturze pokojowej i lekko mieszano. Następnie dodawano 50 µl siliki (worteksowanej) i delikatnie mieszano. Inkubowano całość 10 min. w temperaturze pokojowej, po czym wirowano przez 2 min przy 4000 obr/min. Ostrożnie odciągano supernatant, a do osadu dodawano 400 µl Wash Buffer 1 (nie mieszano). Przenoszono zawiesinę do czystej próbówki dołączonej do zestawu, którą następnie umieszczano w polu magnetycznym (przy podniesionym panelu magnetycznym). Po 30 s ostrożnie odciągano supernatant, tak aby nie pobrać siliki. Następnie opuszczano panel magnetyczny i do próbówki dodawano 400 µl Wash Buffer 1. Ponownie włączano pole magnetyczne na 30 s. Po odciągnięciu supernatantu i opuszczeniu panelu magnetycznego do próbówki dodawano 500 µl Wash Buffer 2 i włączano pole magnetyczne na 30 s. Po odciągnięciu supernatantu (przy opuszczonym panelu magnetycznym) powtarzano płukanie Wash Buffer 2. Następnie do próbówki dodawano Wash Buffer 3, włączano pole magnetyczne na 15 s po czym opuszczano panel magnetyczny i odciągano supernatant. Do próbówki dodawano 100 µl buforu elucyjnego, worteksowano i inkubowano przez 5 min. w 60°C. Na koniec umieszczano próbówkę w statywie magnetycznym i przy uruchomionym polu magnetycznym

przenoszono eluat do czystej 1,5 ml probówki Eppendorfa. Uzyskane DNA przechowywano w temperaturze – 20°C do czasu wykonania PCR.

4.6.1.3 Izolacja DNA na minikolumnach ze złożem krzemionkowym

Metoda wykorzystuje zdolność wiązania się DNA do złoża krzemionkowego przy dużym stężeniu soli chaotropowych. Materiał badany poddawany jest najpierw działaniu buforu lizującego (zawiera sole chaotropowe i detergenty niejonowe) oraz Proteiny K w celu lizy komórek i degradacji białek. Następnie mieszanina nanoszona jest na minikolumnę ze złożem krzemionkowym, na którym osiada DNA. Po wypłukaniu zanieczyszczeń, oczyszczone DNA wymywa się z kolumny wodą lub niskojonowym buforem. W badaniach używano zestawu do izolacji DNA Genomic Mini (A&A Biotechnology, Gdynia). Ekstrakcję DNA wykonywano zgodnie z instrukcją producenta.

Do probówki Eppendorfa 1,5 ml zawierającej 0,5 ml wodnej zawiesiny oocyst *T. gondii* dodawano 100 µl buforu Tris, 50 µl buforu lizującego LT i 20 µl roztworu Proteiny K. Całość worteksowano i inkubowano przez 1 godzinę w 50°C. Następnie do probówki dodawano 150 µl buforu LT i intensywnie worteksowano przez 20 s. i wirowano przez 3 min. przy 15 tyś. obr/min. Supernatant nanoszono na minikolumnę do oczyszczania genomowego DNA i wirowano przez 1 min. przy 15 tyś. obr/min. Przesącz odrzucano, a do kolumny dodawano 500 µl roztworu płuczającego A1. Po odwirowaniu probówki przez 1 min. przy 15 tyś. obr/min. przesącz odrzucano, a do kolumny dodawano 400 µl roztworu płuczającego A1. Wirowano całość przez 2 min. przy 15 tyś. obr/min. Osuszoną minikolumnę umieszczano w nowej 1,5 ml probówce Eppendorfa i do złoża na dnie kolumny dodawano 200 µl buforu Tris ogrzanego do 75°C. Inkubowano całość przez 5 min. w temperaturze pokojowej i następnie wirowano przez 1 min. przy 15 tyś. obr/min. Minikolumnę usuwano, a oczyszczone DNA znajdujące się w probówce przechowywano w -20°C.

Po wyizolowaniu DNA trzema wyżej opisanymi metodami wykonano PCR wykorzystując startery TOX1 i TOX2 flankujące gen B1 *T. gondii* (4.3.3). Produkty reakcji poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu w 2% żelu

agarozowym (4.11.3) i odczytywano w świetle UV w systemie GelDoc-It (Imagine Systems, USA).

4.6.2 Wstępna dezintegracja oocyst *T. gondii*

Aby podnieść czułość izolacji DNA za pomocą zestawu komercyjnego i powtarzalność wyników dopracowano metodę izolacji DNA dodając i modyfikując etapy niezbędne do uwolnienia pasożytów z oocyst.

W etapach poprzedzających izolację DNA wykorzystano następujące odczynniki i materiały:

- bufor lizujący (L1): 100 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS lub 2,5% Tween 20. SDS (dodecylosiarczan sodu) ma silne właściwości denaturujące, jednak działa hamująco na PCR oddziałując z polimerazą DNA. Należy go całkowicie usunąć z próby przed wykonaniem PCR. Tween 20 jest detergentem niejonowym, który nie wpływa hamująco na PCR.
- Proteinaza K: silna proteaza degradująca białka. Wzmacnia efekt lizy komórek. Przed wykonaniem PCR należy się jej bezwzględnie pozbyć z próby, gdyż może degradować polimerazę DNA (jest inhibitorem PCR). Dezaktywuje się ją przez inkubację w 95^oC.
- kuleczki cyrkonowe o średnicy 1 mm (BioSpec Products Inc., kat: 1107911Dz)
- Probówki typu Lysing Matrix E/K (BIO 101 Systems, CA)

Na poszczególnych etapach optymalizowano stężenia używanych odczynników (L1, Proteinaza K), czas wystawienia oocyst na ich działanie, liczbę cykli szoku termicznego, długość wytrząsania i amplitudę drgań. Ostateczna procedura opisana jest poniżej.

Do probówek typu Lysing Matrix dodawano 1 g kuleczek cyrkonowych oraz 300 µl buforu L1 i 200 – 300 µl badanej zawiesiny. Całość wytrząsano w urządzeniu FastPrep 120 przez 2 min. przy amplitudzie 6,5. Następnie

próbki inkubowano przez 10 min. w lodzie. Ponownie próbki wytrząsano przez 2 min. w urządzeniu FastPrep 120 i umieszczano w lodzie na 10 min. Następnie do mieszaniny dodawano 400 μ l chloroformu i wirowano przez 1 min. przy 12 tyś. obr/min. (warstwa chloroformowa wyraźnie się oddziela). Supernatant przenoszono do nowej 1,5 ml próbki Eppendorfa (w razie zmętnienia próby supernatant ponownie odwirowywano). Następnie dodawano octanu potasu (5 objętości) w celu precypitacji SDS i wirowano przez 1 min. przy 12 tyś. obr/min (w przypadku użycia Tween 20 jako detergentu w buforze L1 ten etap należy pominąć). Do supernatantu (przeniesionego do nowej 1,5 ml próbki Eppendorfa) dodawano 20 μ l roztworu Proteinazy K i inkubowano przez 1 godzinę w 50°C. Po czym nanoszono na kolumnę zestawu do izolacji DNA Genomic Mini (A&A Biotechnology, Gdynia). Dalej postępowano zgodnie z protokołem izolacji DNA podanym przez tego producenta. Otrzymane DNA przechowywano w temperaturze -20°C do czasu wykonania PCR.

4.6.3 Porównanie skuteczności detergentów SDS i Tween 20 w izolacji

DNA z oocyst *T. gondii*

Skuteczność izolacji DNA z oocyst *T. gondii* porównano za pomocą zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology, Gdynia) bez dodawania etapów wstępnej dezintegracji oocyst oraz z zastosowaniem tych etapów w dwóch wariantach – z wykorzystaniem SDS oraz Tween 20.

Przygotowano rozcieńczenia oocyst *T. gondii* w jałowej wodzie destylowanej w liczbie: 10⁴, 10³, 10² i 10 oocyst w trzech seriach (każda próba z określoną liczbą oocyst przygotowana była w tripleksie, tak aby sprawdzić powtarzalność wyników). Każda seria testowana była w innych warunkach:

1 seria: izolacja DNA zestawem Genomic Mini (A&A Biotechnology, Gdynia) bez wstępnych etapów dezintegracji oocyst;

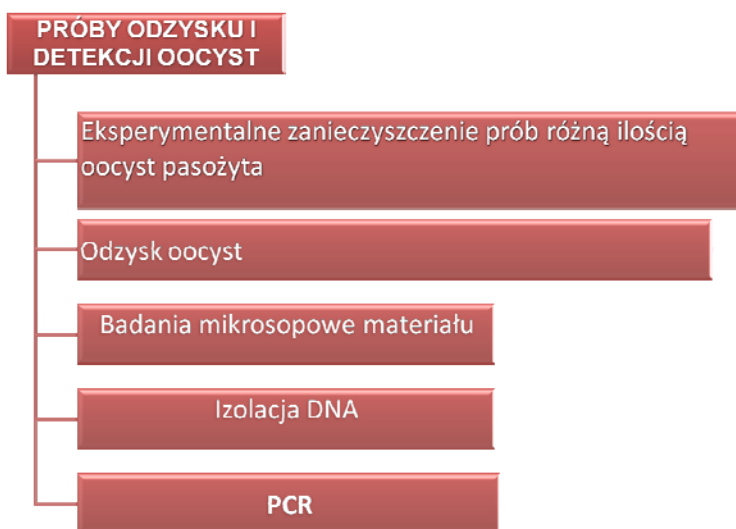
2 seria: izolacja zestawem Genomic Mini (A&A Biotechnology, Gdynia) z etapami wstępnej dezintegracji oocyst z użyciem SDS jako detergentu;

3 seria: izolacja zestawem Genomic Mini (A&A Biotechnology, Gdynia) z etapami wstępnej dezintegracji oocyst z użyciem Tween 20 jako detergentu.

Wyizolowane DNA poddano reakcji PCR (4.3.3) oraz Real-time PCR (4.4.2.2.2) z zastosowaniem starterów specyficznych do genu B1 *T. gondii*.

4.7 PRÓBY ODZYSKOWE OOCYST *T. GONDII* Z MATERIAŁU ŚRODOWISKOWEGO

W początkowym etapie badań w celu określenia skuteczności przyjętych metod badawczych w wykrywaniu oocyst *T. gondii* z prób środowiskowych przeprowadzono próby odzyskowe. Do tego celu użyto zawiesiny sporulujących oocyst *T. gondii* (szczep PRU, genotyp II) w 2 % H₂SO₄. Postępowano wg schematu przedstawionego na Rycinie 7. Próby środowiskowe zanieczyszczono eksperymentalnie różną, znaną liczbą oocyst pasożyta: 10⁴, 10³, 10², 10. Próby odzyskowe badano za pomocą metod mikroskopowych oraz molekularnych. Aby porównać ich skuteczność w wykrywaniu pasożyta *T. gondii* w próbach środowiskowych, przygotowywano po dwie serie prób środowiskowych, które poddawano odpowiednim procedurom odzysku oocyst. Następnie jedną serię odzyskanych oocyst badano metodami mikroskopowymi (4.7.1), a drugą serię badano wykrywając DNA pasożyta metodą PCR (4.3.3) i Real-time PCR (4.4.2.2.2).



Rycina 7. Ogólny schemat eksperymentalnego odzysku i detekcji oocyst *T. gondii* z prób środowiskowych.

4. 7.1 Metody mikroskopowe użyte do wykrywania oocyst *T. gondii* z prób odzyskowych oraz badania prób środowiskowych

4.7.1.1 Wykonanie preparatu świeżego

Świeży preparat mikroskopowy wykonywano nanosząc kroplę badanej zawiesiny na szkiełko podstawowe i przykrywając szkiełkiem nakrywkowym. Preparat oglądano pod mikroskopem świetlnym (Opta-Tech, Mn-358), stosując powiększenie obiektywu 40 razy. W preparacie dodatnim można zaobserwować oocysty *T. gondii* o charakterystycznym kształcie i obecnych wewnątrz sporocyst sporozoitach.

4.7.1.2 Wykonanie preparatu barwionego metodą Ziehl-Neelsen'a (zmodyfikowane wg Henriksena - Pohlenza)

Kroplę badanej zawiesiny umieszczano na szkiełku podstawowym i suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej. Następnie preparat utrwalano w alkoholu metylowym przez 5 min. Po wyschnięciu, preparat umieszczano w naczyniu z fuksyną karbolową na 1 godzinę. Zabarwiony preparat przepłukiwano wodą wodociągową i następnie odbarwiano w 4% H₂SO₄ przez 20 s. Po przepłukaniu wodą wodociągową preparat wstawiano na 7 min. do naczynia z roztworem zieleni malachitowej. Ponownie przepłukiwano wodą wodociągową i suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej. W celu zabezpieczenia preparatu pokrywano go Euparalem i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Gotowy preparat oglądano pod mikroskopem świetlnym (Opta-Tech, Mn-358) stosując obiektyw imersyjny (powiększenie 100 razy). W preparacie dodatnim widać na zielono-niebieskim tle zabarwione oocysty *T. gondii* na kolor od różowo-czerwonego do purpurowego.

4.7.1.3 Wykonanie preparatu mikroskopowego do badania autofluorescencji oocyst *T. gondii*

Na szkiełko do fluorescencji (z 10 studzienkami) nanoszono kroplę badanej zawiesiny (5 – 10 µl) i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Niezwłocznie po wykonaniu preparatu oglądano go pod mikroskopem fluorescencyjnym (ZEISS, Imager D1, Niemcy) wyposażonym w filtr

przepuszczający wiązkę światła o długości 330 - 385 nm. W preparacie dodatnim widoczne są oocysty *T. gondii*, których ściana świeci niebieskozielonym światłem.

4.7.2 Próby odzyskowe oocyst *T. gondii* z piasku

Piasek do przeprowadzenia próby eksperymentalnej pobrano z wydm nadmorskich (Rewa), aby zminimalizować możliwość przypadkowej kontaminacji przez zwierzęta kotowate.

Przygotowano dwie serie po cztery próby piasku (po 40 g), które zanieczyszczono różną liczbą oocyst *T. gondii*: 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10. Materiał odzyskiwano według metody opisanej w punkcie 4.9.1. Materiał uzyskany z pierwszej serii prób oglądano najpierw pod mikroskopem świetlnym przy czterdziestokrotnym powiększeniu obiektu, a następnie badano zjawisko autofluorescencji pod mikroskopem fluorescencyjnym. W przypadku drugiej serii prób detekcję oocyst *T. gondii* wykonywano za pomocą metod molekularnych (PCR).

4.7.3 Próby odzyskowe oocyst *T. gondii* z warzyw i owoców

Do wykonania próby odzysku oocyst *T. gondii* przygotowano próby rzodkiewek oraz truskawek (dwie serie po 4 próby) zakupionych w sklepie. Najpierw próby zostały wstępnie wypłukane w wodzie destylowanej (aby zminimalizować możliwość przypadkowej kontaminacji pasożytem *T. gondii*) i następnie umieszczane w 3 L szklanych słojach. Próby warzyw/owoców zanieczyszczano następnie oocystami pasożyta dodając odpowiednio 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 oocyst. Dalej postępowano zgodnie z procedurą odzysku podaną w punkcie 4.9.2. Osad uzyskany z pierwszej serii prób poddano badaniom mikroskopowym. Wykonano preparaty barwione wg Ziehl-Neelsena oraz badano autofluorescencję oocyst w mikroskopie fluorescencyjnym. Osad uzyskany z drugiej serii prób zawieszono w wodzie jałowej i następnie wykonano badania molekularne.

4.7.4 Próby odzyskowe oocyst *T. gondii* z filtrów żelatynowych do pobierania powietrza

Przygotowano dwie serie po 4 filtry żelatynowe. Na filtry kapano określoną liczbą oocyst *T. gondii*: 10^4 , 10^3 , 10^2 i 10 i wykonywano procedurę odzysku opisaną w punkcie 4.9.4. Następnie materiał uzyskany z pierwszej serii prób poddano badaniom mikroskopowym (wykonano preparat świeży, preparat barwiony oraz badanie autofluorescencji), a z drugiej serii prób badaniom molekularnym.

4.7.5 Próby odzyskowe oocyst *T. gondii* z wody

Odzysk oocyst *T. gondii* za pomocą IMS przeprowadzono na 10 L próbach wody destylowanej, wodociągowej oraz powierzchniowej. Najpierw przygotowano dwie serie po 4 próby wody destylowanej, które zanieczyszczono określoną liczbą oocyst *T. gondii*: 10^4 , 10^3 , 10^2 i 10. Próby poddano następnie filtracji oraz immunomagnetycznej separacji zgodnie z procedurą podaną w punkcie 4.9.3. Zawiesiny osadów uzyskanych z pierwszej serii prób poddano badaniom mikroskopowym (preparat mikroskopowy świeży, preparat barwiony według Ziehl–Neelsena oraz badanie autofluorescencji), a z drugiej serii badaniom molekularnym.

Próby odzyskowe oocyst *T. gondii* z wody wodociągowej i powierzchniowej badano tylko metodami molekularnymi. Woda powierzchniowa pochodziła z Kanału Elbląskiego (województwo warmińsko-mazurskie) z miejsca oddalonego od terenów zamieszkałych.

4.8 STRATEGIA POBIERANIA PRÓB ŚRODOWISKOWYCH

4.8.1 Pobieranie prób ziemi

300 g piachu (gleby) pobierano do jednorazowych woreczków foliowych z powierzchniowej warstwy gruntu (2 - 5 cm głębokości). Następnie suszono dwa dni w temperaturze pokojowej i przesiewano przez sitko o wielkości oczek 2 mm, aby oddzielić większe zanieczyszczenia [Mizgajska-Wiktor, 2005]. Z tak przygotowanego materiału do dalszych badań pobierano 40 g piasku (gleby).

4.8.2 Pobieranie prób warzyw i owoców

Warzywa i owoce kupowane w sklepach lub na targowiskach, a także pobierane z ogródków przydomowych pakowano do oddzielnych, jednorazowych woreczków foliowych i przenoszono do laboratorium, gdzie niezwłocznie poddawano je procedurze odzysku oocyst *T. gondii*.

4.8.3 Pobieranie prób powietrza

Próby powietrza pobierano na specjalne sterylne membranowe filtry żelatynowe (Sartorius AG, Germany) (Rycina 8 B) o średnicy porów 3 μm , za pomocą przenośnego urządzenia AirPortMD8 (Sartorius) (Rycina 8 A). Po założeniu filtra na adapterze, urządzenie ustawiane było około 30 cm nad ziemią w wybranym punkcie. Następnie ustawiano parametry urządzenia: wielkość próby 1000 L, przepływ powietrza 30 L/min, czas filtracji 30 min. Po zakończeniu procesu, filtr żelowy umieszczano w jednorazowym woreczku i przewożono do laboratorium. Zwracano uwagę, aby przed pobieraniem próby panowała co najmniej kilka dni bezdeszczowa pogoda, tak, by powierzchniowa warstwa gruntu była sucha i mogła się unosić przy lekkim ruchu powietrza.



Rycina 8. Zestaw do pobierania prób powietrza. A) AirPortMD8 (Sartorius), B) Filtry żelowe (Sartorius AG, Germany).

4.8.4 Pobieranie prób wody

Większość prób wody środowiskowej pobierano do pojemników polietylenowych o pojemności 10 L i przewożono do laboratorium, gdzie poddawano dalszej obróbce. Wodę z kąpielisk pobierano w odległości około 1 - 3 m od brzegu. Wodę ze studni odkrytych pobierano przez zanurzenie zbiornika w studni (głębokość studni wynosiła około 5 – 7 m). Wodę ze studni głębinowych pompowano bezpośrednio do zbiornika. Studnie odkryte znajdowały się na terenie gospodarstw wiejskich, a studnie głębinowe na działkach rekreacyjnych. W celu wstępnego usunięcia większych zanieczyszczeń (np. liści itp.) wodę przepuszczano przez sitko o średnicy oczek około 1 mm.

Próby wody wodociągowej z kranu o objętości 50 L filtrowano na miejscu za pomocą przenośnego sprzętu i filtrów membranowych (4.9.3.1) (Rycina 15), które przewożono następnie do laboratorium i przechowywano w temperaturze 4 °C do czasu dalszych analiz. Część prób wody pobieranych z kąpielisk także filtrowano na miejscu.

4.9 METODY ODZYSKIWANIA OOCYST *T. GONDII* Z PRÓB ŚRODOWISKOWYCH

4.9.1 Odzyskiwanie oocyst *T. gondii* z prób ziemi

Do odzyskiwania oocyst *T. gondii* z prób ziemi zastosowano metodę flotacji z nasyconym roztworem NaNO_3 (gęstość 1,282 g/cm³), którą stosowano do odzysku jaj *Toxocara* (Mizgajska-Wiktor, 2005). Do próby ziemi (40 g) umieszczonej w szklanym naczyniu dodawano 100 ml 5% NaOH i delikatnie wytrząsano na automatycznej wytrząsarce wahadłowej przez 20 min. Następnie przelewano zawartość naczynia (gwałtownym ruchem) do probówek wirowniczych o pojemności 100 ml i wirowano 3 min. przy 200 x g. Supernatant usuwano, a powstały osad przemywano wodą destylowaną i wirowano 3 min. przy 200 x g. Osad zawieszano w nasyconym roztworze NaNO_3 i wirowano 3 min. przy 200 x g. Następnie do probówek dodawano za pomocą pipety nasycony roztwór NaNO_3 do momentu uzyskania menisku wypukłego. Powierzchnię menisku przykrywano szkiełkiem nakrywkowym i pozostawiano

na 15 min. tak, aby oocysty znajdujące się w próbce mogły przywrzeć do jego powierzchni. Szkiełko dokładnie spłukiwano wodą destylowaną i materiał przechowywano do dalszych badań w 1,5 ml probówce Eppendorfa w 4°C.

4.9.2 Odzyskiwanie oocyst *T. gondii* z prób warzyw i owoców

W celu odzyskiwania oocyst *T. gondii* z prób warzyw i owoców zastosowano metodę flokulacji z węglanem wapnia (Vessey i wsp., 1993). Próbę warzyw bądź owoców umieszczano w szklanym słoju o pojemności 3 L i dodawano 2 L wody destylowanej oraz dodawano 20 ml Tween 20. Zawartość słoja mieszano przez odwracanie naczynia, a następnie wytrząsano na wytrząsarce horyzontalnej przez 2 godziny. Po tym czasie wyjmowano warzywa/owoce, a do popłuczyn dodawano 20 ml 1 M roztworu CaCl_2 oraz 20 ml 1M roztworu NaHCO_3 i dokładnie mieszano przez kilkukrotne odwracanie słoja. Mieszaninę doprowadzano do pH 10 za pomocą 1M roztworu NaOH, a następnie pozostawiano na noc (bez wytrząsania). Następnego dnia odciągano supernatant za pomocą automatycznego pipetora (Hirschmann Laborgerate). Do powstałego osadu dodawano 200 ml 10% roztworu $\text{NH}_3\text{O}_3\text{S}$ (kwasu sulfamidowego), powodującego rozluźnienie osadu (przez lizę osadu węglanu wapnia). Powstałą zawiesinę przelewano do probówek wirowniczych (konikalnych) o pojemności 200 ml. Słój płukano 20 ml 0,01 % roztworem Tween 80 (detergent) i popłuczyny dolewano do probówek wirowniczych. Następnie całość odwirowywano przez 10 min. przy 1700 x g w temperaturze 4°C. Po usunięciu supernatantu osad rozprowadzano w minimalnej objętości 0,01 % roztworu Tween 80. Osady (z 2 probówek konikalnych) zlewano do jednej probówki typu Falcon o objętości 50 ml. Ponownie przepłukiwano probówki wirownicze 0,01 % roztworem Tween 80 i dolewano do probówki typu Falcon, po czym całość dopełniano wodą destylowaną do objętości 50 ml. Po dokładnym wymieszaniu wirowano 10 min. przy 2500 x g w 4°C. Supernatant usuwano i odnotowywano objętość osadu. Do probówki dodawano podwójną objętość wody destylowanej. Zawiesinę umieszczano w 1,5 ml probówkach Eppendorfa i przechowywano w temperaturze 4 °C do dalszych badań.

4.9.3 Odzyskiwanie oocyst *T. gondii* z prób wody

Metoda odzysku oocyst *T. gondii* z wody opiera się na metodzie immunomagnetycznej separacji rozwiniętej w laboratorium Uniwersytetu w Limoges we Francji przez zespół profesor Marie-Laure Dardé (2007).

4.9.3.1 Filtracja próby wody

Próby wody filtrowano za pomocą zestawu (Rycina 9), w skład którego wchodzi: membranowy filtr kapsułkowy Envirochek 1,0 μM (PALL Gelman Laboratory, USA), wąż igielitowy doprowadzający i odprowadzający wodę z filtra oraz łączący wszystkie elementy, głowica pompy perystaltycznej Masterflex[®] L/S[®] Easy-Load[®] II umieszczonej na uchwycie wiertarki akumulatorowej (DEWALT typ 10, DC 980), akumulatory (DEWALT DE 9075XJ01), przepływomierz (PTFE 1-800-866-3837, AALBORG, USA) mierzący objętość i przepływ chwilowy wody, manometr, statyw podtrzymujący pompę oraz statyw do umocowania filtra.



Rycina 9. Zestaw do filtrowania wody: A) 10 L pojemnik polietylenowy na wodę, B) wąż igielitowy, C) głowica pompy perystaltycznej D) przenośna wiertarka akumulatorowa DEWALT, E) statyw na pompę, F) statyw do umocowania filtra i przepływomierza, G) przepływomierz, H) manometr I) filtr kapsułkowy Envirochek

Wodę filtrowano przy użyciu membranowych filtrów kapsułowych Envirochek (Pall Gelman Laboratory, USA) wg metody 1623 US EPA (United States Environmental Protection Agency). W zależności od objętości badanej próby stosowano dwa rodzaje filtrów: Envirochek (nr kat., 12110) do małej pojemności (10 L) w przypadku prób wody pochodzącej z kąpielisk i studni oraz Envirochek HV (nr kat., 12099) do większej pojemności (50 L) w przypadku prób wody wodociągowej. Podczas filtracji utrzymywano stałą szybkość przepływu wody 0,7 L/min. Pod koniec procesu, gdy w pojemniku znajdowało się około 500 ml wody, dodawano 200 ml buforu PET [0,01 % Tween 80, 0,02% pirofosforan sodu, 0,03% EDTA], przepłukiwano ścianki pojemnika i kontynuowano filtrację. Każda próba wody filtrowana była przy zmianie węża na odcinku doprowadzającym badaną wodę do filtra, w celu uniknięcia kontaminacji i wyników fałszywie pozytywnych. Po zakończonej filtracji wypełniano filtr 100 ml buforu PET i pozostawiano w pozycji pionowej przez 15 min. Następnie odwracano filtr do góry dnem i pozostawiano w tej pozycji ponownie na 15 min. Następnie zlewano pierwszą frakcję do probówki wirowniczej (konikalnej) o pojemności 225 ml. Filtr napełniano ponownie 100 ml buforu PET i wytrząsano w pozycji horyzontalnej przez 15 min. na wytrząsarce (CAT S-50, Niemcy) (Rycina10) przy wysokich wstrząsach. Po czym obracano filtr o 180° i ponownie wytrząsano przez 15 min. Zawartość filtra (drugą frakcję) dolewano do probówki wirowniczej. Całość mocno worteksomano i następnie wirowano przez 30 min. w 4°C przy 1250 x g (bez hamowania) w wirówce z chłodzeniem (HERMLE Z383K, LABOR TECHNIK, Niemcy). Supernatant usuwano, a osad ($\leq 0,25$ ml) zawieszano w 2 ml chłodnego buforu do inkubacji PBS [1% BSA, 0,05 % Tween 20] (jeżeli pelet jest większy np. 0,5 ml to rozpuszczano go w 4 ml PBS i dzielono na dwie probówki).



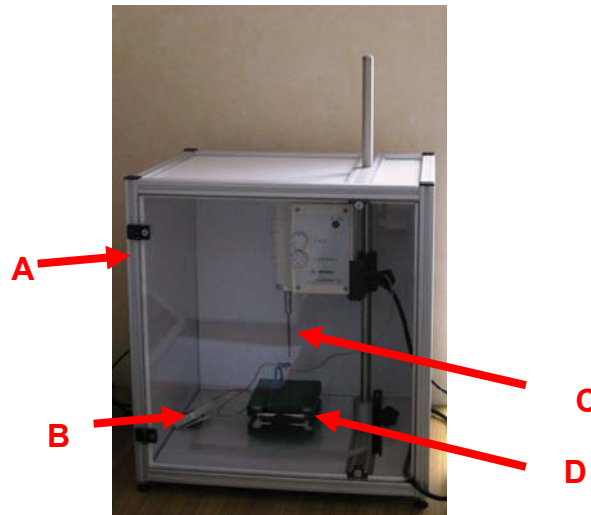
Rycina 10. Wytrząsarka do filtrów CAT S-50.

4.9.3.2 Sonifikacja

Sonifikacja osadu jest niezbędna, aby rozbić ściany oocyst *T. gondii* i uwolnić sporocysty, gdyż przeciwciała monoklonalne mAb 4B6 używane w IMS są specyficzne do ściany sporocyst *T. gondii*.

Aby zoptymalizować proces sonifikacji przygotowano zawiesinę oocyst *T. gondii* w wodzie jałowej o stężeniu 100 oocyst/ μ l. 0,5 ml tej zawiesiny sonifikowano w różnych warunkach, zmieniając liczbę i długość impulsów oraz amplitudę drgań. Następnie sporządzano preparaty mikroskopowe, które oglądano pod mikroskopem fluorescencyjnym. Wybrano takie warunki, w których wszystkie oocysty zostały rozbite uwolniając sporocysty, a jednocześnie sporocysty w minimalnym stopniu były rozbijane z uwolnieniem sporozoitów.

Probówkę z zawiesiną osadu w PBS umieszczano w naczyniu z lodem i wstawiano do dźwiękoszczelnej komory z homogenizatorem ultradźwiękowym Labsonic®M (Sartorius AG) (Rycina 11) o mocy 30 kHz (wibracje mechaniczne o częstotliwości 3000 drgań na sekundę). Końcówkę sondy sonifikatora (średnica 3 mm) zanurzano w zawieszynie. Sonifikowano próbę stosując 5 dziesięciosekundowych impulsów powtarzanych co 10 s. Ekspozycję próby na działanie ultradźwięków nastawiano za pomocą zewnętrznego zegara. Po zakończeniu sonifikacji końcówkę sondy spłukiwano kilkoma ml chłodnego buforu do inkubacji PBS. Zsonifikowany osad przenoszono do probówki do izolacji magnetycznej (DYNAL L10 nr 740.03., DYNAL BIOTECH SA, Norwegia), którą uzupełniano buforem PBS do 8 ml.



Rycina 11. Sonifikator Labsonic®M (Sartorius AG). A) Komora dźwiękoszczelna, B) zegar C) sonda, D) statyw.

4.9.3.3 Opłaszczanie kuleczek magnetycznych przeciwciałami 4B6 anty

Toxoplasma gondii

Kuleczki magnetyczne w formie zawiesiny (BM0829, P.A.R.I.S, Compiègne, Francja), o średnicy 0,86 μm , pokryte przeciwciałami monoklonalnymi (kozie anty - mysie IgM), łączy się z przeciwciałami mAb 4B6 (IgM) specyficznymi do wewnętrznej części ściany oocyst oraz do ściany sporocyst *T. gondii*. Przeciwciała mAb 4B6 (mysie IgM) łączą się ze ścianą sporocyst *T. gondii*, ale także dają reakcję krzyżową z blisko spokrewnionymi kokcydiami: *Neospora canicum*, *Hammondia spp.* [Dumètre i Dardé, 2007]. Są specyficzne do różnych szczepów *T. gondii* należących do genotypów I, II, III bądź rekombinowanych i atypowych genotypów [Dumètre i Dardé, 2007].

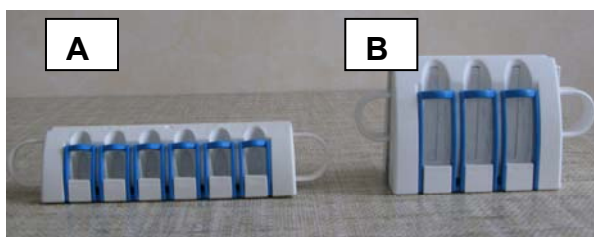
Przeciwciała 4B6 używane w tych badaniach otrzymano od profesor Marie-Laure Dardé (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Université de Limoges, Francja). Przeciwciała wyprodukowano w laboratorium Université de Limoges wg procedury opisanej przez Dumètre i Dardé (2005).

Do 1,5 ml probówki Eppendorfa dodawano 100 μl zawiesiny kuleczek magnetycznych oraz 100 μl przeciwciał mAb 4B6. Mieszaninę inkubowano przez 30 min. w temperaturze pokojowej na rotatorze DYNAL Sample Mixer (Rycina 13) w celu przyłączenia się przeciwciał 4B6 do kulek magnetycznych. Następnie umieszczano probówkę w urządzeniu do separacji magnetycznej

DYNAL MPC-S (Rycina 12 A) na 30 s, po czym ostrożnie usuwano supernatant. Do kompleksów kulek magnetycznych i przeciwciał 4B6 dodawano 100 µl buforu do inkubacji (PBS) i delikatnie mieszano.

4.9.3.4 Reakcja IMS (immunomagnetyczna separacja)

Do próbki Leightona zawierającej zsonifikowany osad w buforze PBS dodawano 100 µl przygotowanych uprzednio kompleksów kulek magnetycznych i przeciwciał 4B6. Całość inkubowano przez 30 min. w rotatorze DYNAL Sample Mixer (Rycina 13) w temperaturze pokojowej w celu wychwycenia sporocyst *T. gondii* przez kompleksy kulek magnetycznych – 4B6. Następnie próbkę umieszczano w urządzeniu do separacji magnetycznej DYNAL MPC-L (Rycina 12 B) i pozostawiano na 5 min. Po tym czasie ostrożnie odciągano niezwiązany materiał za pomocą automatycznego pipetora (Hirschmann, Laborgerate) i jednorazowych pipet. W przypadku badania osadu z wody powierzchniowej, kompleksy kulek przemywano 5 ml buforu do inkubacji PBS i ponownie pozostawiano na 5 min. w DYNAL MPC-L. Po odrzuceniu supernatantu dodawano 1 ml buforu do inkubacji i przenoszono zawiesinę do próbki 2 ml, którą umieszczano w DYNAL MPC-S (Rycina 18 A). Niezwiązany materiał usuwano, a do próbki dodawano 200 µl 2 % H₂SO₄. Kwas siarkowy powoduje uwolnienie sporocyst *T. gondii* od kulek magnetycznych. Zawiesinę wortexowano przez 3 min. na najwyższych obrotach. Następnie umieszczano w DYNAL MPC-S na 2 min. Supernatant przenoszono do nowej 1,5 ml próbki Eppendorfa i neutralizowano równą ilością 3,3 % NaOH. Następnie mieszaninę wirowano 10 min., w 4°C przy 1250 x g, bez hamowania. Osad zawieszano w wodzie jałowej i przechowywano w 4°C do czasu dalszych analiz.



Rycina 12. Urządzenia do separacji magnetycznej. A) DYNAL MPC-S, B) DYNAL MPC-L.



Rycina 13. Rotator DYNAL Sample Mixer.

Przed filtrowaniem prób środowiskowych wody wykonano dodatkowo kontrolę procesu IMS, aby sprawdzić poprawne działanie aparatury i odczynników. Wykonywano w tym celu filtrację oraz IMS dla 10 L próby wody destylowanej, zanieczyszczonej 100 oocystami *T. gondii*.

4.9.3.5 Kontrola procesu IMS - immunofluorescencja z przeciwciałami 4B6

Każda próba wody została zbadana za pomocą metody immunofluorescencji (przed wykonaniem PCR), którą zastosowano jako dodatkową kontrolę procesu IMS.

Jako kontroli pozytywnej używano zawiesiny sporocyst *T. gondii* w wodzie jałowej. Zawiesinę przygotowywano przez rozcieńczenie zawiesiny oocyst *T. gondii* w 2 % H₂SO₄ w wodzie jałowej do uzyskania stężenia 100 oocyst / μ l i sonifikację za pomocą homogenizatora ultradźwiękowego Labsonic®M (Sartorius AG).

Na szkiełko do immunofluorescencji наносzono na osobne oczka 5 μ l badanej próby (zawiesina osadu uzyskanego po IMS w wodzie), 5 μ l kontroli dodatniej (zawiesina 500 sonifikowanych oocyst *T. gondii* w wodzie), 5 μ l kontroli ujemnej (bufor PBS). Suszono w temperaturze pokojowej i następnie płukano buforem PBS dwa razy po 5 min. Na każdą studzienkę dodawano 10 μ l przeciwciał 4B6 rozcieńczonych wodą jałową w stosunku 1:50, po czym inkubowano w ciemności w komorze wilgotnej w temperaturze 37°C przez 30 min. Po inkubacji płukano buforem PBS trzy razy po 5 min. i suszono

w temperaturze pokojowej. Następnie do każdej studzienki dodawano 10 μ l koniugatu (kozie anti-mysie IgG znaczone FITC, BioLegend) rozcieńczone 1: 30 w buforze PBS – Błękit Evansa (2 krople błękitu Evansa w 5 ml buforu PBS) i inkubowano w ciemności w komorze wilgotnej w temperaturze 37°C przez 30 min. Po końcowym płukaniu w buforze PBS (trzy razy po 5 min.) i suszeniu w temperaturze pokojowej, szkiełko przykrywano szkiełkiem nakrywkowym i oglądano pod mikroskopem fluorescencyjnym odczytując fluorescencję FITC (wzbudzenie λ 450 - 480 nm, emisja λ 515nm) oraz autofluorescencję (wzbudzenie przy λ 330 – 385 nm, emisja λ 420 nm).

Wybór optymalnego stężenia przeciwciał 4B6 oraz koniugatu stosowanych do immunofluorescencji pośredniej został dokonany eksperymentalnie. Na oczka szkiełka do fluorescencji наносzono po 5 μ l kontroli dodatniej i suszono w temperaturze pokojowej. Następnie przeprowadzono badanie fluorescencji wg procedury podanej powyżej, stosując rozcieńczenia przeciwciał 4B6 w wodzie jałowej: 1:25 i 1:50 oraz rozcieńczenie koniugatu 1: 30 i 1:60. Jako kontrolę ujemną zastosowano bufor PBS.

4.9.4 Odzyskiwanie oocyst *T. gondii* z prób powietrza

Filtr żelatynowy znajdujący się na plastikowym uchwycie cięto skalpelem na mniejsze kawałki i umieszczano w probówce typu Falcon 50 ml. Do próbki dodawano 20 ml ciepłej wody (80°C) i mieszano do całkowitego rozpuszczenia się filtra. Następnie wirowano próbę 3 min. przy 1250 x g. Supernatant usuwano, a do próbki dodawano 10 ml ciepłej wody (80°C) i ponownie odwirowywano. Uzyskany osad przenoszono do 1,5 ml próbki Eppendorfa, zawieszano w wodzie jałowej i przechowywano w 4°C do czasu dalszych analiz.

4.10 BADANIE PRÓB ŚRODOWISKOWYCH METODĄ MIKROSKOPOWĄ

Wszystkie próby środowiskowe po zastosowaniu odpowiednich procedur odzysku oocyst *T. gondii* poddano badaniom mikroskopowym. Z każdej próby wykonywano preparaty mikroskopowe: świeży (oglądany pod mikroskopem świetlnym oraz fluorescencyjnym) i barwiony wg Ziehl–Neelsena (4.7.1).

4.11 OKREŚLENIE ODSETKA PRÓB DODATNICH METODAMI MOLEKULARNYMI

4.11.1 Izolacja DNA z prób środowiskowych

Do izolacji genomowego DNA z prób środowiskowych poddanych procedurom odzysku oocyst *T. gondii* zastosowano metodę wykorzystującą zestaw do izolacji DNA Genomic Mini (A&A Biotechnology) oraz wstępną dezintegrację oocyst *T. gondii* opisaną w punkcie 4.6.2.

4.11.2 Detekcja DNA *Toxoplasma gondii* metodą PCR

Do wykrywania DNA *T. gondii* w próbach środowiskowych zastosowano PCR z użyciem pary starterów specyficznych do genu B1 *T. gondii* (4.3.3). Reakcje przeprowadzano w termocyklerze GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied Biosystems, USA). Wszystkie eksperymenty były przeprowadzane z udziałem kontroli pozytywnej *T. gondii* (genomowe DNA wyizolowane ze szczepu RH *T. gondii*) w celu zweryfikowania prawidłowego przebiegu PCR oraz kontroli negatywnej (woda jałowa), aby wykluczyć kontaminację komponentów reakcji. Dla każdej próby badanie PCR wykonano trzykrotnie w celu określenia powtarzalności metody (i prób dodatnich). Próbę klasyfikowano jako dodatnią gdy wynik pozytywny PCR zanotowano przynajmniej dwukrotnie. Dodatkowo, wszystkie próby negatywne były sprawdzane na obecność inhibitorów PCR. Kontrolę inhibicji przygotowywano przez zmieszanie 2 µl matrycy DNA wyizolowanego z próby środowiskowej z 1 µl kontroli pozytywnej *T. gondii* i wykonywano PCR.

4.11.3 Rozdział elektroforetyczny produktów PCR i wizualizacja wyników

Produkty PCR rozdzielano i analizowano w 2% żelu agarozowym. Żel przygotowywano rozpuszczając 1, 3 g agarozy (SIGMA nr kat. A-9593) w 65 ml buforu TBE (1 x stężonego) i wylewając do komory aparatu do elektroforezy poziomej Horyzont 11-14 lub Horyzont 58 (Gibco BRL, USA) (Rycina 14 A) z umieszczonymi w niej plastikowymi grzebieniami. Po 20 min. stężony żel zalewano buforem TBE i wyjmowano grzebień uzyskując studzienki. Do

jednej ze studzienek nanoszono marker wielkości, a do kolejnych po 10 μ l produktów PCR zmieszanych z barwnikiem obciążającym (oranż G). Komorę łączono z zasilaczem Foto/Force 300 (Fotodyne, USA) i prowadzono elektroforezę przez 35 min. stosując napięcie 150 V i natężenie 500 mA. Następnie żel barwiono w roztworze bromku etydyny (50 μ l/100 ml) przez 15 min., dwukrotnie płukano w wodzie destylowanej przez 15 min., po czym umieszczano w komorze zestawu do archiwizacji wyników GelDoc-It (Imagine Systems, USA) (Rycina 14 B) i analizowano w świetle UV (długość fali 302 nm). Wielkość uzyskanego produktu ustalano porównując pozycje prążków badanych prób z kontrolą pozytywną i markerem mas cząsteczkowych (pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23, Fermentas, Litwa) w programie do analizy i archiwizacji wyników LabWorks.



A



B

Rycina 14. A) Komory aparatu do elektroforezy poziomej Horyzont (Gibco BRL, USA), B) zestaw do archiwizacji wyników GelDoc-It (Imagine Systems, USA)

4.11.4 Detekcja DNA *Toxoplasma gondii* metodą Real-time PCR

Wszystkie próby środowiskowe zostały poddane również badaniu Real-time PCR wykorzystującym sondę molekularną TaqMan znakowaną barwnikiem fluorescencyjnym (FAM), specyficzną do amplifikowanego fragmentu genu B1 *T. gondii* (4.4.2.2.2). Reakcje amplifikacji przeprowadzono w termocyklerze Mx3005PTM (Stratagene, USA) (Rycina 15). Zaletą tej metody jest, między innymi amplifikacja i detekcja w jednym zintegrowanym systemie, co zmniejsza ryzyko kontaminacji oraz stały monitoring reakcji. Wszystkie eksperymenty były przeprowadzane z udziałem kontroli pozytywnej *T. gondii*

(genomowe DNA wyizolowane ze szczepu RH *T. gondii*) oraz kontroli negatywnej (woda jałowa).



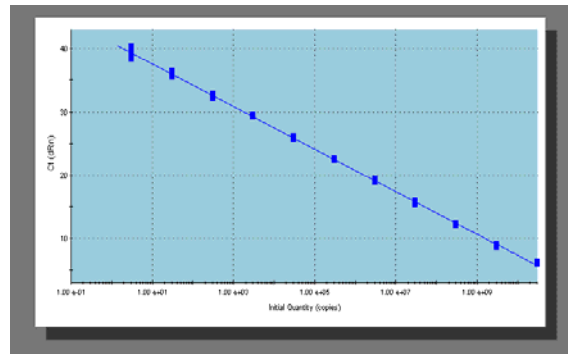
Rycina 15. Termocykler Mx 3005P (Startagene, USA) do Real-time PCR.

4.11.5 Określanie początkowej liczby kopii w badanej próbce za pomocą Real-time QPCR

Wszystkie dodatnie próby środowiskowe poddano analizie ilościowej, stosując metodę analizy absolutnej, wykorzystującą krzywą standardową, którą wykonuje się z serii rozcieńczeń matrycy kontrolnych.

4.11.5.1 Przygotowanie krzywej standardowej

Aby wykonać krzywą standardową przygotowano 8 rozcieńczeń standardu (klonowanej matrycy kontrolnej *T. gondii*, 4.4.1) o znanej liczbie kopii cząsteczek DNA (w zakresie od 5×10^8 do 0,5 kopii w $1 \mu\text{l}$). Serię rozcieńczeń przygotowano w dupleksie. Wykonywano następnie Real-time PCR jak opisano w punkcie 4.4.2.2.2. W wyniku amplifikacji serii rozcieńczeń standardów, otrzymywano krzywą standardową jako wykres zależności log początkowego stężenia matrycy od CT (punkt, w którym reakcja wchodzi w fazę logarytmicznego przyrostu ilości produktu), wyznaczonego dla każdego rozcieńczenia (Rycina 16). Układ punktów powinien tworzyć linię prostą. Notowano wartości parametrów krzywej (R_{sq} , K) określające wydajność, precyzję oraz czułość reakcji.



Rycina 16. Przykładowa krzywa standardowa Real-time QPCR.

4.11.5.2 Sposób wyznaczenia początkowej liczby kopii matrycy

Amplifikacja serii rozcieńczeń matrycy kontrolnej oraz badanych prób przebiega w jednym eksperymencie. Zatem, znając punkty CT odczytane dla poszczególnych prób badanych i odnosząc je do krzywej standardowej, mogą być wyznaczane wartości początkowej liczby kopii matrycy w próbce.

Obliczenia dokonywane są automatycznie przez oprogramowanie termocyklera Mx 3005P (Stratagene) według wzoru:

$$N_{CT} = N_0 (1+E)^{CT}$$

gdzie:

N_{CT} = liczba cząsteczek DNA w cyklu progowym (CT)

N_0 = wyjściowa liczba cząsteczek DNA

E = wydajność PCR [$0 < E < 1$]

4.12 SEKWENCJONOWANIE PRÓB DODATNICH

Próby, które dały wynik pozytywny w PCR z zastosowaniem starterów specyficznych do genu B1 *T. gondii*, poddano sekwencjonowaniu na analizatorze DNA AbiPrism 310 DNA sequencer (Applied Biosystems, USA) (Rycina 17). Sekwencja przedstawiana w postaci serii pików, z których każdy odpowiada konkretnemu nukleotydowi, analizowana była w programie ABI PRISM DNA Sequencing Analysis v. 3.7 for the Windows Platform oraz GeneStudio Pro Software. Sekwencjonowanie miało na celu potwierdzenie wykrycia w badanych próbach środowiskowych DNA *T. gondii*.



Rycina 17. Analizator DNA AbiPrism 310 DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA).

4.12.1 Amplifikacja fragmentów genu B1

Na wybranych matrycach wykonano PCR w celu amplifikacji fragmentów genu B1 *T. gondii* (4.3.3) z tym, że objętość końcowa mieszaniny reakcyjnej wynosiła 50 μ l (stężenia poszczególnych składników zostały proporcjonalnie przeliczone). Po wykonaniu rozdziału elektroforetycznego produktów PCR (4.11.3), sprawdzano, czy uzyskane prążki są pojedyncze oraz jaka jest ich intensywność.

4.12.2 Oczyszczanie DNA

Próby, w których zaobserwowano pojedynczy prążek na żelu agarozowym odpowiadający pożądanemu odcinkowi DNA (fragment genu B1 *T. gondii*), przeznaczonemu do sekwencjonowania poddawano bezpośrednio oczyszczaniu z użyciem zestawu Clean-up (A&A Biotechnology) zgodnie z procedurą podaną przez producenta. Natomiast z prób, w których zanotowano dodatkowe prążki po rozdziale elektroforetycznym, właściwy fragment DNA wycinano z żelu za pomocą skalpela, umieszczano w 1,5 ml probówce Eppendora i następnie oczyszczano zestawem Gel-out (A&A Biotechnology), postępując zgodnie z procedurą podaną przez producenta.

4.12.3 Reakcja sekwencyjna

Oczyszczone DNA poddawano reakcji sekwencyjnej, w której dochodzi do syntezy krótkich fragmentów nici o różnej długości, determinowanej przypadkowym włączaniem dideoksynukleotydów. Reakcję przeprowadzono

w objętości próby 20 µl. Stosowano odczynniki firmy Applied Biosystems oraz profil temperaturowo–czasowy reakcji zgodnie z zaleceniami producenta. Reakcję sekwencyjną przeprowadzano w termocyklerze GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied Biosystems, USA).

4.12.4 Oczyszczanie produktów reakcji sekwencyjnej z terminatorów

Do usuwania terminatorów z mieszaniny poreakcyjnej zastosowano zestaw Ex-Terminator firmy A&A Biotechnology. Postępowano zgodnie z protokołem podanym przez producenta.

4.12.5 Analiza badanej sekwencji nukleotydowej

Tak przygotowane próby poddano odczytowi na analizatorze AbiPrism 310 DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA). Uzyskane sekwencje analizowano za pomocą programu komputerowego GeneStudio Pro Software.

4.13 GENOTYPOWANIE PRÓB DODATNICH

4.13.1 Genotypowanie metodą RFLP

Wszystkie próby dodatnie (uzyskane na podstawie wyników PCR przeprowadzonej na genie B1 *T. gondii*) poddano analizie restrykcyjnej produktów PCR genu SAG2 *T. gondii* według Aspinall i wsp. (2002).

4.13.1.1 Amplifikacja fragmentów genu SAG2 *T. gondii*

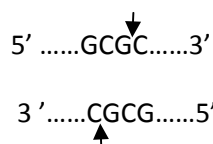
Wykonano amplifikację dwóch fragmentów genu SAG2 *T. gondii* (fragment końca 3' oraz fragment końca 5' genu) według punktu 4.3.2. Dalsza analiza była możliwa tylko w przypadku tych prób, które dały pozytywny wynik PCR z obu końców genu SAG2.

4.13.1.2 Trawienie produktów amplifikacji

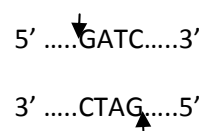
Wykonano trawienie uzyskanych produktów amplifikacji genu SAG2 *T. gondii*. Fragment 3' końca genu trawiono enzymem *CfoI* (Promega, USA), a fragment 5' końca enzymem *Sau3AI* (Promega, USA). Postępowano zgodnie z instrukcją producenta. Następnie trawione produkty były poddane rozdzielaniu elektroforetycznemu w 2% żelu agarozowym i analizowane w świetle UV (punkt

4.11.3). Jako wzorców użyto DNA wyizolowane z tkanek i mózgów myszy zarażonych szczepem DX (genotyp II) i szczepem ME 49 (genotyp II) *Toxoplasma gondii* oraz z tachyzoitów szczepu RH (genotyp I).

Sekwencja rozpoznania **CfoI**



Sekwencja rozpoznania **Sau3AI**

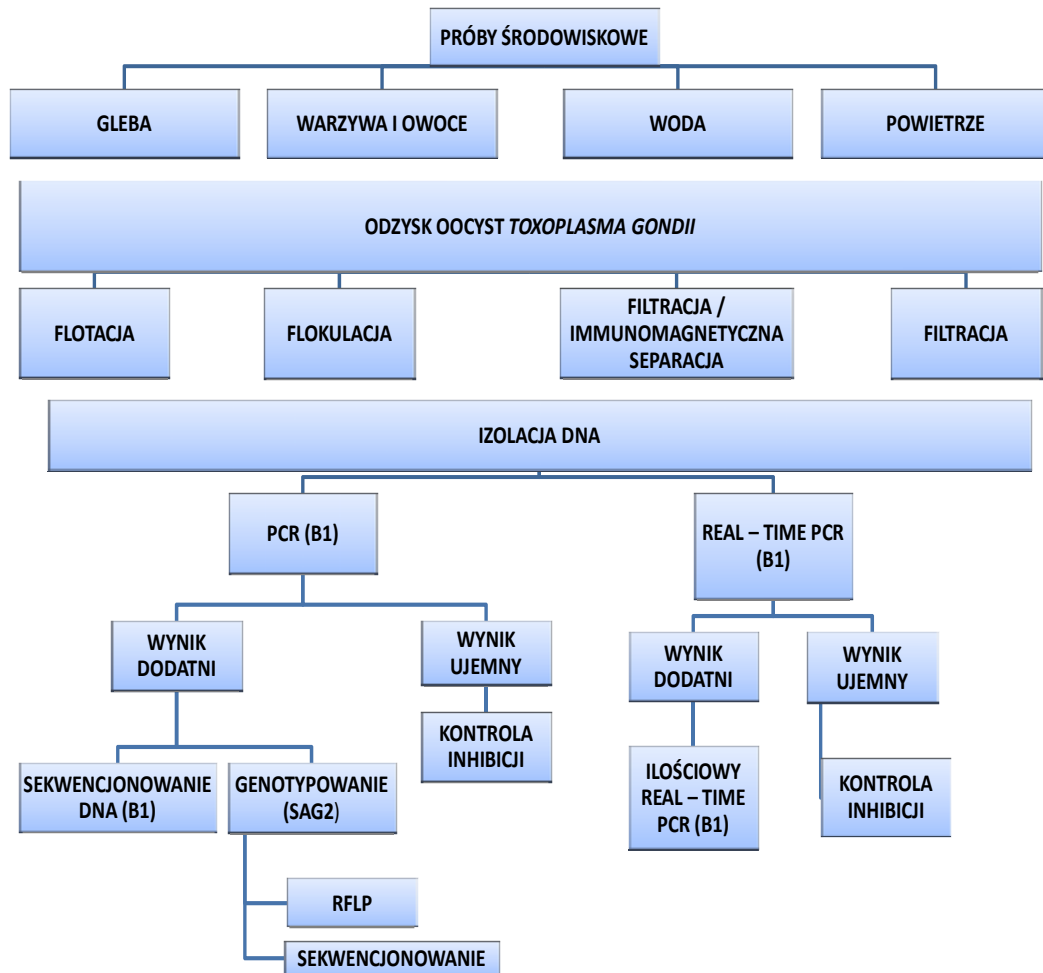


Genotypy *T. gondii* ustalane były na podstawie uzyskanych charakterystycznych wzorów restrykcyjnych. Z genotypem SAG2 I mamy do czynienia, gdy żaden z produktów PCR nie jest trawiony. Genotyp SAG2 II charakteryzuje się trawieniem końca 3' genu przy braku trawienia końca 5' genu. Natomiast przy genotypie SAG2 III obserwuje się trawienie końca 5' genu, przy braku trawienia końca 3'.

4.13.2 Genotypowanie metodą sekwencjonowania

Wszystkie próby, które dały pozytywny wynik PCR dla obu końców genu SAG2 *T. gondii*, poddano sekwencjonowaniu w celu weryfikacji wyników analizy restrykcyjnej. W tym celu amplifikowano fragment końca 3' oraz 5' genu SAG2 *T. gondii* w objętości 50 μ l i przeprowadzano oczyszczanie produktów PCR, reakcję sekwencyjną, usuwanie terminatorów i analizę uzyskanych sekwencji zgodnie z procedurami podanymi w punkcie 4.12. Genotypy były ustalane na podstawie obecności lub braku miejsc restrykcyjnych dla enzymów *CfoI* i *Sau3AI* na sekwencjach analizowanych fragmentów genu SAG2.

Poniżej przedstawiono ogólny schemat wykonywanych badań prób środowiskowych kierunku wykrywania *T. gondii* (Rycina 18).



Rycina 18. Ogólny schemat badania prób środowiskowych.

4. 14 APARATURA

- termocykler gradientowy Mastercycler (Eppendorf AG, Niemcy)
- termocykler GenaAmp PCR System 9700” (Applied Biosystems, USA)
- termocykler Mx3005P (STRATAGENE®, USA)
- mikroskop fluorescencyjny (ZEISS, Imager D1, Niemcy)
- głowica pompy perystaltycznej Masterflex® L/S® Easy-Load® II
- wiertarka akumulatorowa (DEWALT typ 10, DC 980 z akumulatorem DEWALT DE 9075XJ01)
- przepływomierz (PTFE 1-800-866-3837, AALBORG, USA)
- wirówka z chłodzeniem (HERMLE Z383K, LABOR TECHNIK, Niemcy)
- rotator (DYNAL, SAMPLE MIXER)
- sonifikator LABSONIC M (SARTORIUS, Niemcy)
- panele magnetyczne Dynal MPC-S/L (Dynal BIOTECH ASA, Norwegia)
- Air Port MD8 (SARTORIUS, Niemcy)
- aparat do elektroforezy poziomej (Horyzont 11-14 lub Horyzont 58, Gibco BRL, USA)
- zasilacz Foto/Force 300 (Fotodyne, USA)
- zestawie do archiwizacji wyników GelDoc – It, Imagine Systems (UVP, USA)
- AbiPrism 310 DNA Sequencer” (Applied Biosystems, USA)
- NucliSENS miniMAG (BioMerieux)
- mikroskopem świetlnym (Opta – Tech, Mn – 358)
- wytrząsarka Multishaker PSU – 20 (Biosan, Litwa)
- wytrząsarka CAT S-50 (Niemcy)
- wirówka laboratoryjna 5424 (Eppendorf AG, Niemcy)
- wirówka laboratoryjna MiniSpin Plus (Eppendorf AG)
- wirówka do pasków (Qualitron)
- Biovortex V1 (Syngen)
- Termoblok : Thermomixer compact (Eppendorf AG, Niemcy)
- Suchy blok grzejny SBH 130D (Stuart)
- Sanityzator Germicide, Steril 15 W (Cami, Włochy)

- Spektrofotometr UV-VIS Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)
- wytwornica lodu AF 80 (Scotsman)
- Fast Prep FP120 (BIO101 Savant)
- waga laboratoryjna WPE 300 (Radwag)
- kuchenka mikrofalowa
- komora do PCR Biokap DNA(Erlab, Francja)
- komora do PCR Medisafe (Kojair, Finlandia)
- komora laminarna ESCO Technologies

Badania molekularne, stanowiące główną część opisywanej pracy wykonywane były w Zakładzie Parazytologii Tropikalnej GUMed, w specjalnie zaprojektowanym nowoczesnym laboratorium, składającym się z 5 odrębnych pomieszczeń: do izolacji DNA, do sporządzania mieszaniny reakcyjnej PCR (w komorach laminarnych), do dodawania DNA do przygotowanych mieszanin (w komorach jałowych), do przebiegu PCR (pomieszczenie z termocyklerami), do wykonywania elektroforezy, do wykonywania sekwencjonowania DNA. Zarówno układ pomieszczeń jak i wyposażenie spełniają wszystkie standardy badań molekularnych.

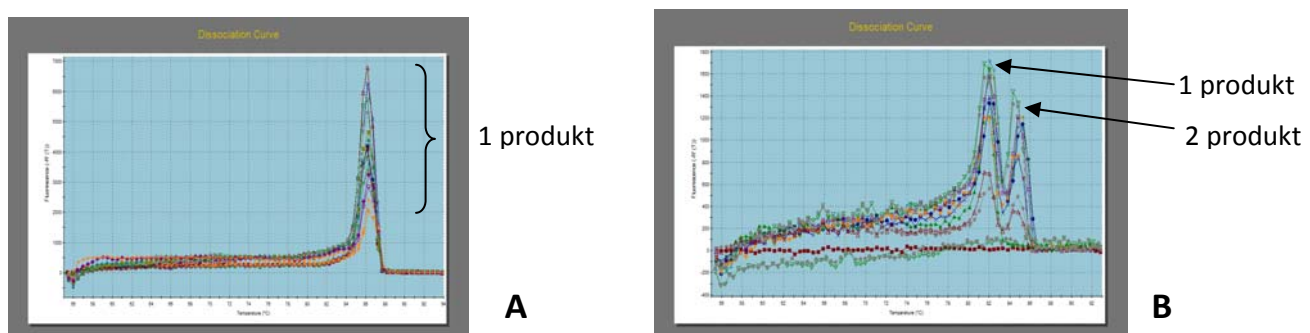
5. WYNIKI

5. 1 WYNIKI SELEKCJI GENU DO DETEKCJI DNA *T.GONDII* ZA POMOCĄ PCR

Porównano wyniki PCR uzyskane z poszczególnymi genami *T. gondii* kodującymi specyficzne białka: SAG2, B1, 65 kDa, REP. Zwracano uwagę na czułość reakcji i powtarzalność wyników. Na ich podstawie, do wykrywania DNA wytypowano badanie PCR bazujące na amplifikacji fragmentów genu B1 *T. gondii* (Materiały i metody, 4.3.3).

5. 2 WYBÓR METODY DO IDENTYFIKACJI DNA *T. GONDII* ZA POMOCĄ TECHNIKI REAL-TIME PCR

Metoda detekcji amplifikowanych fragmentów genu B1 *T. gondii* z zastosowaniem barwnika SYBR Green (Materiały i metody, 4.4.2.1) okazała się nieużyteczna w przypadku obecności w badanej próbce dodatkowego, niespecyficznego DNA. Zatem w przypadku zanieczyszczenia próby badanej jakimkolwiek obcym DNA wyniki amplifikacji nie nadają się do analizy ilościowej, co potwierdziły eksperymenty (Rycina 19 A i B).

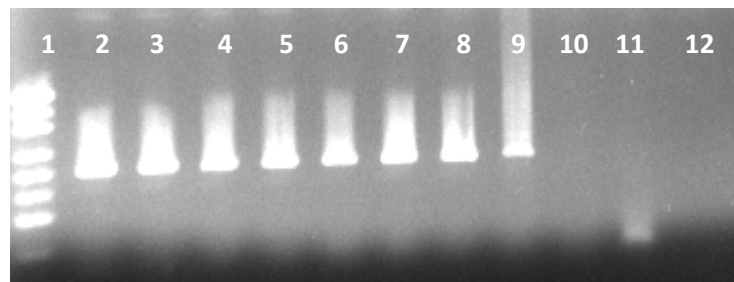


Rycina 19. Krzywa topnienia produktów amplifikacji fragmentu genu B1 *T. gondii* przeprowadzonej na kontroli dodatniej *T. gondii*: A) wykres charakterystyczny dla jednego produktu PCR; B) wykres wskazujący na zanieczyszczenie próby badanej zawierającej kontrolę dodatnie *T. gondii* obcym DNA (przesunięcie temperatury topnienia).

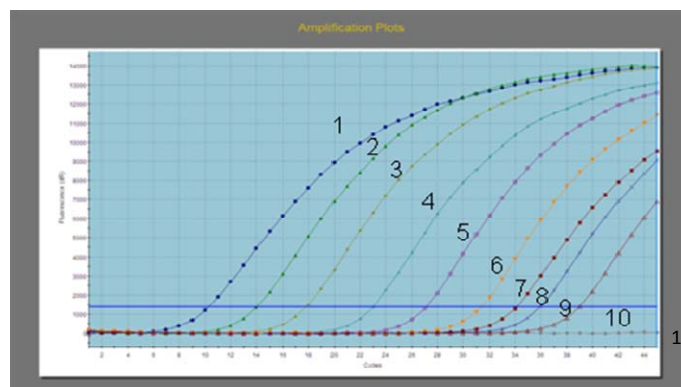
Na kontrolach dodatnich *T. gondii* przetestowano dwa układy z zastosowaniem sond molekularnych typu TaqMan, specyficznych do różnych fragmentów genu B1 *T. gondii* (Materiały i metody, 4.4.2.2). Z uwagi na lepszą powtarzalność wyników do badań prób środowiskowych wybrano układ opracowany przez Arkush i wsp. (2003).

5. 3 PORÓWNANIE CZUŁOŚCI DETEKCJI PCR I REAL-TIME PCR Z WYKORZYSTANIEM KLONOWANEJ KONTROLI *T. GONDII*

Wykorzystując standard Real-time QPCR (Materiały i metody, 4.4.1) porównano granice detekcji PCR i Real-time PCR (Rycina 20 i 21).



Rycina 20. Wynik PCR specyficznej dla fragmentu genu B1 *T. gondii* przeprowadzonej na seryjnych rozcieńczeniach kontroli pJET-B1 *T. gondii*. Ścieżki: 1 – marker wielkości (pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23, Fermentas, Litwa), 2 - 11 seryjne rozcieńczenie kontroli pJET-B1 *T. gondii*, 12 – kontrola ujemna. (liczba kopii DNA w próbce: 2 - 5×10^8 , 3 - 5×10^7 , 4 - 5×10^6 , 5 - 5×10^5 , 6 - 5×10^4 , 7 - 5×10^3 , 8 - 5×10^2 , 9 - 5×10^1 , 10 - 5, 11 - 0,5).



Rycina 21. Wyniki Real-time PCR z użyciem sondy TaqMan ToxB1S specyficznej do fragmentu genu B1 *T. gondii*. Krzywe: 1-9 seryjne rozcieńczenie kontroli pJET-B1 *T. gondii* (liczba kopii DNA w próbce: 1 - 5×10^8 , 2 - 5×10^7 , 3 - 5×10^6 , 4 - 5×10^5 , 5 - 5×10^4 , 6 - 5×10^3 , 7 - 5×10^2 , 8 - 5×10^1 , 9 - 5, 10 - 0,5) 11 – kontrola ujemna.

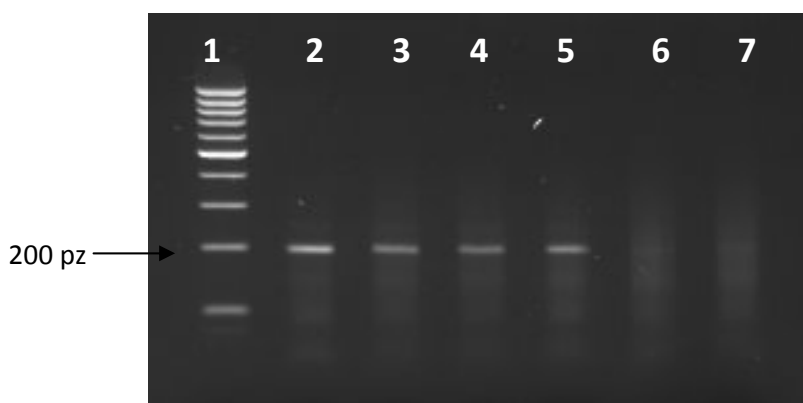
5. 4 WYNIKI IZOLACJI DNA Z OOCYST *T. GONDII*

5.4.1. Wyniki izolacji DNA z oocyst *T. gondii* zestawami komercyjnymi

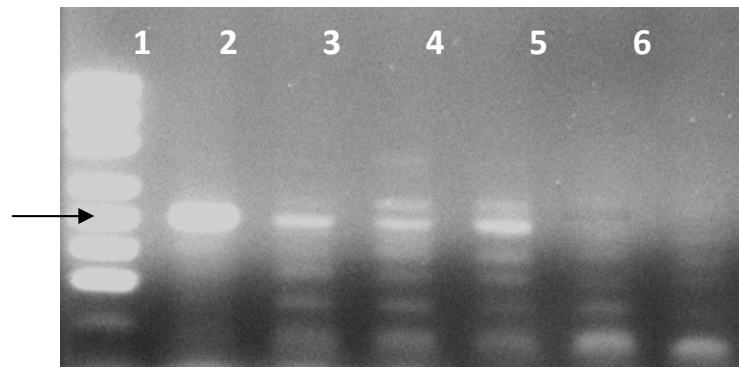
Wyniki porównania izolacji DNA z oocyst *T. gondii* wykonanej trzema komercyjnie dostępnymi zestawami do ekstrakcji DNA przedstawiono w Tabeli 18 oraz na Rycinach 22 - 24.

Tabela 18. Porównanie izolacji DNA z oocyst *T. gondii* z użyciem komercyjnych zestawów.

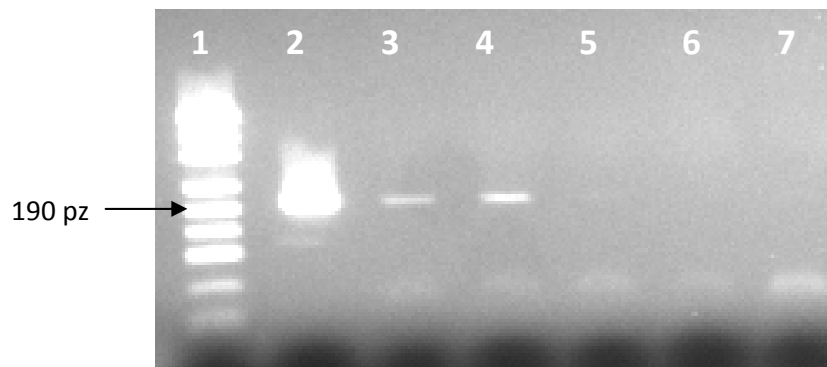
producent zestawu	zestaw do izolacji DNA	liczba prób dodatnich / liczba prób badanych			
		liczba oocyst <i>T. gondii</i> w inokulum			
		10 ⁴	10 ³	10 ²	10
A&A Biotechnology	GenomicMini	3/3	3/3	2/3	0
BioMerieux	NucliSENS miniMAG	3/3	3/3	2/3	0
(Qbiogene), BIO101 Systems	FastDNA Spin kit (for soil)	3/3	1/3	0	0



Rycina 22. Wynik testu izolacji DNA z oocyst *T. gondii* z użyciem zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology). Elektroforeza produktów amplifikacji genu B1 *T. gondii* w 2% żelu agarozowym. Ścieżki: 1 – GeneReguler 100–1000 bp DNA Leader (Fermentas), 2 – Kontrola dodatnia *T. gondii*, 3 – próba zawierająca 10⁴ oocyst, 4 – próba zawierająca 10³ oocyst, 5 - próba zawierająca 10² oocyst, 6 – próba zawierająca 10 oocyst, 7 – kontrola ujemna.



Rycina 23. Wynik testu izolacji DNA z oocyst *T. gondii* z użyciem zestawu NucliSens MiniMAG (Biomerieux). Elektroforeza produktów amplifikacji genu B1 *T. gondii* w 2% żelu agarozowym. Ścieżki: 1 - marker wielkości (pUC19 DNA/Mspl (HpaII) Marker, 23, Fermentas, Litwa) 2 – Kontrola dodatnia *T. gondii*, 3 – próba zawierająca 10^4 oocyst, 4 – próba zawierająca 10^3 oocyst, 5 - próba zawierająca 10^2 oocyst, 6 – próba zawierająca 10 oocyst, 7 – kontrola ujemna.



Rycina 24. Wynik testu izolacji DNA z oocyst *T. gondii* z użyciem zestawu Fast DNA Spin kit (for soil) (BIO 101 Systems). Elektroforeza produktów amplifikacji genu B1 *T. gondii* w 2% żelu agarozowym. Ścieżki: 1 - marker wielkości (pUC19 DNA/Mspl (HpaII) Marker, 23, Fermentas, Lithuania), 2 – Kontrola dodatnia *T. gondii*, 3 – próba zawierająca 10^4 oocyst, 4 – próba zawierająca 10^3 oocyst, 5 - próba zawierająca 10^2 oocyst, 6 – próba zawierająca 10 oocyst, 7 – kontrola ujemna.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów wykazały, że izolacja DNA z oocyst *T. gondii* jest wydajniejsza z użyciem zestawów Genomic Mini (A&A Biotechnology) i NucliSENS miniMAG (BioMerieux), są one skuteczniejsze niż FastDNA Spin kit (for soil) (Qbiogene).

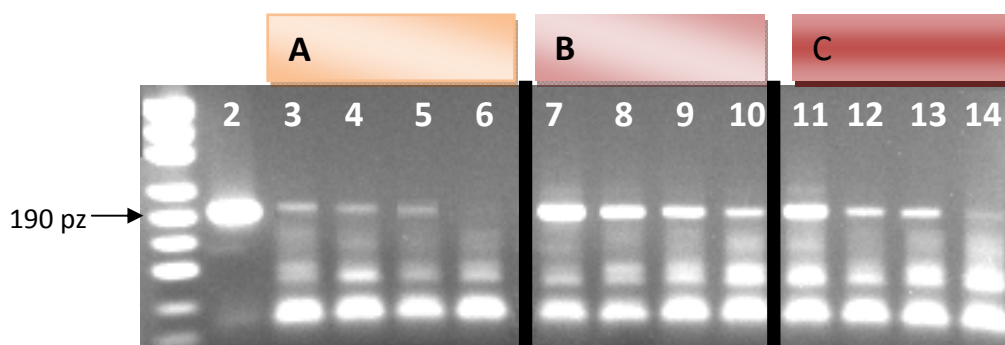
5.4.2 Wyniki zastosowania etapów wstępnej dezintegracji oocyst *T. gondii* poprzedzających izolację DNA zestawem komercyjnym GenomicMini (A&A Biotechnology).

W celu uzyskania lepszej efektywności izolacji DNA z oocyst *T. gondii*, przed zastosowaniem komercyjnego zestawu do izolacji DNA Genomic Mini

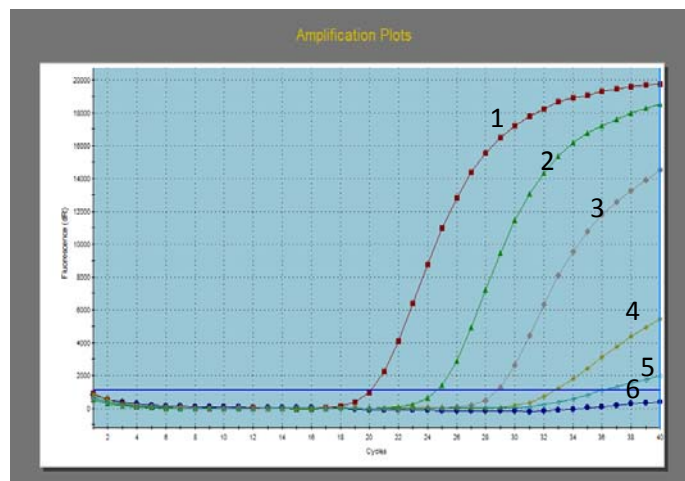
(A&A Biotechnology) dodano etapy niezbędne do rozbicia struktury oocyst i uwolnienia pasożytów: rozbijanie kulkami cyrkonowymi w urządzeniu FastPrep, szok termiczny, działanie detergentami oraz proteazą. Po przeprowadzeniu wielu eksperymentów ustalono warunki (długość, liczba cykli poszczególnych etapów oraz stężenie odczynników), które dawały najlepsze wyniki (Tabela 19) (Rycina 25 i 26).

Tabela 19. Porównanie wydajności izolacji DNA z oocyst *T. gondii* za pomocą zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology) bez oraz z etapami wstępnej dezintegracji oocyst *T. gondii*. Wyniki Real-time PCR różniące się od wyników standardowej PCR umieszczono w nawiasach.

Lp	zastosowany wariant izolacji DNA	liczba prób dodatnich / liczba prób badanych			
		Liczba oocyst <i>T. gondii</i> w inokulum			
		10 ⁴	10 ³	10 ²	10
1	izolacja DNA kitem GenomicMini bez wstępnych etapów dezintegracji oocyst	3/3	3/3	2/3 (3/3)	0 (1/3)
2	izolacja DNA kitem GenomicMini z etapami wstępnej dezintegracji oocyst z użyciem SDS jako detergentu	3/3	3/3	3/3	2/3 (3/3)
3	izolacja DNA kitem GenomicMini z etapami wstępnej dezintegracji oocyst z użyciem Tween 20 jako detergentu	3/3	3/3	3/3	2/3 (3/3)



Rycina 25. Wynik izolacji DNA z oocyst *T. gondii* zestawem GenomicMini (A&A Biotechnology): A) bez etapów wstępnej dezintegracji oocyst; B) z etapami wstępnej dezintegracji oocyst i użyciem detergentu SDS; C) z etapami wstępnej dezintegracji oocyst i użyciem detergentu Tween 20. Ścieżki: 1 - marker wielkości (pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23, Fermentas, Lithuania), 2 - kontrola dodatnia *T. gondii*, 3, 7, 11 – próby zawierające 10⁴ oocyst, 4, 8, 12 - próby zawierające 10³ oocyst, 5, 9, 13 - próby zawierające 10² oocyst, 6, 10, 14 - próby zawierające 10 oocyst.



Rycina 26. Wynik testu izolacji DNA z oocyst *T. gondii* zestawem GenomicMini (A&A Biotechnology) z etapami wstępnej dezintegracji oocyst i użyciem detergentu SDS. Krzywe amplifikacji genu B1 *T. gondii* w Real-time PCR. Krzywe: 1 – kontrola dodatnia *T. gondii*, 2 - próba zawierająca 10^4 oocyst, 3 – próba zawierająca 10^3 oocyst, 4 - próba zawierająca 10^2 oocyst, 5 – próba zawierająca 10 oocyst, 6 – kontrola ujemna.

Etapy wstępnej dezintegracji oocyst *T. gondii* okazały się niezbędne w celu rozbicia ściany oocyst *T. gondii* i w konsekwencji wydajniejszej izolacji DNA tego pasożyta.

5. 5 WYNIKI PRÓB ODZYSKOWYCH

Pierwszym etapem oceny efektywności detekcji oocyst *T. gondii* z prób środowiskowych za pomocą przyjętych metod badawczych, było wykonanie prób odzyskowych. W tym celu zanieczyszczano odpowiednio przygotowane próby środowiskowe różną, znaną liczbą oocyst pasożyta (10^4 , 10^3 , 10^2 , 10), postępując zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiały i metody (4.7).

5.5.1 Wyniki badań mikroskopowych

5.5.1.1 Wyniki prób odzyskowych z piasku

Wyniki badań mikroskopowych przedstawia Tabela 20 oraz Rycina 27.

Tabela 20. Wyniki badania mikroskopowego próby odzyskowej z piachu.

metoda mikroskopowa	liczba oocyst <i>T. gondii</i> dodana do próby odzyskowej piachu			
	10 ⁴	10 ³	10 ²	10
liczba oocyst widziana w preparacie świeżym pod mikroskopem świetlnym	300	0	0	0
liczba oocyst widziana pod mikroskopem fluorescencyjnym	306	0	0	0

Z przeprowadzonego badania wynika, że metodą mikroskopową udało się potwierdzić tylko 3% odzysku badanego materiału w przypadku zanieczyszczenia rzędu 10⁴ oocyst *T. gondii*.

5.5.1.2 Wyniki prób odzyskowych z warzyw i owoców

Wyniki badań mikroskopowych preparatów przygotowanych z osadów uzyskanych w wyniku poddania flokulacji zanieczyszczonych oocystami *T. gondii* popłuczyn warzyw (rzodkiewka) oraz owoców (truskawki), pokazane są w Tabeli 21 i 22 oraz na Rycinie 29.

Tabela 21. Wyniki próby odzyskowej z popłuczyn warzyw.

metoda mikroskopowa	liczba oocyst <i>T. gondii</i> dodana do próby odzyskowej rzodkiewek			
	10 ⁴	10 ³	10 ²	10
liczba oocyst widziana w preparacie barwionym metodą Ziehl - Neelsena pod mikroskopem świetlnym	270	0	10	0
liczba oocyst widziana pod mikroskopem fluorescencyjnym	240	0	0	0

Tabela 22. Wyniki próby odzyskowej z popłuczyn owoców (truskawek).

metoda mikroskopowa	liczba oocyst <i>T. gondii</i> dodana do próby odzyskowej truskawek			
	10 ⁴	10 ³	10 ²	10
liczba oocyst widziana w preparacie barwionym metodą Ziehl - Neelsena pod mikroskopem świetlnym	10	0	0	0
liczba oocyst widziana pod mikroskopem fluorescencyjnym	10	0	0	0

Odzysk oocyst *T. gondii* z prób rzodkiewek potwierdzony z użyciem metod mikroskopowych wyniósł 2,7% w preparacie mikroskopowym barwionym według Ziehl–Neelsena i 2,4% w badaniu autofluorescencji przy zanieczyszczeniu próby liczbą 10^4 oocyst pasożyta. Natomiast w przypadku prób truskawek odzysk oocyst *T. gondii* wynosi 0,1%.

5.5.1.3 Wyniki próby odzyskowej z wody

Wyniki badań mikroskopowych preparatów przygotowanych z osadów uzyskanych po wykonaniu filtracji i IMS na próbach wody destylowanej zanieczyszczonych oocystami *T. gondii*, pokazane są w Tabeli 23 i na Rycinie 28.

Tabela 23. Wyniki badania mikroskopowego próby odzyskowej z wody.

metoda mikroskopowa	liczba oocyst <i>T. gondii</i> dodana do próby odzyskowej wody			
	10^4	10^3	10^2	10
liczba oocyst widziana w preparacie świeżym pod mikroskopem świetlnym	2000	217	0	0
liczba oocyst widziana w preparacie barwionym metodą Ziehl - Neelsena pod mikroskopem świetlnym	2000	210	0	0
liczba oocyst widziana pod mikroskopem fluorescencyjnym	2100	250	2	0

Badania mikroskopowe prób wody zanieczyszczonych oocystami *T. gondii*, wykazały odzysk na poziomie 21% (w badaniu autofluorescencji) i 20% (w badaniu preparatów świeżych i barwionych pod mikroskopem świetlnym) dla prób zanieczyszczonych 10^4 oocyst. Podobną skalę odzysku zanotowano także dla zanieczyszczenia rzędu 10^3 oocyst, a przy zanieczyszczeniu próby 100 oocystami odzysk na poziomie 2% zanotowano tylko pod mikroskopem fluorescencyjnym.

5.5.1.4 Wyniki próby odzyskowej z filtrów do pobierania prób powietrza

Wyniki badań mikroskopowych preparatów przygotowanych z osadów uzyskanych po odwirowaniu zanieczyszczonych oocystami *T. gondii*, filtrów żelowych pokazane są w Tabeli 24.

Tabela 24. Wyniki badania mikroskopowego próby odzyskowej z filtrów do pobierania prób powietrza.

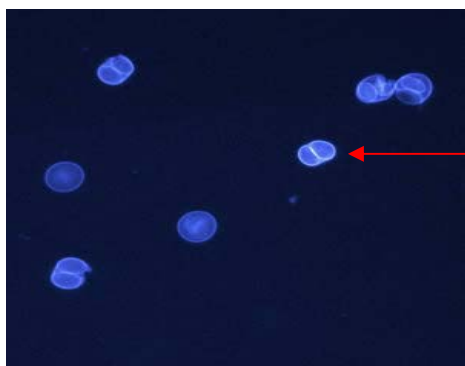
metoda mikroskopowa	liczba oocyst <i>T. gondii</i> dodana na filtr żelowy			
	10^4	10^3	10^2	10
liczba oocyst widziana w preparacie świeżym pod mikroskopem świetlnym	170	0	0	0
liczba oocyst widziana w preparacie barwionym metodą Ziehl - Neelsena pod mikroskopem świetlnym	150	0	0	0
liczba oocyst widziana pod mikroskopem fluorescencyjnym	200	0	0	0

Po przeprowadzeniu odzysku oocyst *T. gondii* z filtrów żelowych zanotowano odzysk 1,7%, 1,5% i 2% materiału, zależenie od zastosowanej obserwacji mikroskopowej.



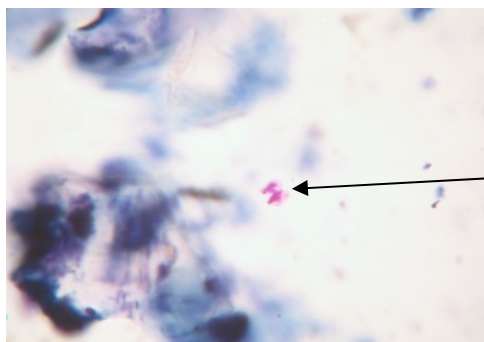
sporulujące oocysty *T. gondii*

Rycina 27. Zdjęcie preparatu świeżego wykonanego z próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z piasku oglądane pod mikroskopem świetlnym.



sporulujące oocysty *T. gondii*

Rycina 28. Zdjęcie preparatu świeżego wykonanego z próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z wody, oglądanego pod mikroskopem fluorescencyjnym - obserwacja autofluorescencji oocyst.

oocysta *T. gondii*

Rycina 29. Zdjęcie preparatu barwionego według Ziehl–Neelsena, wykonanego z próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z rzodkiewek.

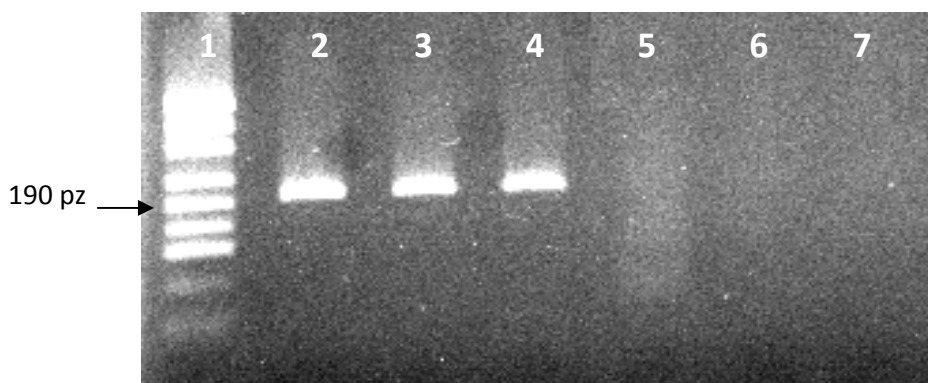
5.5.2 Wyniki badań molekularnych

5.5.2.1 Wyniki PCR

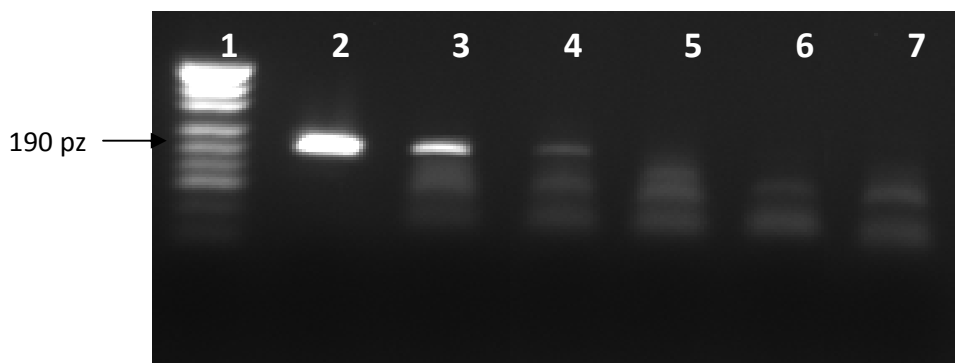
Określono granice wykrywalności oocyst *T. gondii* z prób odzyskowych za pomocą PCR (Materiały i metody, 4.3.3) oraz ustalono powtarzalność wyników (Tabela 25, Rycina 30 – 34).

Tabela 25. Wykrywalność oocyst *T. gondii* z prób odzyskowych za pomocą PCR.

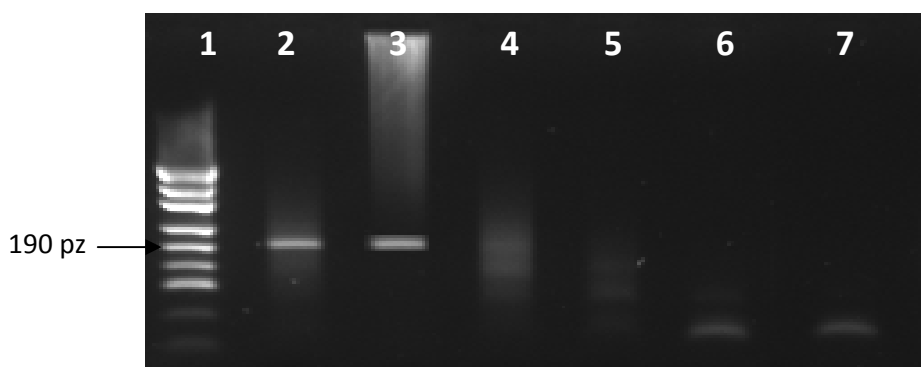
rodzaj próby odzyskowej		rodzaj materiału z jakiego izolowano DNA	liczba prób dodatnich / liczba prób badanych			
			liczba oocyst <i>T. gondii</i> w inokulum			
			10 ⁴	10 ³	10 ²	10
piach		zawiesina materiału odzyskanego po flotacji	3/3	2/3	0	0
rzodkiewka		zawiesina osadu uzyskanego po flokulacji	3/3	2/3	0	0
truskawki		zawiesina osadu uzyskanego po flokulacji	3/3	0	0	0
woda	destylowana	zawiesina osadu uzyskanego po filtracji i IMS	3/3	3/3	2/3	0
	pitna z kranu		3/3	2/3	2/3	0
	powierzchniowa		3/3	1/3	1/3	0
filtr żelowy		zawiesina osadu uzyskanego po wirowaniu	3/3	3/3	0	0



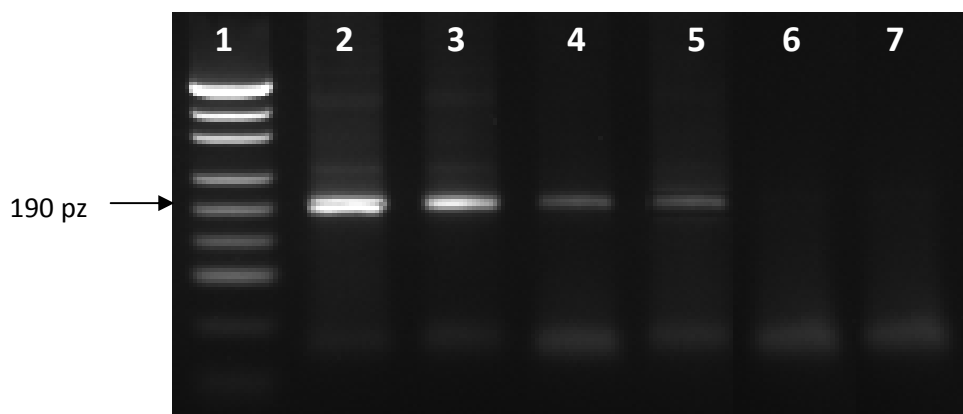
Rycina 30. Wynik próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z ziemi. Ścieżki: 1 – marker wielkości (pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23, Fermentas, Litwa), 2 – kontrola dodatnia *T. gondii*, 3 – próba zawierająca 10^4 oocyst, 4 – próba zawierająca 10^3 oocyst, 5 - próba zawierająca 10^2 oocyst, 6 – próba zawierająca 10 oocyst, 7 – kontrola ujemna.



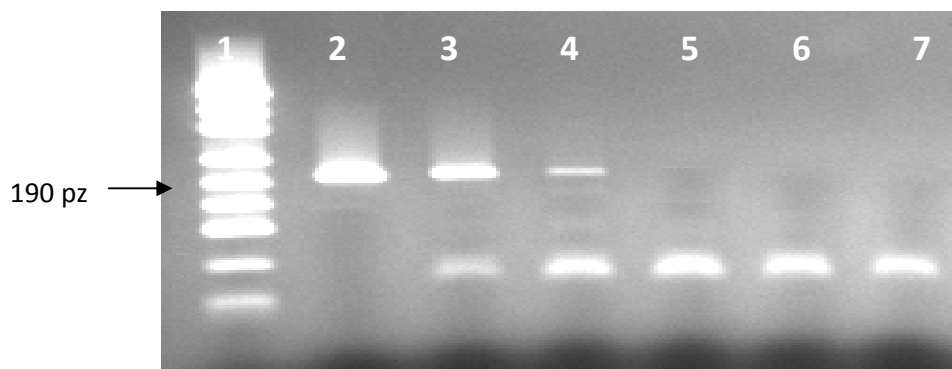
Rycina 31. Wynik próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z warzyw (rzodkiewka). Ścieżki: 1 – marker wielkości (pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23, Fermentas, Litwa), 2 – kontrola dodatnia *T. gondii*, 3 – próba zawierająca 10^4 oocyst, 4 – próba zawierająca 10^3 oocyst, 5 - próba zawierająca 10^2 oocyst, 6 – próba zawierająca 10 oocyst, 7 – kontrola ujemna.



Rycina 32. Wynik próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z owoców (truskawki). Ścieżki: 1 – marker wielkości (pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23, Fermentas, Litwa), 2 – kontrola dodatnia *T. gondii*, 3 – próba zawierająca 10^4 oocyst, 4 – próba zawierająca 10^3 oocyst, 5 - próba zawierająca 10^2 oocyst, 6 – próba zawierająca 10 oocyst, 7 – kontrola ujemna.



Rycina 33. Wynik próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z wody destylowanej. Ścieżki: 1 – marker wielkości (pUC19 DNA/Mspl (HpaII) Marker, 23, Fermentas, Litwa), 2 – kontrola dodatnia *T. gondii*, 3 – próba zawierająca 10^4 oocyst, 4 – próba zawierająca 10^3 oocyst, 5 - próba zawierająca 10^2 oocyst, 6 – próba zawierająca 10 oocyst, 7 – kontrola ujemna.



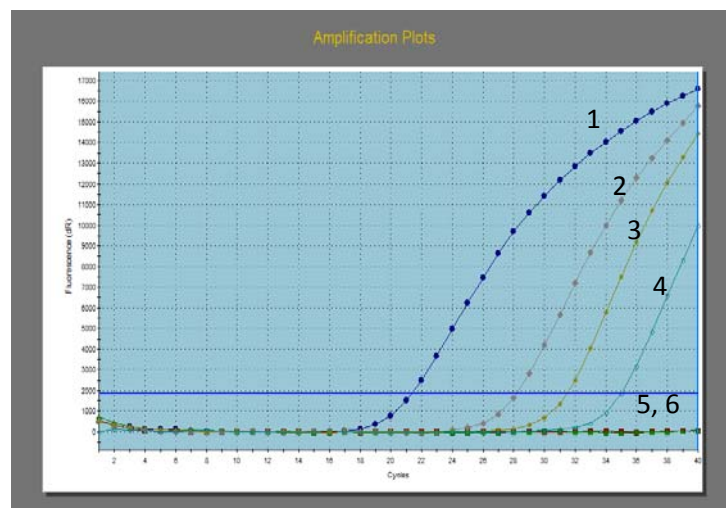
Rycina 34. Wynik próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z filtrów powietrza. Ścieżki: 1 – marker wielkości (pUC19 DNA/Mspl (HpaII) Marker, 23, Fermentas, Litwa), 2 – kontrola dodatnia *T. gondii*, 3 – próba zawierająca 10^4 oocyst, 4 – próba zawierająca 10^3 oocyst, 5 - próba zawierająca 10^2 oocyst, 6 – próba zawierająca 10 oocyst, 7 – kontrola ujemna.

5.5.2.2 Wyniki Real-time PCR

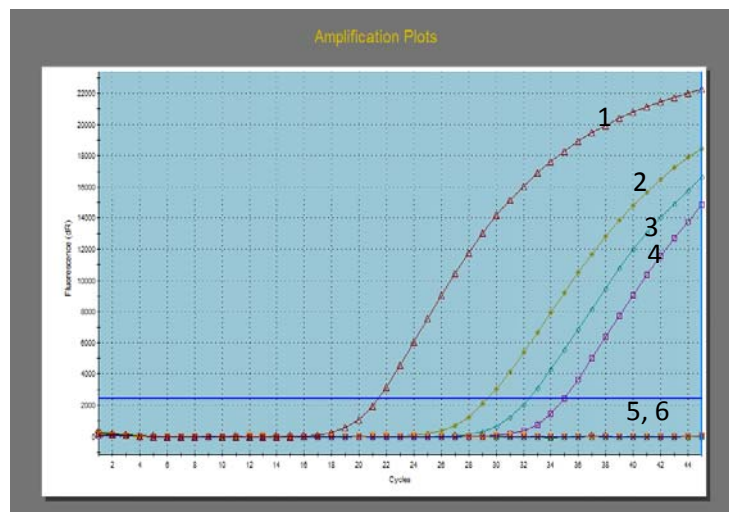
Określono granice wykrywalności oocyst *T. gondii* z prób odzyskowych za pomocą Real-time PCR (Materiały i metody, 4.4.2.2) oraz ustalono powtarzalność wyników (Tabela 26) (Ryciny 35 – 39).

Tabela 26. Wykrywalność oocyst *T. gondii* z prób środowiskowych za pomocą Real-time PCR.

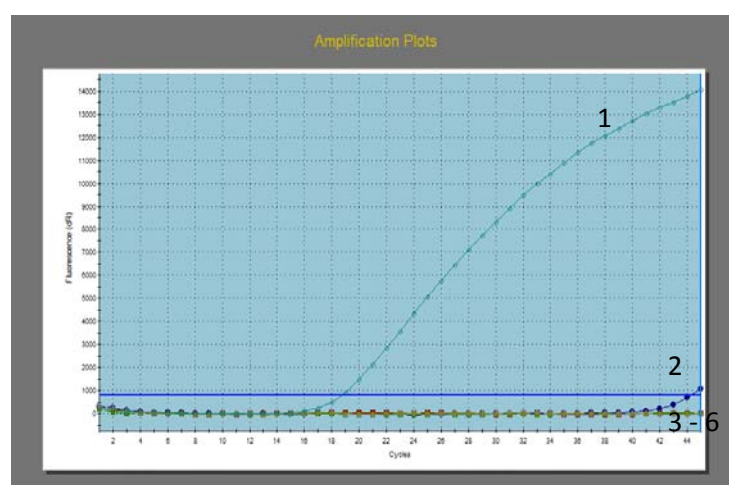
rodzaj próby odzyskowej		rodzaj materiału z jakiego izolowano DNA	liczba prób dodatnich / liczba prób badanych			
			liczba oocyst <i>T. gondii</i> w inokulum			
			10 ⁴	10 ³	10 ²	10
piach		zawiesina materiału odzyskanego po flotacji	3/3	3/3	2/3	0
rzodkiewka		zawiesina osadu uzyskanego po flokulacji	3/3	3/3	2/3	0
truskawki		zawiesina osadu uzyskanego po flokulacji	3/3	0	0	0
woda	destylowana	zawiesina osadu uzyskanego po filtracji i IMS	3/3	3/3	3/3	1/3
	pitna z kranu		3/3	3/3	2/3	1/3
	powierzchniowa		3/3	1/3	1/3	0
filtr żelowy		zawiesina osadu uzyskanego po wirowaniu	3/3	3/3	0	0



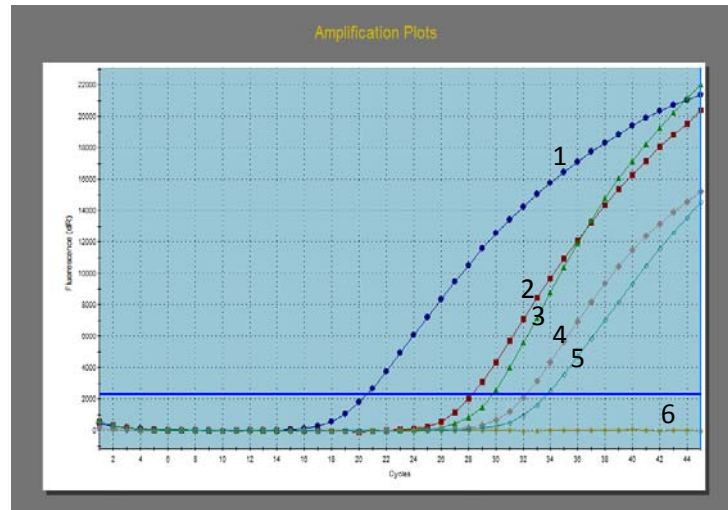
Rycina 35. Wynik próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z ziemi. Krzywe amplifikacji genu B1 *T. gondii* w Real-time PCR. Krzywe: 1 – kontrola dodatnia *T. gondii*, 2 - próba zawierająca 10⁴ oocyst, 3 – próba zawierająca 10³ oocyst, 4 - próba zawierająca 10² oocyst, 5 – próba zawierająca 10 oocyst, 6 – kontrola ujemna.



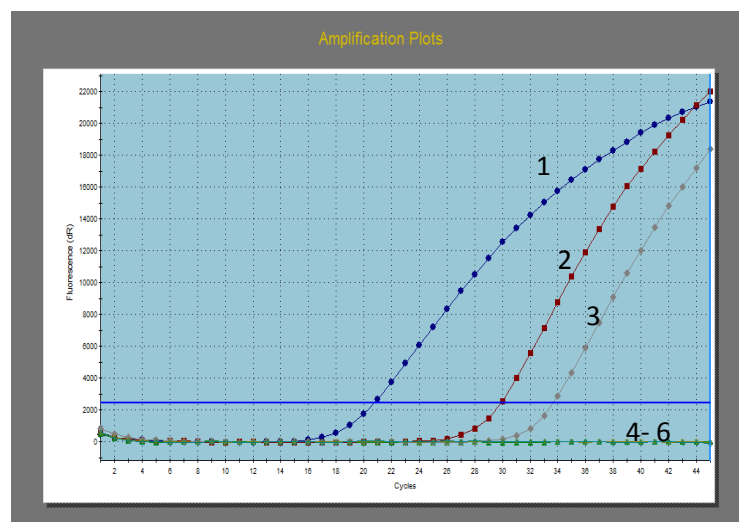
Rycina 36. Wynik próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z warzyw (rzodkiewki). Krzywe amplifikacji genu B1 *T. gondii* w Real-time PCR. Krzywe: 1 – kontrola dodatnia *T. gondii*, 2 - próba zawierająca 10^4 oocyst, 3 – próba zawierająca 10^3 oocyst, 4 - próba zawierająca 10^2 oocyst, 5 – próba zawierająca 10 oocyst, 6 – kontrola ujemna.



Rycina 37. Wynik próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z owoców (truskawki). Krzywe amplifikacji genu B1 *T. gondii* w Real-time PCR. Krzywe: 1 – kontrola dodatnia *T. gondii*, 2 - próba zawierająca 10^4 oocyst, 3 – próba zawierająca 10^3 oocyst, 4 - próba zawierająca 10^2 oocyst, 5 – próba zawierająca 10 oocyst, 6 – kontrola ujemna.



Rycina 38. Wynik próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z wody. Krzywe amplifikacji genu B1 *T. gondii* w Real-time PCR. Krzywe: 1 – Kontrola dodatnia *T. gondii*, 2 - próba zawierająca 10^4 oocyst, 3 – próba zawierająca 10^3 oocyst, 4 - próba zawierająca 10^2 oocyst, 5 – próba zawierająca 10 oocyst, 6 – kontrola ujemna.



Rycina 39. Wynik próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z filtrów żelowych. Krzywe amplifikacji genu B1 *T. gondii* w Real-time PCR. Krzywe: 1 – Kontrola dodatnia *T. gondii*, 2 - próba zawierająca 10^4 oocyst, 3 – próba zawierająca 10^3 oocyst, 4 - próba zawierająca 10^2 oocyst, 5 – próba zawierająca 10 oocyst, 6 – kontrola ujemna.

5.5.2.3 Wpływ procedur odzysku oocyst *T. gondii* na straty materiału

Za pomocą metod molekularnych określono przybliżone straty materiału (oocyst *T. gondii*), jakie mogą być wywołane procedurami odzysku oocyst z poszczególnych prób środowiskowych (Tabela 27).

Tabela 27. Przybliżone straty materiału powodowane procedurami odzysku oocyst *T. gondii*. + oznaczono wynik dodatni uzyskany w badaniu molekularnym (PCR oraz Real-time PCR), (+) oznaczono wynik dodatni uzyskany tylko w reakcji Real-time PCR, - oznaczono wynik negatywny badania molekularnego.

warunki eksperymentu	rodzaj próby badanej	wynik dodatni badania molekularnego			
		liczba oocyst <i>T. gondii</i> w inokulum			
		10 ⁴	10 ³	10 ²	10
izolacja DNA bez etapów odzyskiwania oocyst z materiału środowiskowego	zawiesina oocyst <i>T.gondii</i> w wodzie destylowanej	+	+	+	+
izolacja DNA z prób odzyskowych	piach	+	+	(+)	-
	rzodkiewka	+	+	(+)	-
	truskawki	+	-	-	-
	woda destylowana	+	+	+	(+)
	filtr żelowy	+	+	-	-

5.5.3 Porównanie granicy detekcji *T. gondii* metodą mikroskopową i molekularną

Porównano efektywność zastosowanych metod detekcji (mikroskopowej, PCR i Real-time PCR) w wykrywaniu *Toxoplasma gondii* z poszczególnych prób odzyskowych (Tabela 28).

Tabela 28. Porównanie granicy detekcji pasożyta *T. gondii* z odzyskowych prób środowiskowych metodą mikroskopową, PCR i Real-time PCR. NB oznacza, że nie wykonano takiego testu.

rodzaj próby odzyskowej	liczba wykrywanych oocyst <i>T. gondii</i> w próbie		
	metoda detekcji <i>T. gondii</i>		
	mikroskopowa	PCR	Real-time PCR
piach	10 ⁴	10 ³	10 ²
rzodkiewka	10 ⁴	10 ³	10 ²
truskawki	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
woda destylowana	10 ⁴	10 ²	10
woda pitna z kranu	NB	10 ²	10
woda powierzchniowa	NB	10 ³	10 ²
filtr żelowy	10 ⁴	10 ³	10 ³

Przeprowadzone badania wykazały, że metody molekularne są czulsze w wykrywaniu oocyst *T. gondii* w próbach środowiskowych niż metody mikroskopowe. Przy czym, Real-time PCR jest czulszy niż PCR z wyjątkiem prób truskawek oraz filtrów żelatynowych. Wykazano również, że procedury odzysku powodują utratę części oocyst.

5.6 WYNIKI BADANIA PRÓB ŚRODOWISKOWYCH

5.6.1 Wyniki badania prób ziemi

5.6.1.1 Odsetek prób dodatnich uzyskanych techniką PCR i Real-time PCR

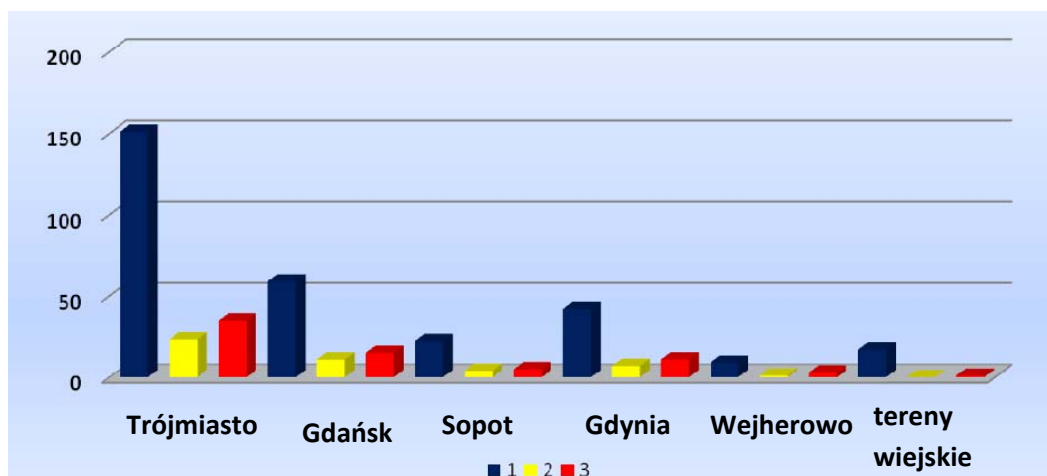
Łącznie przebadano 151 prób ziemi zebranych na terenie województwa pomorskiego (Trójmiasto i okolice) oraz warmińsko-mazurskiego (okolice Elbląga). Wyniki przedstawiono w Tabeli 29, 30 i 31 oraz na Rycinach 40-43. Pełne zestawienie prób dodatnich w PCR oraz Real-time PCR umieszczono w Załączniku 6.

Tabela 29. Udział prób dodatnich w poszczególnej grupie badanej ziemi.

rodzaj próby		liczba prób zbadanych	próby dodatnie w PCR		próby dodatnie w Real-time PCR	
			liczba	%	liczba	%
piach miejski	piaskownice	93	15	16,1	22	23,6
	piach osiedlowy łącznie	33	8	24,2	12	36,4
	ogródki przybłokowe	13	1	7,7	4	30,8
	śmietniki	10	3	30	4	40
	hałdy piasku gospodarczego	5	3	60	3	60
	podwórka miejskie	5	1	20	1	20
	działki miejskie	8	0	-	0	-
	piach miejski łącznie	134	23	17,1	34	25,7
piach wiejski		17	0	-	1	5,9
razem		151	23	15,2	35	23,2

Tabela 30. Zanieczyszczenie ziemi oocystami *T. gondii* w badanych miejscowościach.

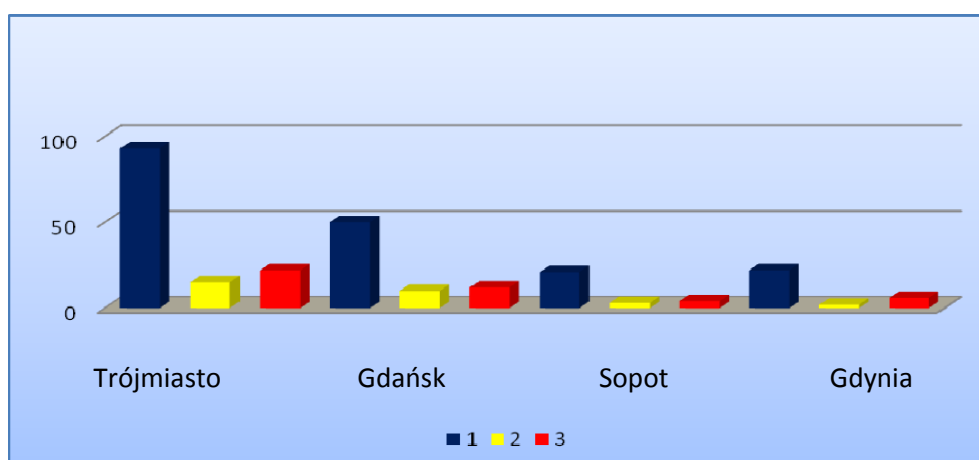
miejscowość	liczba prób badanych	próby dodatnie w PCR		próby dodatnie w Real-time PCR	
		liczba	%	liczba	%
Gdańsk	59	11	18,6	15	25,4
Gdynia	42	7	16,6	11	26,2
Sopot	22	4	18,2	5	22,7
Wejherowo	9	1	11,1	3	33,3
Elbląg	2	0	-	0	-
wsie	17	0	-	1	5,9
razem	151	23	15,2	35	23,2



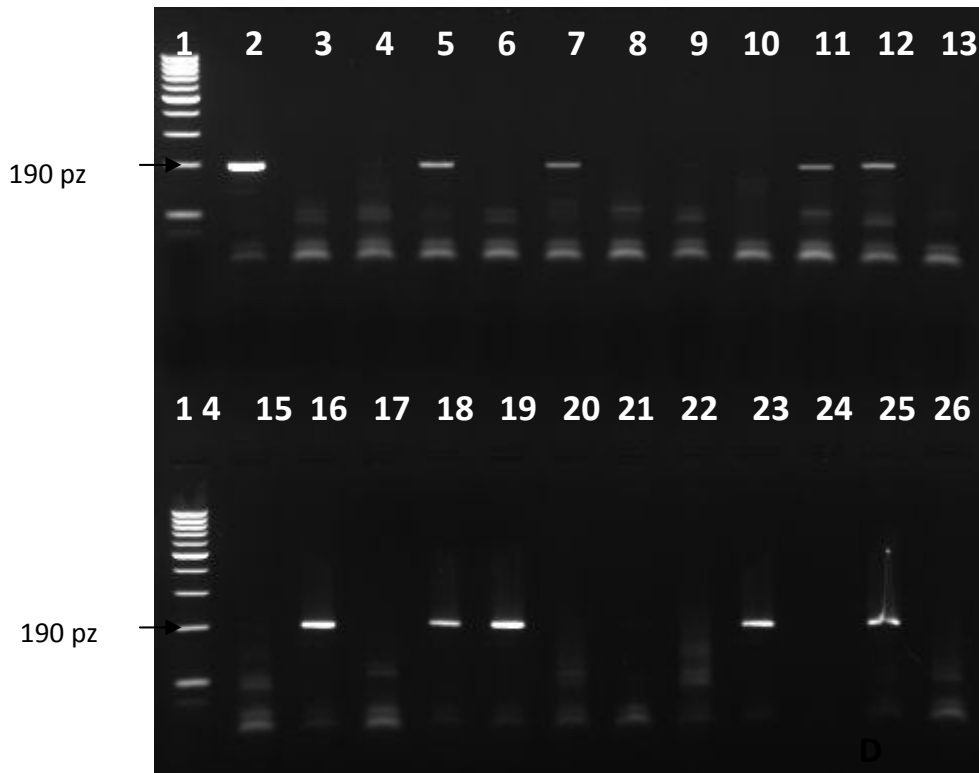
Rycina 40. Zanieczyszczenie ziemi oocystami *T. gondii* w badanych miejscowościach: 1 – próby badane, 2 – próby dodatnie w reakcji PCR, 3 – próby dodatnie w Real-time PCR.

Tabela 31. Zanieczyszczenie piaskownic w Trójmieście oocystami *T. gondii*.

miasto	liczba prób zbadanych	próby dodatnie w PCR		próby dodatnie w Real-time PCR	
		liczba	%	liczba	%
Gdańsk	50	10	20	12	24
Gdynia	22	2	9,1	6	12
Sopot	21	3	14,3	4	19
Trójmiasto (razem)	93	15	16,1	22	23,6

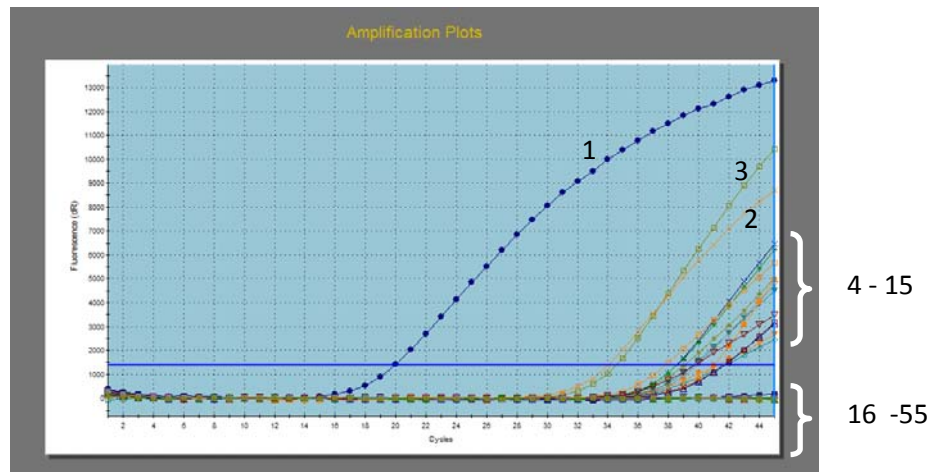


Rycina 41. Stopień zanieczyszczenia piaskownic oocystami *T. gondii* w Trójmieście: 1 – próby badane, 2 – próby dodatnie w PCR, 3 – próby dodatnie w Real-time PCR.



Rycina 42. Przykładowy wynik amplifikacji fragmentu genu B1 *T. gondii* techniką PCR z prób środowiskowych ziemi. Ścieżki: 1, 14 – marker wielkości (pUC19 DNA/MspI (HpaI) Marker, 23, Fermentas, Litwa), 2 – kontrola dodatnia *T. gondii*, 3 – Gdynia, ul. Waniliowa, piaskownica, 4 - Gdynia, ul. Balladyny, piaskownica, 5 - Gdynia, ul. Makuszyńskiego, piaskownica, 6 - Gdynia, ul. Nowowiczińska, 7 - Gdynia, ul. Powstania Styczniowego, IMMiT, piach gospodarczy, 8 - Gdynia, ul. Imbirowa, piaskownica, 9 - Gdynia, ul. Baczyńskiego, piaskownica, 10 - Gdynia, ul. Cechowa, piaskownica, 11 - Sopot, ul. 23 Marca, piaskownica, 12 - Gdynia, ul. Powstania Styczniowego, IMMiT, piach gospodarczy, 13 - Gdynia, ul. Kcyńska, piaskownica, 15 - Gdynia, ul. Porazińskiej, piaskownica, 16 - Gdynia, ul. Powstania Styczniowego, IMMiT, piach gospodarczy, 17 - Gdynia, ul. Morska, piaskownica, 18 - Gdynia, Park Chyloński, piaskownica, 19 - Gdynia Chylonia, ul. Tczewska, ogródek kwiatowy, 20 - Wejherowo, ul. Harcerska, piach przy śmietniku, 21 - Wejherowo, ul. Harcerska, piach przybłokowy, 22 - Gdynia, ul. Powstania wielkopolskiego 97, piach przybłokowy, 23 - Gdynia Chylonia, ul. Chylońska, piach przybłokowy, 24 – Gdynia, ul. Powstania Śląskiego, piach przybłokowy, 25 - Wejherowo, ul. Chopina, piach przy śmietniku, 26 - kontrola ujemna.

Pozostałe elektroforogramy ilustrujące wyniki PCR dla prób ziemi znajdują się w Załączniku 16.



Rycina 43. Wynik amplifikacji fragmentu genu B1 *T. gondii* techniką Real-time PCR z prób środowiskowych ziemi. 1 - kontrola dodatnia *T. gondii*, 2 – Gdynia, ul. Powstania Styczniowego, IMMiT, 3 – Gdańsk Zaspą, ul. Dywizjonu 303, 4 - Gdynia, ul. Powstania Styczniowego, IMMiT, 5 - Wejherowo, ul. Harcerska, 6 - Sopot, ul. 23 Marca, 7 - Wejherowo, ul. Chopina, 8 - Gdynia, ul. Hutnicza, 9 - Gdynia, ul. Porazińskiej, 10 - Sopot, ul. Żeromskiego, 11 - Gdańsk Przymorze, ul. Sztormowa, 12 - Gdynia, ul. Sezamowa, 13 - Gdynia, ul. Tuwima, 14 - Rybno (gospodarstwo1), 15 - Gdańsk Chełm, ul. Więckowskiego, 16 - 54 próby ujemne, 55 - kontrola ujemna.

Pozostałe wykresy ilustrujące wyniki PCR dla prób ziemi znajdują się w Załączniku 17.

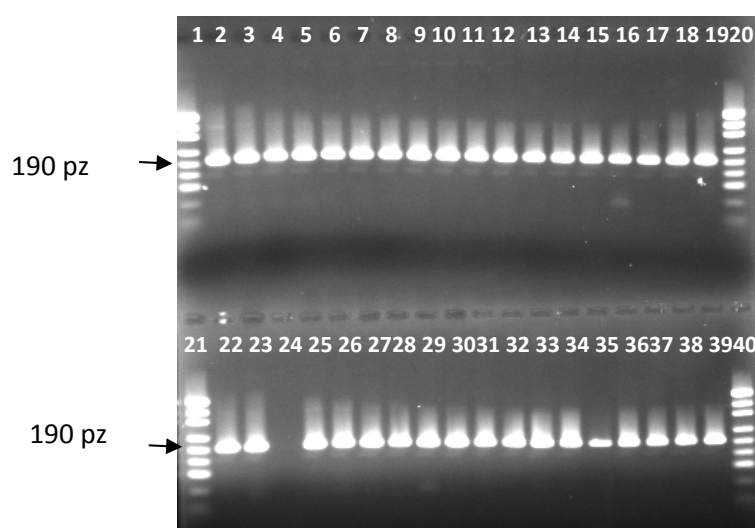
Przeprowadzone badania molekularne wykazały zanieczyszczenie badanych prób ziemi pasożytem *T. gondii*. Odsetek prób dodatnich zebranych w miastach wynosi 17,1% w PCR i 25,7% w Real-time PCR, podczas gdy wśród prób zebranych z terenów wiejskich tylko jedna okazała się dodatnia (tylko w Real-time PCR).

5.6.1.2 Wyniki testu inhibicji PCR

Inhibicję PCR zanotowano w 5 próbach badanej ziemi: dwie próby pochodziły z miejskich ogródków działkowych, natomiast trzy pozostałe z wiejskich ogrodów przydomowych (Tabela 32, Rycina 44). W próbach z piaskownic natomiast nie zanotowano inhibicji PCR.

Tabela 32. Wyniki testu na inhibicję PCR w próbach ziemi.

rodzaj próby	liczba badanych prób ziemi	próby z inhibicją PCR	
		liczba	%
piaskownice	93	0	-
piach miejski	33	0	-
działki miejskie	8	2	25
piach wiejski	17	3	17,6
razem	151	5	3,3



Rycina 44. Kontrola inhibicji dla prób środowiskowych ziemi. Ścieżki: 2 - kontrola dodatnia *T. gondii*, 20, 21, 40 – marker wielkości (pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23, Fermentas, Litwa), 24 – próba z inhibicją PCR, 3 - 19, 22, 23, 25 -39 – brak inhibicji PCR.

5.6.1.3 Wyniki genotypowania prób dodatnich

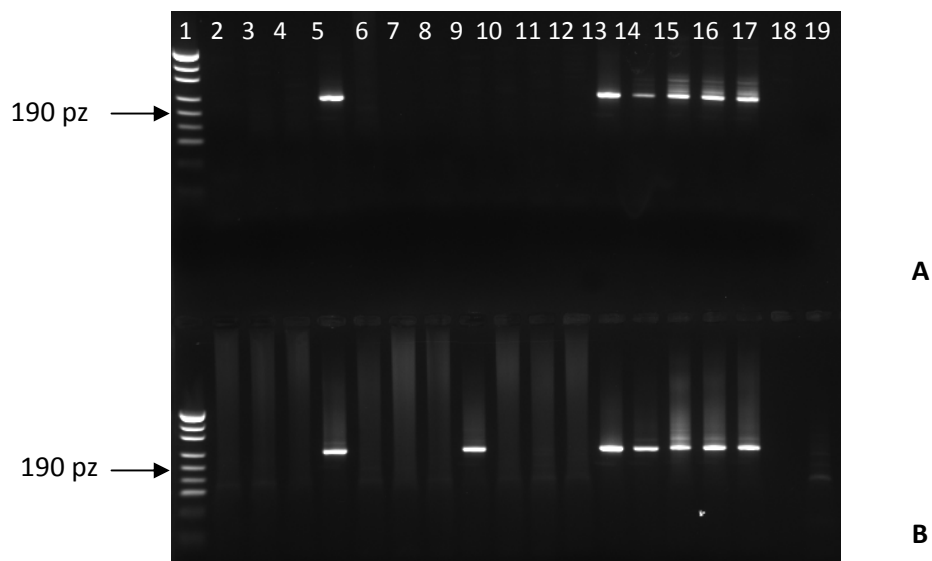
5.6.1.3.1 Wyniki RFLP

Wszystkie próby dodatnie wyselekcjonowane na podstawie amplifikacji fragmentów genu B1 *T. gondii* (PCR), poddano próbie genotypowania. Wykonano reakcje amplifikacji fragmentów genu SAG2 *T. gondii* i następnie uzyskane produkty reakcji poddano analizie restrykcyjnej (Materiały i metody, 4.13). Genotyp wykrytych pasożytów możliwy był do ustalenia tylko w przypadku tych prób, w których uzyskano pozytywną amplifikację fragmentów genu SAG2 z końca 3' oraz 5' (Rycina 45, Załącznik 7).

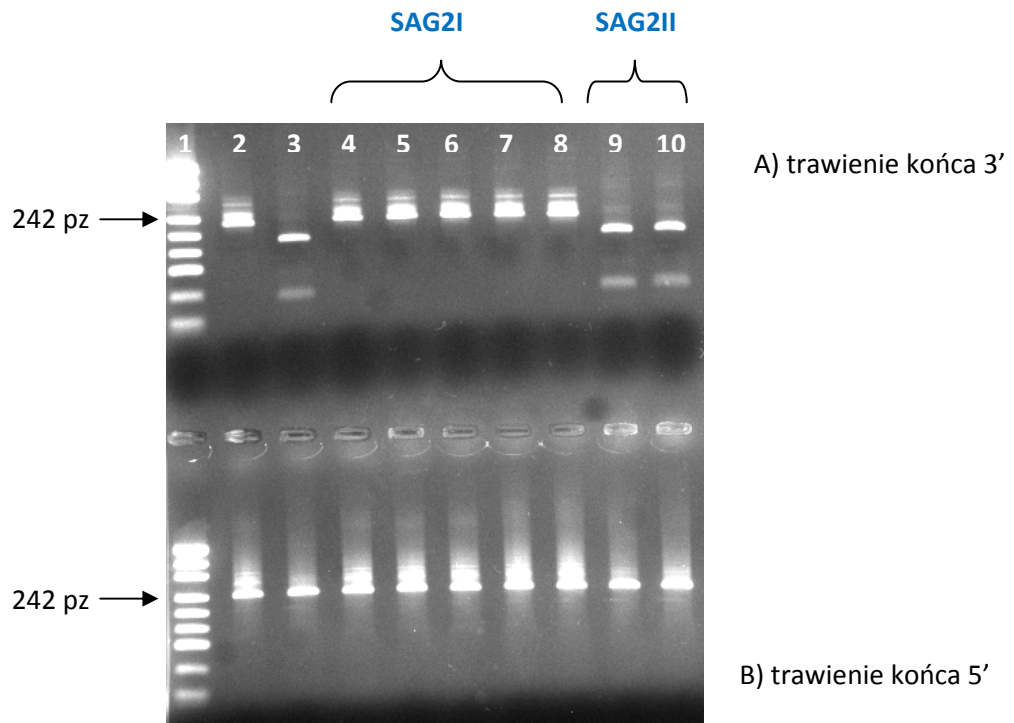
Wyniki analizy restrykcyjnej wykazały, że badane próby zanieczyszczone były genotypami SAG2I oraz SAG2II pasożyta (Rycina 46). Próby te pochodziły z piaskownic dla dzieci oraz piasku osiedlowego (Tabela 33 oraz Załącznik 7). Dokładne zestawienie wszystkich genotypowanych prób środowiskowych umieszczono w Załączniku 7.

Tabela 33. Wynik genotypowania *T. gondii* izolowanego z prób środowiskowych gleby. I – genotyp SAG2 I, II – genotyp SAG2II.

rodzaj próby badanej	liczba badanych prób	liczba prób dodatnich w PCR z genem B1	liczba prób dodatnich w PCR z genem SAG2	ustalony genotyp	
				I	II
piaskownice	22	15	5	4	1
piach osiedlowy	13	8	4	2	2
razem	35	23	9	6	3



Rycina 45. Wynik amplifikacji fragmentów genu SAG2 przeprowadzonej na próbach ziemi wybranych do genotypowania *T. gondii* (przykładowy elektroforogram): A) amplifikacja fragmentu końca 3' genu, B) amplifikacja fragmentu końca 5' genu. Ścieżki: 1 – marker wielkości (pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23, Fermentas, Litwa), 2 – 18 próby ziemi, 19 – kontrola ujemna.



Rycina 46. Wynik RFLP (przykładowy elektroforogram): A) trawienie końca 3'; B) trawienie końca 5' amplifikowanego fragmentu genu SAG2 *T. gondii*. Ścieżki: 1 – marker wielkości (pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23, Fermentas, Litwa), 2 - kontrola dodatnia genotyp SAG2I, 2 – kontrola dodatnia genotyp SAG2II, 4 - 8 próby środowiskowe z genotypem SAG2I, 9, 10 – próby środowiskowe z genotypem SAG2II.

5.6.1.3.2 Wyniki sekwencjonowania prób poddanych badaniu RFLP

Wszystkie próby, w których uzyskano pozytywną amplifikację genu SAG2 *T. gondii* poddano sekwencjonowaniu na analizatorze DNA (Materiały i metody, 4.12).

Analiza uzyskanych sekwencji pod kątem obecności miejsc restrykcyjnych dla enzymów *CfoI* w przypadku fragmentu końca 3' oraz *Sau3AI* w przypadku fragmentu końca 5' genu SAG2 *T. gondii* potwierdziła wyniki analizy restrykcyjnej.

5.6.1.4 Wyniki analizy ilościowej techniką Real-time QPCR

Wszystkie próby, które dały wynik pozytywny w Real-time PCR, poddano ilościowemu badaniu za pomocą Real-time QPCR (4.11.5). Wykorzystując metodę krzywej standardowej (Rycina 47) wyznaczono początkową liczbę kopii DNA w próbce badanej i na tej podstawie oszacowano przybliżoną liczbę oocyst *T. gondii*, jaką mogła być zanieczyszczona próba

(Tabela 34). W obliczeniach uwzględniono przybliżoną wielkość strat na poziomie odzyskiwania oocyst *T. gondii* z prób badanych (liczba oocyst wykrywanych przez Real-time PCR bez etapów odzyskiwania w stosunku do liczby oocyst wykrywanych po procedurach odzysku). Wyliczenia nie biorą pod uwagę działania inhibitorów, które mogą być ewentualnie obecne w próbce badanej.

Przyjmując, że: a) najmniejsza liczba oocyst *T. gondii* wykrywana metodą Real-time PCR bez uwzględnienia procedury odzysku wynosi 10, b) najmniejsza liczba oocyst *T. gondii* wykrywana metodą Real-time PCR z uwzględnieniem procedury odzysku wynosi 100 (Wyniki, 5.5.2.3, Tabela 27) - straty materiału są dziesięciokrotne. Zatem ładunek patogenny próby badanej (ŁP) można wyliczyć ze wzoru:

$$\text{ŁP} = N \times 10 / 35 \times 8$$

N - liczba kopii DNA wyznaczonej w Real-time QPCR

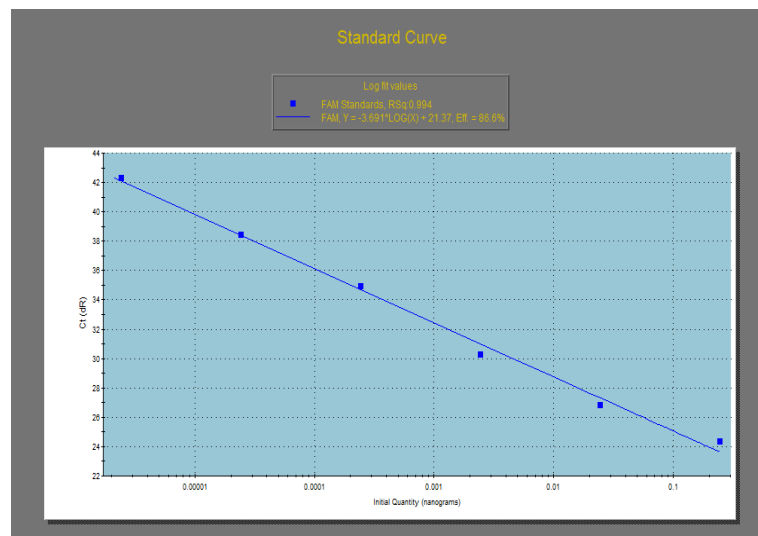
35 – liczna kopii genu B1/komórkę pasożyta

8 – liczba sporozoitów w oocyście

Tabela 34. Stopień zanieczyszczenia prób środowiskowych ziemi oocystami *T. gondii*.

rodzaj miejsca, z którego pobrano próbę	liczba prób zanieczyszczonych oocystami <i>T. gondii</i> (wynik Real-time PCR)				
	liczba prób dodatnich	< 10 oocyst/próbę	10 - 100 oocyst/próbę	100 - 1000 oocyst/próbę	>1000 oocyst/próbę
piaskownice	22	14	4	3	1
ziemia przy śmietniku	4	1	1	2	0
piach gospodarczy	3	0	0	3	0
ogródek przybłokowy	4	3	0	1	0
ziemia ogrodowa	2	1	0	1	0
łącznie	35	17	6	11	1

Dokładne zestawienie wszystkich prób ziemi, dla których wyliczono wartość ŁP umieszczono w Załączniku 8.



Rycina 47. Przykładowa krzywa standardowa Real-time QPCR wykreślona na podstawie parametrów amplifikacji standardów (klonowana kontrola *T. gondii*).

Wyniki badań pokazały, że większość badanych prób zanieczyszczona była niewielką liczbą oocyst *T. gondii* (poniżej 10). Z drugiej strony podobny udział mają próby, w których zanotowano zanieczyszczenie kilkudziesięcioma lub kilkuset oocystami. Tylko w jednym przypadku kontaminacja była bardzo wysoka (powyżej 1000 oocyst – próba pochodząca z piaskownicy w Gdańsku, nr matrycy 76).

5.6.1.5 Wyniki badań mikroskopowych

W żadnym z wykonanych preparatów mikroskopowych nie wykryto oocyst *T. gondii*. Ich rozpoznanie pod mikroskopem następuje pewne trudności, bowiem często dochodzi do zniekształcania oocyst, a obraz jest nieczytelny (np. przez postaci dojrzałe, larwy oraz jaja nicieni wolnożyjących w ziemi). Największe trudności sprawia odklejenie oocyst od drobin ziemi, a następnie ich oddzielenie w metodzie flokulacji.

5.6.2 Wyniki badania prób warzyw i owoców

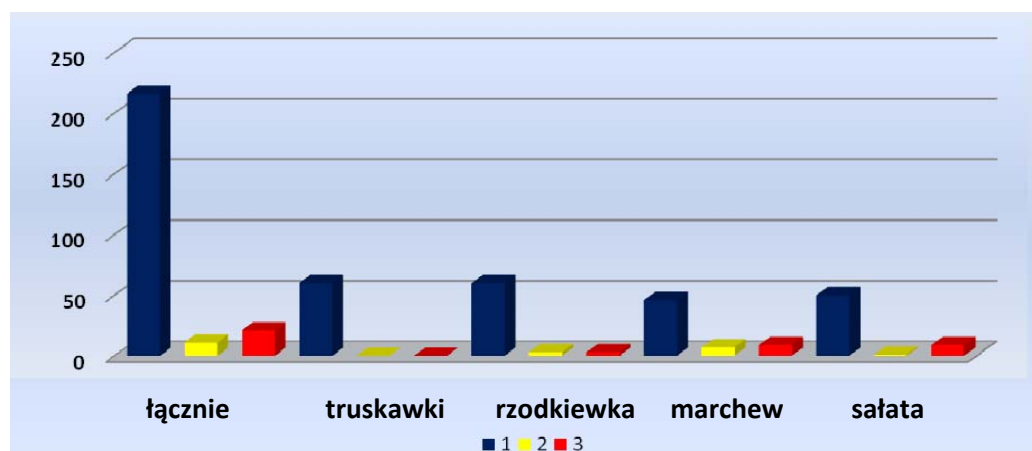
5.6.2.1 Odsetek prób dodatnich uzyskanych metodą PCR i Real-time

PCR

Łącznie zbadano 216 prób owoców i warzyw, w tym 175 prób kupowanych w sklepach oraz na bazarach, targowiskach i 41 prób zebranych z przydomowych ogródków i działek. Wyniki PCR przedstawione są w Tabeli 35 i 36 oraz na Rycinach 48 – 50. Dokładne zastawienie wszystkich prób dodatnich warzyw i owoców umieszczono w Załączniku 9.

Tabela 35. Wyniki badania prób owoców i warzyw metodą RCR i Real-time PCR.

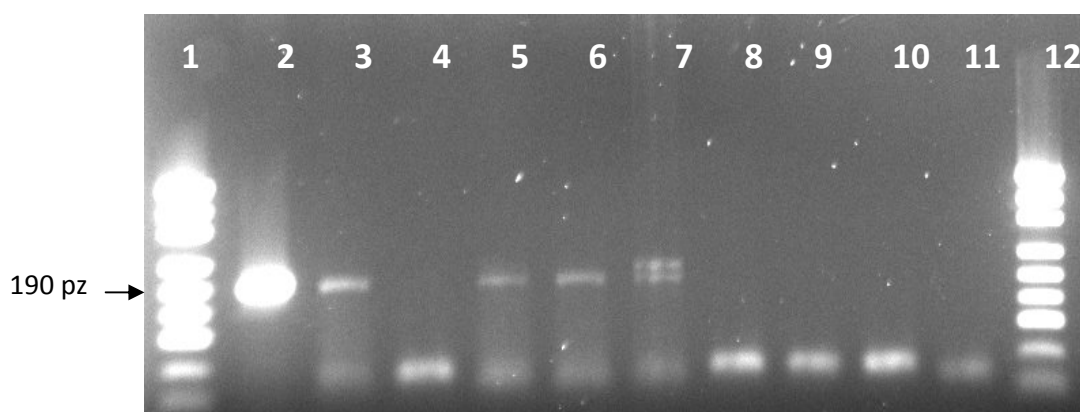
rodzaj próby	liczba badanych prób	PCR		Real-time PCR	
		liczba prób dodatnich	%	liczba prób dodatnich	%
truskawki	60	0	-	0	-
rzodkiewka	60	3	5	3	5
marchew	46	7	15,2	9	19,5
sałata	50	1	2	9	18
razem	216	11	5,1	21	9,7



Rycina 48. Zanieczyszczenie badanych prób warzyw i owoców oocystami *T. gondii*. 1 – liczba prób badanych, 2 – wynik PCR, 3 – wynik Real-time PCR.

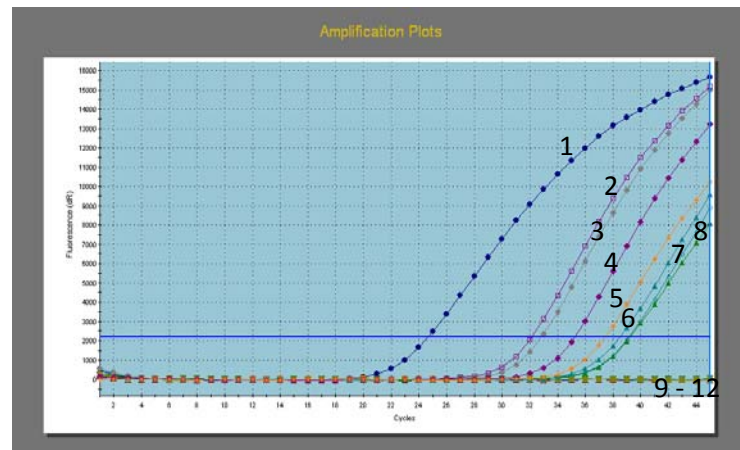
Tabela 36. Wyniki badania prób owoców i warzyw kupowanych w sklepach oraz zebranych z działek/ogrodów.

rodzaj próby	próby ze sklepów					próby z działek				
	liczba prób badanych	dodatni wynik PCR		dodatni wynik Real-time PCR		liczba prób badanych	dodatni wynik PCR		dodatni wynik Real-time PCR	
		liczba	%	liczba	%		liczba	%	liczba	%
truskawki	59	0	-	0	-	1	0	-	0	-
rzodkiewka	54	3	5,5	3	5,5	6	0	-	0	-
marchew	27	4	14,8	4	14,8	19	3	15,8	5	26,3
sałata	35	0	-	7	20	15	1	6,7	2	13,3
razem	175	7	4	14	8	41	4	9,7	7	17,1



Rycina 49. Wynik amplifikacji fragmentu genu B1 *T. gondii* techniką PCR z prób środowiskowych warzyw i owoców. Ścieżki: 1,12 - marker wielkości, 2 - kontrola dodatnia *T. gondii*, 3 – sałata /Kostkowo, gospodarstwo 1/, 4 – rzodkiewka /Rybno, gospodarstwo/, 5 - marchew /Kostkowo, gospodarstwo 2/, 6 - marchew /Oleśno, gospodarstwo/, 7 - marchew /Oleśno, gospodarstwo/, 8 - marchew /Gronowo Elbląskie gospodarstwo1/, 9 - rzodkiewka /Gronowo Elbląskie, gospodarstwo 1/, 10 - sałata /Gronowo Elbląskie, gospodarstwo 1/, 11 - marchew /Gronowo Elbląskie, gospodarstwo 2/.

Pozostałe elektroforogramy pokazujące wyniki PCR dla prób warzyw i owoców zamieszczono w Załączniku 17.



Rycina 50. Wynik amplifikacji fragmentu genu B1 *T. gondii* techniką Real-time PCR z prób środowiskowych owoców i warzyw. Krzywe: 1 - kontrola dodatnia *T. gondii*, 2 - marchew, Chynów, gospodarstwo, 3 - marchew, Kostkowo, gospodarstwo 1, 4 - marchew, Oleśno, gospodarstwo, 5 - sałata, Chynów, gospodarstwo, 6 - sałata, Kostkowo, gospodarstwo 1, 7 - marchew, Kostkowo, gospodarstwo 2, 8 - marchew, Oleśno, gospodarstwo, 9 - 11 - próby ujemne, 12 - kontrola ujemna.

Pozostałe wykresy ilustrujące wyniki badania prób warzyw i owoców techniką Real-time PCR znajdują się w Załączniku 17.

Odsetek prób dodatnich uzyskanych w PCR wyniósł 5,1 %, a w Real-time PCR 9,7 %. Jedynie w przypadku prób truskawek nie zanotowano żadnego wyniku dodatniego.

5.6.2.2 Wyniki testu inhibicji PCR

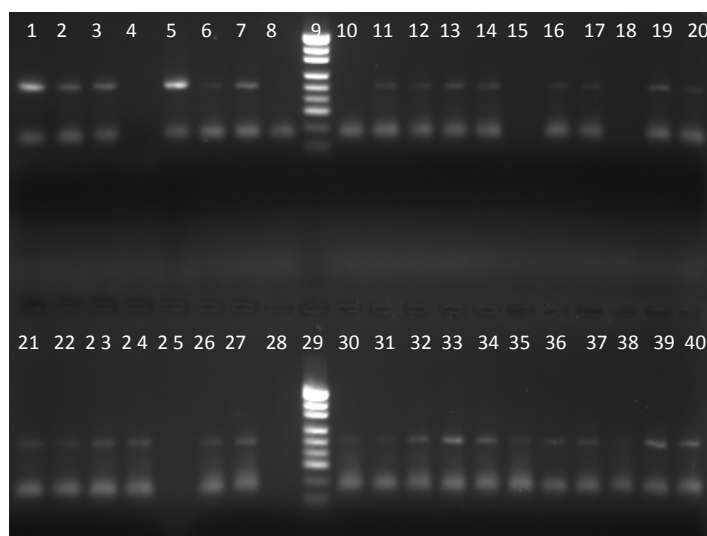
Inhibicję PCR zanotowano łącznie w 62 próbach warzyw i owoców, w tym w grupie warzyw i owoców działkowych: 8 (19,5 %), a w sklepowych: 54 (30, 8%) (Tabela 37, 38 i Rycina 51).

Tabela 37. Wyniki testu na inhibicję PCR w próbach owoców i warzyw.

rodzaj próby	liczba prób badanych	liczba prób z inhibicją PCR	% prób z inhibicją PCR
truskawki	60	33	55
rzodkiewka	60	14	23,3
sałata	50	9	18
marchew	46	6	13
razem	216	62	28,7

Tabela 38. Udział prób z odnotowaną inhibicją PCR w grupie badanych warzyw i owoców kupowanych w sklepach oraz zbieranych z działek/ogrodów.

rodzaj próby	próby ze sklepów			próby z działek		
	liczba prób badanych	próby z inhibicją PCR		liczba prób badanych	próby z inhibicją PCR	
		liczba	%		liczba	%
truskawki	59	32	54,2	1	1	100
rzodkiewka	54	14	25,9	6	0	-
marchew	27	2	7,4	19	4	21,0
sałata	35	6	17,1	15	3	20
razem	175	54	30,8	41	8	19,5



Rycina 51. Kontrola inhibicji dla prób środowiskowych warzyw i owoców. Ścieżki: 1 - kontrola dodatnia *T. gondii*, 9, 29 – marker wielkości, 4, 8, 10, 15, 18, 25, 28 – próby z inhibicją PCR, 2, 3, 5 – 7, 11 – 14, 16, 17, 19 – 24, 26, 27, 30 – 40 – brak inhibicji PCR.

5.6.2.3 Wyniki genotypowania prób dodatnich

5. 6.2.3.1 Wyniki RFLP

Wszystkie próby dodatnie wyselekcjonowane na podstawie PCR opartej na amplifikacji fragmentów genu B1 *T. gondii* poddano genotypowaniu. Wykonano reakcje amplifikacji fragmentów genu SAG2 *T. gondii* i następnie

uzyskane produkty reakcji poddano analizie restrykcyjnej (Materiały i metody, 4.13). Genotyp wykrytych pasożytów możliwy był do ustalenia tylko w przypadku tych prób, w których uzyskano pozytywną amplifikację fragmentów genu SAG2 *T. gondii* z końca 3' oraz 5' (Załącznik 10). Wyniki analizy restrykcyjnej wykazały, że badane próby zanieczyszczone były genotypami SAG2I oraz SAG2II pasożyta (Załącznik 10).

5.6.2.3.2 Wyniki sekwencjonowania prób poddanych badaniu RFLP

Wszystkie próby, w których uzyskano pozytywną amplifikację genu SAG2 *T. gondii* poddano sekwencjonowaniu na analizatorze DNA (Materiały i metody, 4.12). Analiza uzyskanych sekwencji pod kątem obecności miejsc restrykcyjnych dla enzymów *CfoI* w przypadku fragmentu końca 3' oraz *Sau3AI* w przypadku fragmentu końca 5' genu SAG2 *T. gondii* potwierdziła wyniki analizy restrykcyjnej.

5.6.2.4 Wyniki analizy ilościowej techniką Real-time Q PCR

Wszystkie próby dodatnie uzyskane w Real-time PCR, poddano ilościowej reakcji Real-time QPCR. Wykorzystując metodę krzywej standardowej (Rycina 52) wyznaczono początkową liczbę kopii DNA w próbce badanej i na tej podstawie oszacowano liczbę oocyst *T. gondii*, jaka mogła być zanieczyszczona próba (z uwzględnieniem strat spowodowanych procedurą odzysku oocyst oraz izolacji DNA) (Załącznik 11).

Wiedząc, że: najmniejsza liczba oocyst *T. gondii* wykrywana metodą Real-time PCR bez uwzględnienia procedury odzysku = 10, a z uwzględnieniem procedury odzysku = 100 dla rzodkiewek, 10000 dla truskawek (Wyniki, 5.5.2.3 Tabela 27), przybliżone straty materiału są dziesięciokrotne dla rzodkiewek/marchwi i tysięczkrotne dla truskawek. Zatem ładunek patogenny próby badanej (ŁP) można wyliczyć ze wzoru:

Dla rzodkiewek/marchwi:

$$\text{ŁP} = N \times 10 / 35 \times 8$$

Dla truskawek:

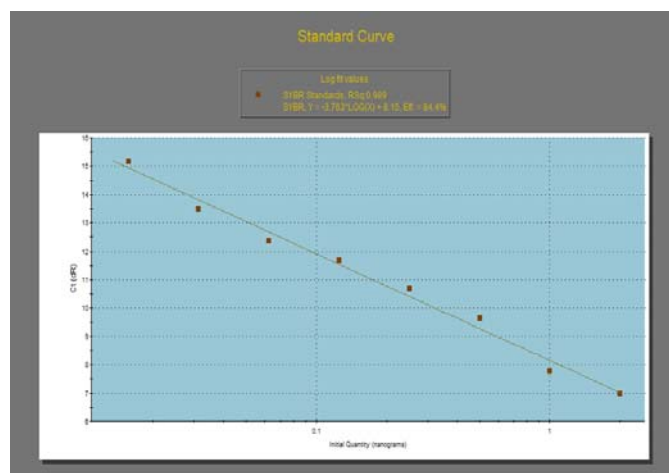
$$\text{ŁP} = N \times 1000 / 35 \times 8$$

N - liczba kopii DNA wyznaczonej w Real-time QPCR

35 – liczba kopii genu B1/komórkę pasożyta

8 – liczba pasożytów w oocystie

Szacunkowe zanieczyszczenie badanych prób środowiskowych było stosunkowo niewielkie. Liczba oocyst *T. gondii* przypadająca na jedną próbę wynosiła poniżej 10. Tylko w jednym przypadku zanieczyszczenie sięgało około 20 oocyst/próbę (próba pochodząca z gospodarstwa wiejskiego, nr matrycy 187). Średnie zanieczyszczenie wynosi: 7,2 oocyst/próbę (a z wyłączeniem matrycy nr 187, 3 oocyst/próbę badaną) (Załącznik 11).



Rycina 52. Krzywa standardowa Real-time QPCR wykreślona na podstawie parametrów amplifikacji standardów (klonowana kontrola *T. gondii*).

5.6.2.5 Wyniki badań mikroskopowych

Wszystkie wykonane z prób środowiskowych warzyw i owoców preparaty mikroskopowe były ujemne.

5.6.3 Wyniki badania prób wody

W żadnej badanej próbce wody nie uzyskano pozytywnego wyniku PCR oraz Real-time PCR. Nie zanotowano również inhibicji PCR.

Wszystkie próby były także ujemne w badaniu immunofluorescencyjnym z wykorzystaniem przeciwciał mAb 4B6 oraz w preparatach mikroskopowych.

5.6.4 Wyniki badania prób powietrza

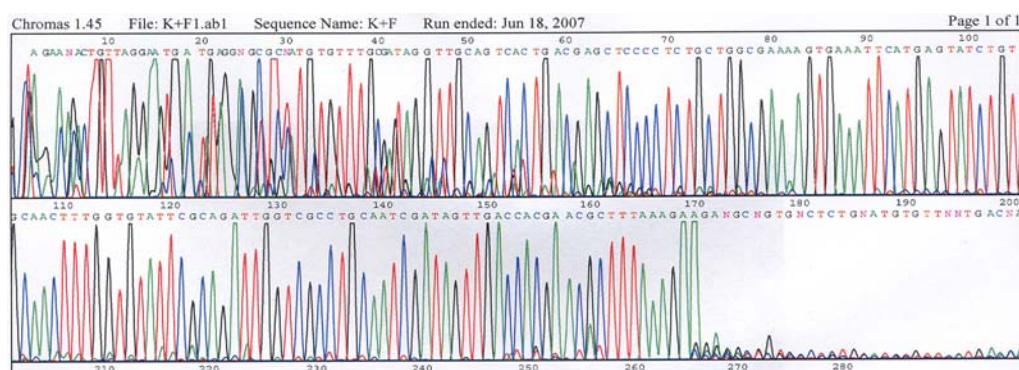
Wszystkie badane próby powietrza były ujemne zarówno w PCR jak i Real-time PCR. Test inhibicji nie wykazał w żadnej próbce hamowania PCR.

Wszystkie preparaty mikroskopowe wykonane z prób środowiskowych powietrza były ujemne.

5.6.5 Wyniki sekwencjonowania amplifikowanych fragmentów genu B1

T. gondii dodatnich prób środowiskowych

Sekwencjonowanie produktów PCR uzyskanych z prób dodatnich wykazało zgodność otrzymanych sekwencji amplifikowanego fragmentu z sekwencją genu B1 *T. gondii* dostępną w Banku Genów (AF179871). Potwierdziło to wykrycie w badanych próbach środowiskowych pasożyta *T. gondii* (Rycina 53).



Rycina 53. Wynik sekwencjonowania fragmentu genu B1 *T. gondii* uzyskanego z jednej z badanych prób środowiskowych ziemi.

6. DYSKUSJA

6.1 ANALIZA WYNIKÓW DOTYCZĄCYCH OPRACOWYWANIA I OPTYMALIZACJI METODYKI DETEKCJI OOCYST *T. GONDII*

Praca dotyczyła, m. in. opracowania i wprowadzenia do szerszego stosowania w badaniach epidemiologicznych i środowiskowych nowoczesnych metod detekcji *T. gondii*, opartych na technikach biologii molekularnej. Specyficzny charakter prób środowiskowych sprawia, że było to trudne zadanie.

W pracy użyto nowoczesnych technik, niestosowanych do tego typu badań w kierunku *T. gondii* wcześniej w Polsce. Przy opracowywaniu metod badawczych i ich walidacji, nawiązana została współpraca z firmą biotechnologiczną A&A Biotechnology (Gdynia) w kwestii opracowania kluczowych dla projektu metod detekcji pasożyta, a także z Université de Reims Campagne-Ardenne i Université de Limoges we Francji, przy wdrażaniu metody immunomagnetycznej separacji (IMS).

6.1.1 Analiza wyników doboru metody izolacji DNA z oocyst *T. gondii*

Jednym z pierwszych etapów pracy był dobór i optymalizacja metod badawczych, które pozwoliłyby na skuteczną detekcję pasożyta *T. gondii* w materiale środowiskowym. Przede wszystkim zajęto się problemem izolacji DNA. Jest to punkt krytyczny badań, warunkujący wykrywalność oocyst *T. gondii*. Początkowo, porównano trzy komercyjnie dostępne zestawy do izolacji DNA Fast DNA Spin kit (for soil) (Qiagene), NucliSENS miniMAG (BioMerieux) i Genomic Mini (A&A Biotechnology) (Materiały i metody, 4.6.1). Uzyskane wyniki wykazały, że taka ekstrakcja DNA jest mało wydajna. W przypadku zastosowania dwóch pierwszych metod, pozytywny wynik PCR uzyskiwano dopiero przy zanieczyszczeniu prób przynajmniej 100 oocystami pasożyta (Wyniki 5.4.1, Tabela 18, Rycina 22 i 23). Przy czym 100% powtarzalność wyników była obserwowana dopiero przy kontaminacji próby liczbą 1000 i więcej oocyst pasożyta (Wyniki 5.4.1, Tabela 18). Natomiast

trzecia z testowanych metod okazała się najmniej skuteczna, tak pod względem granicy detekcji oocyst (1000) jak i powtarzalności (Wyniki 5.4.1, Tabela 18, Rycina 24). Są to wyniki daleko odbiegające od oczekiwań w stosunku do efektywnej metody izolacji DNA. Przyczyną problemów z izolacją DNA jest prawdopodobnie specyficzna budowa oocyst *T. gondii*. Kwestię tę poruszali, m.in. Dumètre i Dardé w artykule z 2003 r. Oocysty są z definicji formami przetrwalnymi, które mają za zadanie ochronić komórki pasożyta przed niekorzystnymi czynnikami zewnętrznymi. Pasożyty zamknięte są w dwóch sporocystach otoczonych z kolei oocystą o wytrzymałej ścianie, składającej się z 3 - 5 warstw, ale o nieokreślonej strukturze chemicznej [Dumètre i Dardé, 2003; Speer i wsp., 1998; Christie, 1978]. Taka konstrukcja podwójnej bariery utrudnia ekstrakcję DNA ze sporozoitów *T. gondii*. Wobec tego konieczne było dodanie etapów niezbędnych do uwolnienia pasożytów z oocyst. Nie istnieje jeden protokół wydajnej ekstrakcji DNA z oocyst *T. gondii*. Proponowano do tego celu różne metody, zaczerpnięte bezpośrednio z badań nad innymi pierwotniakami, ale do tej pory nie testowano ich wydajności dla *T. gondii* (np. liczba cykli zamrażania/rozmarzania próby). W tej pracy zastosowano: rozbijanie oocyst *T. gondii* kuleczkami cyrkonowymi w urządzeniu Fast Prep, szok termiczny, działanie detergentami i Proteinazą K (Materiały i metody, 4.6.2). Dzięki temu uzyskano wyższą czułość metody - DNA wykrywano już przy najniższej skontaminowanej próbce (Wyniki 5.4.2, Tabela 19, Rycina 25 i 26) oraz uzyskano lepszą powtarzalność wyników (Wyniki 5.4.2, Tabela 19). Dodatkowo, sprawdzono czy istnieją znaczne różnice w skuteczności działania dwóch popularnych detergentów: jonowego detergentu SDS oraz niejonowego Tween 20. Eksperymenty wykazały podobne rezultaty w obu przypadkach, z tym, że prążki DNA obserwowane na żelu agarozowym po elektroforetycznym rozdziale produktów PCR były zawsze nieco intensywniejsze przy użyciu SDS (Wyniki 5.4.2, Tabela 19, Rycina 25). Należy jednak pamiętać, że SDS jest silnym inhibitorem PCR (przy stężeniu 0,01 % w próbce aktywność polimerazy Taq jest obniżana do 10 %, a 0,1 % SDS hamuje ją całkowicie) i powinien być usunięty z próby przed wykonaniem reakcji. W tej pracy do dalszych badań wybrano wariant z zastosowaniem Tween20.

6.1.2 Analiza wyników doboru genu do wykonania PCR w celu specyficznej detekcji DNA *T. gondii*.

Kolejnym, bardzo ważnym krokiem był wybór fragmentu genu do badań PCR (Materiały i metody, 4.3), tak, aby umożliwić specyficzną i czułą detekcję pasożyta. Po przeanalizowaniu wyników eksperymentów przeprowadzonych na genach kodujących specyficzne białka *T. gondii*, identyfikację pasożyta w próbach środowiskowych oparto na wykrywaniu fragmentu genu B1. Za tym wyborem przemawiał przede wszystkim fakt wielokopijności tego genu (tj. występowanie w wielu kopiach w komórce), co zwiększa szanse jego wykrycia, w porównaniu z genem jednokopijnym, jakim jest np. gen SAG2. Potwierdziły to także późniejsze badania prób środowiskowych (Dyskusja, 6.2.1). Ma to duże znaczenie, biorąc pod uwagę specyfikę materiału środowiskowego, m. in. możliwość obecności inhibitorów PCR. Drugim powodem, dla którego wybrano ten gen, była dobra powtarzalność uzyskiwanych wyników amplifikacji, co potwierdziły wstępne eksperymenty przeprowadzone na matrycach kontrolnych *T. gondii* (dane nie wykazane) oraz późniejsze wyniki testów odzysku oocyst *T. gondii* i badania prób środowiskowych. Do tej pory na świecie, do wykrywania *T. gondii* za pomocą PCR/Real-time PCR stosowano różne geny, np. LSU-rRNA, SSU rRNA, REP, B1, SAG2, SAG1, 18S rRNA, ITS, TGRI. Większość badań dotyczyła jednak wykrywania DNA *T. gondii* w próbach klinicznych lub tkankach zwierzęcych. Natomiast bardzo nieliczne z nich dotyczyły materiału środowiskowego, gdzie geny wielokopijne okazały się efektywniejsze. Obecnie najczęściej wykorzystywane są geny: B1 i REP [Dumètre i Dardé, 2007; Aubert i Villena 2009; Villena i wsp., 2004].

6.1.3 Analiza wyników doboru metody detekcji oraz analizy ilościowej

DNA *T. gondii* techniką Real-time PCR

Wstępnie zakładano, że technika Real-time PCR zostanie wykorzystana w tej pracy tylko do badania ilościowego DNA, w przypadku prób dodatnich uzyskanych tradycyjną metodą PCR dla genu B1. Jednak w trakcie realizacji badań postanowiono porównać skuteczność obu technik: tradycyjnej metody PCR i Real-time PCR.

Przeprowadzone eksperymenty dowiodły, że w badaniach prób środowiskowych nie znajduje zastosowania technika oparta na niespecyficznym detekcji produktów PCR z użyciem barwnika SYBR Green (Materiały i metody, 4.4.2.1) (Wyniki, 5.2). Kontaminacja próby badanej niepożądanym DNA dyskwalifikuje ją w analizie ilościowej. Barwnik SYBR Green przyłącza się niespecyficznie do każdej dwuniciowej cząsteczki DNA znajdującej się w mieszaninie reakcyjnej. W przypadku prób środowiskowych, które są materiałem wysoce heterogenicznym pod względem materiału genetycznego (mogącego pochodzić od różnego rodzaju organizmów roślinnych, zwierzęcych, mikroorganizmów), możliwość pojawienia się w produktach PCR fragmentów niespecyficznym jest stosunkowo duża. Przypadkowa kontaminacja może skutkować koniecznością powtarzania eksperymentów oraz stratami materialnymi (tym większymi, że reakcje często przeprowadza się dla kilkudziesięciu prób jednocześnie).

Większą gwarancję uniknięcia wyników fałszywie pozytywnych daje specyficzna metoda detekcji w Real-time PCR, oparta na sondach molekularnych wyznakowanych fluorescencyjnie. Komplementarność sondy względem docelowego fragmentu amplifikowanego genu jest dodatkową gwarancją specyficzności reakcji (oprócz starterów). Real-time został wykorzystany do tej pory do wykrywania DNA *T. gondii* w próbach wody powierzchniowej [Villena i wsp., 2004; Aubert i Villena, 2009]. W obu przypadkach zastosowano sondy hybrydazyjne TaqMan (jeden z najpopularniejszych rodzajów sond molekularnych). Większość badań było przeprowadzanych jednak na materiale klinicznym (podobnie jak PCR). Po przeanalizowaniu danych literaturowych, w tym projekcie przetestowano na matrycach dodatnich *T. gondii* dwa układy oparte na amplifikacji fragmentów genu B1 *T. gondii* (fragmenty umiejscowione na dwóch różnych odcinkach sekwencji genu B1), wykrywanych za pomocą sond typu TaqMan (Materiały i metody, 4.4.2.2). Następnie, do badania prób środowiskowych wybrano układ II, opracowany przez Arkush i wsp. (Materiały i Metody, 4.4.2.2.2). Przemawiała za tym dobra powtarzalność uzyskiwanych wyników oraz wysoka czułość reakcji (kilka kopii DNA w 25 µl reakcji), co potwierdziło wyniki uzyskane przez

projektantów metody. Ponadto, specyficzność tej reakcji była testowana przez Arkush i wsp. przy użyciu DNA wyizolowanego z różnych gatunków *Cryptosporidium*, *Sarcocystis* i *Neospora*. W przypadku badania prób środowiskowych specyficzność stosowanych starterów i sondy jest istotna, aby umożliwić amplifikację blisko spokrewnionych z *T. gondii* gatunków, które z dużym prawdopodobieństwem mogą być obecne w badanym materiale. W próbach wody powierzchniowej badanej przez Villena i wsp. (2004) wykryto DNA *Cryptosporidium* w 19%, *Giardia* w 20% i *Toxoplasma* w 7,7%, co potwierdza taką możliwość.

W dalszej części projektu, przy współpracy z firmą A&A Biotechnology skonstruowano standard Real-time QPCR, przez wklonowanie fragmentu genu B1 *T. gondii* do wektora plazmidowego (Materiały i metody, 4.4.1). Standard dobrze się amplifikował i został wykorzystany z powodzeniem do wyznaczenia początkowej liczby kopii DNA *T. gondii* w badanych próbach środowiskowych. Standard wykorzystano także do ustalenia dokładnej granicy detekcji DNA *T. gondii* dla PCR i Real-time PCR. Różnorodne matryce mogą być stosowane jako standard przy badaniach ilościowych DNA, np.: genomowe DNA, cDNA czy syntetyczne oligonukleotydy. Jednakże plazmid z wklonowanym docelowym genem insertowym (ten sam cel molekularny w standardzie, co w próbach badanych) jest często stosowanym rozwiązaniem.

Porównanie skuteczności PCR i Real-time PCR w wykrywaniu DNA *T. gondii* przeprowadzone w tej pracy na serii rozcieńczeń standardów (Materiały i metody, 4.5) wykazało, że obie techniki charakteryzują się dużą czułością. Real-time PCR jest jednak nieco czulszy od tradycyjnej metody PCR. Stosując PCR można wykryć kilkadziesiąt, a Real-time PCR kilka kopii DNA pasożyta w próbce badanej (Wyniki, Rycina 20 i 21), co teoretycznie daje możliwość detekcji jednej komórki pasożyta. Należy jednak pamiętać, że są to dane odnotowane dla reakcji przeprowadzonej w idealnych warunkach. Nie uwzględniają działania inhibitorów PCR, które mogą znajdować się w próbach środowiskowych i poważnie ograniczyć wydajność reakcji.

6.1.4 Analiza wyników doboru metodyki pobierania prób środowiskowych i odzysku oocyst *T. gondii*.

Odpowiednie pobranie prób środowiskowych jest bardzo ważne. Istotny jest nie tylko wybór samego miejsca, ale także sposób pobierania materiału. Badania środowiskowe dotyczące wykrywania oocyst *T. gondii* są rzadkie i nie istnieje jeden protokół pobierania prób, ani odzysku i detekcji *T. gondii*. W dużej mierze opierano się więc na metodach stosowanych do wykrywania innych pierwotniaków z prób środowiskowych, a część metodyki wymagała nowego opracowania. Projektując strategię badań należało brać pod uwagę, m.in. zachowania defekacyjne kotów (wybór miejsc, w których mogły znajdować się kocie odchody), możliwość transferu oocyst *T. gondii* w środowisku (np. wypłukiwanie ich z gleby do zbiorników wodnych), sprzyjające warunki pogodowe (np. niewielki wiatr przy pobieraniu prób powietrza, bezdeszczowa pogoda przy pobieraniu prób gleby) oraz samą naturę oocyst *T. gondii* (przeżywalność w określonych warunkach).

Ponieważ do tej pory nie badano powietrza na obecność *T. gondii*, w związku z tym konieczne było opracowanie metody pobierania prób tego materiału i odzysku oocyst *T. gondii*. Zastosowano rozwiązanie stosowane przy badaniach epidemiologicznych ukierunkowanych na wykrywanie bakterii w powietrzu: urządzenie AirPortMD8 (Sartorius) filtrujące powietrze przez jałowe filtry żelatynowe. Natomiast do odzysku oocyst zaproponowano odwirowywanie filtra rozpuszczonego w ciepłej wodzie (Materiały i metody, 4.9.4). Skuteczność tego rozwiązania określono wykonując próby odzyskowe. Granica detekcji za pomocą metod molekularnych wyniosła 1000 oocyst. Zatem metoda ta, podobnie jak flotacja czy flokulacja, nadaje się do badania prób wysoko skontaminowanych.

Dość nowatorskim podejściem jest także zastosowanie przenośnego zestawu do filtrowania prób wody. W zamyśle, miało to pozwolić na przefiltrowanie prób wody wodociągowej, pochodzącej z kąpielisk (jezior, rzek) oraz studni odkrytych na miejscu, co znacznie usprawnia ten etap badań: eliminuje konieczność kłopotliwego transportowania dużych objętości płynu do laboratorium oraz czasochłonne i pracochłonne mycie dużych pojemników na

wodę przed pobraniem kolejnej próby (co zmniejsza z kolei ryzyko zanieczyszczenia), umożliwia także pobranie kilku prób jednego dnia. Zadanie to zrealizowane zostało częściowo. Problem stanowiła zbyt słaba moc akumulatorów zasilających pompę, które zużywają się w ciągu kilkuminutowej pracy i muszą być wymieniane. Wiąże się z tym konieczność wożenia w teren dużej liczby akumulatorów. Filtrowanie na miejscu zdało egzamin w przypadku pobierania prób wody wodociągowej, gdzie była możliwość doładowania akumulatorów. Moc urządzenia była również zbyt słaba, aby pompować wodę ze studni na wysokość kilku metrów. W przypadku prób wody z kąpielisk i studni, w zależności od liczby prób pobieranych z danego obszaru oraz ilości sprawnych akumulatorów, część prób wody filtrowano na miejscu, a część pobierano do zbiorników polietylenowych i przewożono do laboratorium. Do odzysku i oczyszczania oocyst *T. gondii* z prób wody zastosowano po raz pierwszy w Polsce opracowaną przez profesor Dardé i jej zespół (Université de Limoges, Francja) metodę immunomagnetycznej separacji z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych mAb 4B6 (Materiały i metody, 4.9.3). Jak dotąd IMS został użyty do wykrywania oocyst *T. gondii* w naturalnie skontaminowanej wodzie tylko raz [Dumètre i Dardé, 2007]. Wcześniej nie była to metoda dostępna z uwagi na trudności w produkcji przeciwciał skierowanych przeciwko ścianie oocyst/sporocyst *T. gondii*. Zatem większość badaczy wykorzystywała metodę flotacji cukrowej [Villena i wsp., 2004; Aubert i Villena, 2009; Kourenti i Karanis, 2006] zdając sobie sprawę z jej wad (m. in. niespecyficzność, ograniczona skuteczność w oddzielaniu inhibitorów PCR).

Natomiast, do odzysku oocyst *T. gondii* z prób gleby w tym projekcie zaadaptowano metodę flotacji z nasyconym roztworem NaNO_3 (Materiały i metody, 4.9.1). Metoda została zastosowana do tego celu po raz pierwszy. Wcześniej była wykorzystana do wykrywania jaj geohelmintów przez Mizgajską-Wiktor (2005). Inni badacze, np. Afonso i wsp. (2008) badali osad uzyskiwany po filtrowaniu przez gazę i wirowaniu zawiesiny 10 g ziemi w 2% H_2SO_4 .

6.1.5 Weryfikacja skuteczności przyjętych metod badawczych na podstawie analizy wyników prób odzyskowych

Wszystkie metody detekcji, które ostatecznie przyjęto do badania prób środowiskowych na obecność oocyst *T. gondii*, wymagały weryfikacji w postaci testów odzyskowych. Starannie przygotowany materiał (piach, woda, warzywa, owoce, filtry żelatynowe) zanieczyszczano oocystami *T. gondii* i badano metodami mikroskopowymi oraz molekularnymi.

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że czułość metod mikroskopowych w wykrywaniu oocyst *T. gondii* jest niska i niewystarczająca do przeprowadzenia efektywnych badań środowiskowych. W przypadku badania prób odzyskowych z piasku, warzyw, owoców oraz filtrów żelatynowych (powietrze), obecność oocyst *T. gondii* potwierdzono tam, gdzie dodawano 10000 oocyst (Wyniki 5.5.1, Tabela 20, 21, 22 i 24). Nieco lepsze wyniki odzysku osiągnięto dla prób wody, gdzie oocysty *T. gondii* wykrywano w próbach zanieczyszczonych 1000 oocyst *T. gondii*. (Wyniki 5.5.1, Tabela 23). Przyczyn takiego stanu rzeczy może być kilka. Po pierwsze, metody flotacji, flokulacji i wirowania są mało efektywne w odzysku oocyst *T. gondii* z prób środowiskowych. Przydatne są przy dużym zanieczyszczeniu próby pasożytem. Ponadto, metody te są niespecyficzne, co utrudnia diagnostykę (tak mikroskopową jak molekularną). Wykazano to już wcześniej w różnych publikacjach. Między innymi nieskuteczność metody flotacji w wykrywaniu jaj geohelmintów z prób ziemi opisała Wawrzyniak (1991). W przypadku niewielkiego zanieczyszczenia próby ziemi jajami (50 jaj/50 g gleby) flokulacja była zupełnie bezużyteczna, a przy zanieczyszczeniu próby 5000 jaj odzysk wynosił zaledwie 4%. Kasprzak i Majewska (1995) wykazali ograniczenia metody mikroskopowej w badaniach kryptosporidiozy u ludzi. Technika ta pozwalała na wykrywanie *Cryptosporidium* przy obecności 50000 oocyst w 1 g badanego kału. Badania odzysku cyst *Giardia intestinalis* z owoców i warzyw przeprowadzone przez Kasprzaka i wsp. (1981) wykazały, że na 125 cyst dodanych do próby odzyskowej sałaty odzyskano 9,6%, a truskawek 6%. Ograniczenie przydatności metod flokulacji chemicznej oraz wirowania do prób wysokoskonataminowanych oocystami *T. gondii* wykazały badania

przeprowadzone przez Kourenti i wsp. (2003). Większość osób badających wodę środowiskową w kierunku obecności *T. gondii* wykorzystywała filtrację, jako efektywniejszy sposób odzysku oocyst tego pierwotniaka [Villena i wsp., 2004; Aubert i Villena, 2009; Dumètre i Dardé, 2007]. Jak pokazały badania prób odzyskowych przeprowadzonych w tym projekcie, szczególnie trudny do badań mikroskopowych jest obraz z osadu po flokulacji popłuczyn warzyw/owoców, a zwłaszcza truskawek, ze względu na bardzo nieczytelne tło (duża ilość drobnych zanieczyszczeń). W przypadku preparatów barwionych dodatkowo często obserwowano się zniekształcenie oocyst *T. gondii*. W badaniu autofluorescencji istnieje ryzyko wyników fałszywie negatywnych, gdyż nie wszystkie oocysty wykazują jednocześnie autofluorescencję w świetle UV (szczególnie przy niewielkiej liczbie oocyst). Dodatkowo, metoda ta nie jest selektywna i mogą się także pojawić się wyniki fałszywie pozytywne z uwagi na fakt, że zjawisko autofluorescencji jest powszechne wśród kokcydiów. Nie bez znaczenia w badaniach mikroskopowych ma także czynnik ludzki. Są to badania, których wynik jest subiektywną oceną badającego. Ryzyko pomyłek jest zmniejszone w przypadku, gdy mamy do czynienia z selektywną metodą odzysku, np. immunomagnetyczną separację oocyst stosowaną do prób wody.

Wyniki moich doświadczeń jednoznacznie wskazują, że metody molekularne są lepsze do wykrywania obecności *T. gondii* w próbach środowiskowych. Pozwalają na szybszą detekcję (kilkadziesiąt – kilkaset prób w ciągu kilku godzin) w stosunku do metody mikroskopowej, gdzie na dokładne obejrzenie jednego preparatu należy poświęcić przynajmniej 10 - 15 min. Przewyższają je także specyficnością i czułością. Granica detekcji obniżyła się o jeden rząd wielkości przy zastosowaniu PCR, w porównaniu z badaniami mikroskopowymi (za wyjątkiem prób truskawek). Zastosowanie Real-time PCR pozwoliło jeszcze bardziej polepszyć wykrywalność oocyst *T. gondii* w próbach wody, piachu, warzyw i owoców (o jeden rząd wielkości) (Wyniki, Tabela 28). Przy odzysku oocyst *T. gondii* z wody, DNA *T. gondii* zanotowano już przy kontaminacji próby 10 oocystami (Wyniki 5.5.3, Tabela 28), choć w tym przypadku powtarzalność wyników jest nadal niezadowalająca (1:3) (Wyniki,

Tabela 26). Granica detekcji pozostała natomiast niezmienna w przypadku prób odzyskowych z truskawek (10^4 oocyst) (Wyniki 5.5.3, Tabela 28).

Mimo postępów w udoskonalaniu metod odzysku oocyst *T. gondii*, nadal wykrycie tego pasożyta przy niskim zanieczyszczeniu próby środowiskowej pozostaje nieosiągalne. Wynika to przede wszystkim z ograniczeń metod odzyskowych, w czasie wykonywania których dochodzi do znacznych strat materiału. Można to było zaobserwować także w tej pracy. Porównując wyniki izolacji DNA z zawiesiny oocyst *T. gondii* nie poddanej procedurom odzysku, z wynikami prób odzyskowych można stwierdzić (opierając się na wynikach Real-time PCR), że w przypadku prób piasku oraz warzyw mamy do czynienia z dziesięciokrotną, w przypadku filtrów żelatynowych stukrotną, a truskawek aż tysiąckrotną stratą materiału (Wyniki 5.5.2.3, Tabela 27). Dla prób wody odzysk pozostaje na tym samym poziomie (choć przy niskiej powtarzalności wyników dla najniższego rozcieńczenia oocyst). Kolejną istotną przyczyną trudności jest specyficzny charakter prób środowiskowych. Materiał środowiskowy może zawierać inhibitory PCR, których charakter i struktura pozostają najczęściej nieznanne. Obecnie dostępne metody odzysku oocyst *T. gondii* z prób środowiskowych (flotacja, flokulacja) nie oddzielają pożądanego materiału od większości zanieczyszczeń, w tym inhibitorów PCR. Zastosowanie metody immunomagnetycznej separacji oocyst *T. gondii* pozwoliło wyeliminować ten problem. Widać to wyraźnie w wynikach badań przeprowadzonych w tym projekcie.

6.2 ANALIZA WYNIKÓW BADANIA PRÓB ŚRODOWISKOWYCH

6.2.1 Analiza wyników badania prób ziemi

O tym, że ziemia może być źródłem zarażeń wywoływanych pasożytem *T. gondii* wspomniano w kilku publikacjach [Weigel i wsp., 1999; Teutsch i wsp., 1979; Stagno i wsp., 1980; Coutinho i wsp., 1982]. Wyniki przeprowadzonych w Europie badań ankietowych zarażonych ciężarnych kobiet wykazały, że u 17% badanych prawdopodobną przyczyną zarażenia była ziemia [Cook i wsp., 2000]. Jednak ilość informacji o dystrybucji oocyst *T. gondii* w ziemi, opartych o badania doświadczalne jest znikoma [Afonso i wsp., 2008]. Wiadomo, że

w glebie mogą one pozostać inwazyjne co najmniej przez rok [Dumètre i Dardé, 2003]. Wyniki przedstawiane w tej rozprawie są jednymi z pierwszych doniesień na świecie i pierwszymi w Polsce, opisującymi wykrywanie DNA *T. gondii* w próbach środowiskowych ziemi za pomocą szybkich metod molekularnych. Wśród zebranych łącznie 151 prób, DNA *T. gondii* wykryto stosując Real-time PCR w 23% (a PCR w 15%). Poziom kontaminacji prób ziemi zebranej w poszczególnych miastach Trójmiasta był zbliżony, wahał się od 22% w Gdyni do 26% w Sopocie, a w Wejherowie wyniósł 33 % (wyniki Real-time PCR) (Wyniki 5.6.1.1, Tabela 30). Obecność DNA *T. gondii* wyraźnie wskazuje na zanieczyszczenie ziemi w Trójmieście i okolicach oocystami pasożyta, co może stwarzać zagrożenie dla zdrowia człowieka. Wyniki badań dostarczają dowodów, że gleba może odgrywać ważną rolę w rozpowszechnianiu inwazji *T. gondii*. Warto wspomnieć, że poziom zanieczyszczenia ziemi przez DNA *T. gondii* jest zbliżony do tego, który odnotowano dla jaj *Toxocara* spp. w Trójmieście (dane niepublikowane ZPT).

Szczególnie niepokojący jest fakt dużej liczby piaskownic dla dzieci zanieczyszczonych oocystami (24% w Real-time PCR; 16% w PCR), przy czym największą kontaminację tego rodzaju miejsc zanotowano w dzielnicach Gdańska, w porównaniu z Gdynią i Sopotem (Wyniki 5.6.1.1, Tabela 31, Rycina 41). Dzieci bawiące się w zanieczyszczonym piasku są narażone na przypadkowe połknięcie oocyst, które mogą znaleźć się na ich ubraniach, zabawkach, rękach. Koreluje to z doniesieniami o wysokim odsetku seropozytywności u dzieci, sięgającym 8% w grupie wiekowej między 1 – 5 lat i 23% w grupie 6 – 10 lat [Szewczyk–Kramska, 1999]. Udowodniona obecność oocyst *T. gondii* w piaskownicach stwarza realne ryzyko pojawienia się pierwotnej toksoplazmozy u dzieci. Wskazuje to na konieczność lepszej ochrony takich miejsc przed kocimi odchodami. Jest to możliwe do osiągnięcia prostymi sposobami, na przykład przez systematyczną wymianę piasku w piaskownicach i/lub ograniczenie dostępu zwierząt (np. przykrywanie piaskownic brezentem).

Piaskownice, będące częstym miejscem defekacji kotów mogą także odgrywać rolę w rozprzestrzenianiu *T. gondii* w środowisku (na przykład przez

wiatr, opady deszczu czy nawet bezkręgowce). Dzikie koty, które mogą wydalać oocysty, często gromadzą się także wokół śmietników (w poszukiwaniu pożywienia), bądź przy hałdach piasku gospodarczego zalegającego, np. w celach remontowych oraz w ogródkach przyblokowych na osiedlach miejskich (częste miejsca defekacji kotów). Moje badania potwierdziły, że takie miejsca, obok piaskownic, również są skontaminowane oocystami *T. gondii*. Na terenie Trójmiasta i okolic 36% (wynik Real-time PCR) prób piasku osiedlowego było zanieczyszczonych pasożytem (Wyniki 5.6.1.1, Tabela 29). Wyniki badań są zgodne z ostatnimi doniesieniami z Francji sugerującymi, że dystrybucja przestrzenna terenów skontaminowanych przez oocysty *T. gondii* była wysoce heterogeniczna na obszarze miejskim, a kontaminacja była najwyższa w miejscu defekacji kotów [Afonso i wsp., 2008].

Najbardziej zanieczyszczonymi przez oocysty *T. gondii* dzielnicami Gdańska były Śródmieście oraz Przymorze. W Sopocie największe zanieczyszczenie zanotowano w „Sopocie Dolnym” (okolice osiedla Mickiewicza), a w Gdyni w dzielnicy Chylonia oraz Karwiny (Załączniki 12 - 15). Jak zauważono już wcześniej [Dumètre i Dardé, 2003], na terenie miejskim możliwość kontaminacji środowiska wynika z bliskości ludzkich domów oraz niewielkiej powierzchni do wydalania odchodów przez koty. W próbach gleby zebranej z miejskich ogródków działkowych nie wykryto DNA *T. gondii*. Może być to spowodowane faktem, że większość tych działek jest położona z daleka od osiedli i domów, co tłumaczy nieobecność lub mniejszą liczbę kotów i w konsekwencji brak zanieczyszczenia ziemi oocystami *T. gondii*. Chociaż ogródki działkowe badane w Elblągu położone są bardzo blisko osiedla mieszkaniowego. Brak prób dodatnich (tak badanej ziemi jak i warzyw i owoców) można wytłumaczyć zbyt małą liczbą zebranych prób, brakiem kotów wydalających oocysty lub/i ograniczeniami metod badawczych. Tylko w jednym przypadku wśród prób gleby pochodzących z przydomowych ogródków miejskich wynik PCR był dodatni. Był to przydomowy ogród kwiatowy w Gdyni Chylonia (próba o nr matrycy 139), na którego terenie i w pobliżu obserwowano dużo wolno żyjących kotów. Miejsce to znajdowało się w sąsiedztwie bloków

mieszkalnych oraz w pobliżu Parku Chylońskiego, w którym także zanotowano dodatnią próbę pobranej ziemi.

Sugestie niektórych badaczy, że na terenach wiejskich (szczególnie położonych wśród pól i łąk) oocysty *T. gondii* mogą być wydalane daleko od domów, przez co ich wykrycie może być trudniejsze [Dumètre i Dardé, 2003] znalazły odzwierciedlenie w wynikach moich badań. Z 17 prób zebranych z gospodarstw wiejskich, tylko jedna była zanieczyszczona pasożytem *T. gondii*. Pochodziła z niewielkiego gospodarstwa we wsi Rybno (województwo pomorskie). W próbach ziemi pobranej z pozostałych gospodarstw nie wykryto DNA tego pierwotniaka. Stanowi to znaczącą różnicę w porównaniu z zanieczyszczeniem badanych prób ziemi miejskiej.

Nie wiadomo dokładnie jaka liczba oocyst pasożyta jest w stanie wywołać u ludzi proces chorobowy. Wg Fayer i wsp. (2004) już jedna połknięta oocysta *T. gondii* może wywołać zarażenie. Na rozwinięcie się toksoplazmozy ma jednak wpływ wiele czynników, m.in. wirulencja szczepu toksoplazm, czy właściwości obronne zarażonego organizmu. Aby w przybliżeniu określić ładunek patogenny prób, w których wykryto DNA *T. gondii*, użyto Real-time QPCR (Materiały i metody, 4.11.5). Opracowano prosty wzór, wg którego przy pewnych założeniach można w przybliżeniu określić początkową liczbę oocyst *T. gondii* w próbie środowiskowej. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że ładunek patogenny prób ziemi wynosił w większości od kilku do kilkudziesięciu oocyst *T. gondii* (Wyniki 5.6.1.4, Tabela 34; Załącznik 8).

Analizując dane dotyczące liczby oocyst *T. gondii*, które mogły znajdować się w próbach środowiskowych ziemi (oszacowane na podstawie wyników Real-time QPCR) (Załącznik 8) można stwierdzić, że mają swoje odbicie w tym, które próby gleby były dodatnie tylko w badaniu Real-time PCR, a które zarówno w PCR jak i Real-time PCR (Załącznik 6). Obie metody są skuteczne w wykrywaniu DNA pasożyta, dając wynik pozytywny amplifikacji przy próbach zanieczyszczonych większą liczbą oocyst *T. gondii*. Próby dodatnie tylko w Real-time PCR były zanieczyszczone niewielką liczbą oocyst

(średnio 1.24). Potwierdza to tym samym wyniki badań eksperymentalnych, że Real-time PCR jest czulszy niż PCR.

Analizując wyniki PCR dla genu SAG2 (reakcje wykonane w celu genotypowania) można zaobserwować, że uzyskano rezultat dodatni (amplifikacja obu końców genu) tylko dla 39% prób ziemi, które były uprzednio pozytywne w PCR z genem B1 (Załącznik 7). Potwierdza to niższą skuteczność amplifikacji fragmentów genu SAG2 w określaniu odsetka prób dodatnich. We wszystkich próbach ujemnych w badaniu PCR dla genu B1, wynik PCR dla genu SAG2 także był ujemny (brak reakcji z obu końców). Dodatkowo, można stwierdzić że koniec 3' amplifikuje się częściej niż koniec 5' genu SAG2 (14 : 11). Jest to zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi [Fuentes i wsp., 2001]. Potwierdza to także słuszność wyboru wielokopijnego genu jakim jest B1 do wykrywania DNA *Toxoplasma gondii* w próbach środowiskowych.

Większość badanych miejsc zanieczyszczona była jednym genotypem *T. gondii*. Jednak w dwóch próbach (nr matrycy 10 i 27), pobranych z jednego miejsca, wykryto dwa różne genotypy (Załącznik 7). Dowodzi to możliwości istnienia na tym samym obszarze kontaminacji mieszanej. Aspinall i wsp. opisali w 2002 r. występowanie inwazji mieszanej (typ I i II) u 30% pacjentów z toksoplazmozą wrodzoną i nabytą oraz w 20% prób badanego mięsa.

W przeglądzie literatury można zaobserwować, że badacze sporo uwagi poświęcili problemowi potencjalnej obecności inhibitorów PCR w ziemi [Wilson, 1997; Chung i wsp., 1998; Wiedenmann wsp., 1998; Dumètre i Dardé, 2003]. Wyniki testu inhibicji przeprowadzonego w tej pracy na wszystkich próbach ujemnych były nieco zaskakujące. W próbach pobranych z piaskownic nie zanotowano inhibicji PCR, co jest prawdopodobnie spowodowane specyfiką tego materiału (czysty piach – bez lub z niewielką ilością zanieczyszczeń organicznych). Natomiast zahamowanie PCR miało miejsce w 5 próbach ziemi pochodzącej z działek/ogrodów (Wyniki 5.6.1.2, Tabela 32). W ziemi ogrodowej, wydaje się bardziej prawdopodobne występowanie większej ilości inhibitorów PCR, ze względu na obecność substancji organicznych pochodzących, np. od

roślin uprawianych bądź dziko rosnących. A wiadomo, że produkty rozpadu związków organicznych są głównymi inhibitorami PCR [Dumètre i Dardé, 2003].

6.2.2 Analiza wyników badania prób warzyw i owoców

Na temat wykrywania oocyst *T. gondii* na spożywanych warzywach i owocach brakuje w literaturze informacji, choć pojawiały się sugestie, iż może to być jedno ze źródeł inwazji u ludzi [Dumètre i Dardé, 2003]. Istnieją doniesienia dotyczące wykrywania innych pierwotniaków na owocach i warzywach. M.in. maliny okazały się ważnym dla ludzi źródłem inwazji *Cyclospora cayetanensis*, kokcydium blisko spokrewnionym z *T. gondii* [Dumètre i Dardé, 2003]. Metodę flokulacji, która została użyta w tej pracy, wykorzystywano wcześniej do odzysku oocyst *Cryptosporidium* z prób warzyw i owoców [Vesey i wsp, 1993; Campbell i wsp., 1994; Zuckerman i wsp., 1997] oraz cyst *Giardia* [Ho i wsp., 1995]. W Polsce próby środowiskowe warzyw i owoców zebrane na terenie Wielkopolski, poddawano badaniu w kierunku mikrosporidiów [Jendrzejewski i wsp., 2007].

Chłodne i wilgotne warzywa i owoce mogą dostarczać optymalnego środowiska dla przeżywania oocyst *T. gondii*. Eksperymentalnie wykazano, że mogą one przeżyć na malinach przechowywanych 8 tygodni w 4°C [Kniel i wsp., 2002]. Jednak szersze badania środowiskowe nie były dotąd prowadzone. Zatem, według mojej wiedzy, jest to pierwsza próba przebadania dużej liczby prób surowych warzyw i owoców pod kątem zanieczyszczenia tym pasożytem. Zebrano i zbadano łącznie 206 prób warzyw i owoców kupowanych na bazarach i w sklepach oraz zbieranych z ogródków warzywnych (na wsiach i w miejskich ogródkach działkowych). Badania wykonane techniką Real-time PCR wykazały około 10% prób dodatnich, podczas gdy PCR 5% (Wyniki 5.6.2.1, Tabela 35).

Najwięcej badanych prób pochodziło ze sklepów, marketów, straganów na bazarach, rynkach itp. (Załącznik 3). W próbach kupowanych w hipermarketach nie wykryto DNA *T. gondii*. Jest to prawdopodobnie związane z faktem, że te warzywa i owoce przeważnie pochodzą od dużych dostawców. Często hodowane są w wielkich szklarniach i na polach oddalonych od miejsc

zamieszkałych przez ludzi i tym samym z mniejszym prawdopodobieństwem obecności zwierząt kotowatych. Poza tym, często warzywa i owoce przetrzymywane są w magazynach, a bezpośrednio przed sprzedażą podlegają procesom przygotowawczym i odświeżającym (np. spryskiwaniu wodą). Oocysty *T. gondii*, które mogłyby się znajdować na produktach są prawdopodobnie splukiwane. W przypadku mniejszych sklepików, handlarzy przydrożnych, sprzedawców bazarowych (czerpiących produkty z własnych, niewielkich upraw) jest większe prawdopodobieństwo kontaktu warzyw czy owoców z odchodami kotów. W tej właśnie grupie prób badanych odnotowano obecność DNA *T. gondii* (8 % w Real-time PCR, 4 % w PCR) (Wyniki 5.6.2.1, Tabela 36).

W matrycach pochodzącym z gospodarstw wiejskich, DNA *T. gondii* wykryto techniką Real-time PCR w 7 przypadkach (17%) (w PCR w 4 przypadkach) (Wyniki 5.6.2.1, Tabela 36). Gospodarstwa, z których pochodziły dodatnie próby, w większości były zadbane, czyste, odznaczające się dobrymi warunkami sanitarnymi (wyjątek to gospodarstwo we wsi Chynów, gdzie odnotowano niższy standard higieny). We wszystkich przypadkach próby badane pochodziły z przydomowych ogrodów warzywnych i wszędzie odnotowano obecność wolnożyjących oraz domowych kotów. Jeżeli przeanalizuje się sumę zebranych prób (dodatnich i ujemnych) i warunki panujące na obszarze zbioru, to można zaobserwować, że same warunki higieniczne nie determinowały liczby prób dodatnich. W województwie pomorskim, we wsi Kostkowo, w gospodarstwie 1 zanotowano dwie próby dodatnie (gospodarstwo położone na uboczu, w lesie, oddalone około 1 km od reszty zabudowań), w gospodarstwie 2 jedna z dwóch prób była dodatnia, a w gospodarstwie 3 - obie próby były ujemne (gospodarstwo 2 i 3 położone niedaleko siebie). W dwóch kolejnych wsiach, gdzie panowały gorsze warunki sanitarne, w Chynowie zanotowano dwie próby dodatnie, natomiast w Rybnie obie badane próby były ujemne. Kolejnym przykładem są wsie Gronowo Elbląskie i Oleśno (województwo warmińsko-mazurskie), położone bardzo blisko siebie (w odległości 0,5 km), z zadbanymi podwórkami. Zanieczyszczenie zanotowano tylko w Oleśnie. Wydaje się więc, że warunki sanitarne otoczenia

nie były czynnikiem znacząco wpływającym na poziom zanieczyszczenia środowiska oocystami *T. gondii*. Podstawowym warunkiem jest obecność kotów wydalających oocysty. Próby ujemne są wynikiem najprawdopodobniej braku zwierząt wydalających oocysty na badanym terenie. Chociaż nie należy lekceważyć ograniczeń metod badawczych oraz stosunku powierzchni gospodarstwa (ogrodu/pola) do niewielkiej objętości badanej próby. Przy małym zanieczyszczeniu terenu, mimo potencjalnej obecności pasożyta, możliwe, że nie udało się go wykryć.

Ogólnie, niższy niż w przypadku prób ziemi odsetek prób dodatnich może sugerować, że warzywa i owoce stanowią mniejsze zagrożenie zarażenia się pasożytem *T. gondii*. Jednakże świadomość, że liczba oocyst w próbce mogła znajdować się poniżej granicy detekcji dostępnych metod badawczych każe być ostrożnym. Nie bez znaczenia jest tu także duży odsetek prób z zanotowaną inhibicją PCR (29%) (Wyniki 5.6.2.2, Tabela 37). Przy czym, zahamowanie PCR w największym stopniu dotyczy prób truskawek (ponad połowa badanych). Wynika to prawdopodobnie z faktu, iż w trakcie procesu wytrząsania w wodzie, truskawki, mające delikatną strukturę, częściowo rozpadają się. Osad poflokulacyjny zawiera zatem duże ilości śluzu i rozdrobnionych części owoców, co utrudnia odzysk oocyst *T. gondii*. Problemowi temu próbowano zapobiegać dodając do płuczających się prób owoców detergent Tween 20. Takie niekorzystne zjawisko nie występowało w przypadku warzyw, które mają bardziej zbitą strukturę.

Wyniki badania ilościowego prób warzyw techniką Real-time PCR wykazały zanieczyszczenie prób dodatnich liczbą średnio trzech oocyst na próbę (z wyłączeniem jednego ekstermum (próba o nr matrycy 187, zanieczyszczona liczbą 19 oocyst) (Załącznik 11). Wyniki badań potwierdzają (tak, jak w przypadku prób ziemi), że przy bardzo małym zanieczyszczeniu (poniżej 2 oocyst) czułość Real-time PCR jest większa niż PCR.

Podobnie jak przy badaniach prób ziemi, PCR z genem SAG2 okazał się mniej czułym badaniem niż z genem B1. W przypadku warzyw i owoców

amplifikacja genu SAG2 potwierdziła tylko 73% prób dodatnich otrzymanych w reakcji z genem B1 (Załącznik 10).

6.2.3 Analiza wyników badania prób wody

W żadnej z badanych prób wody (woda pitna, kąpieliska, studnie) nie odnotowano obecności DNA *T. gondii*. W miejscach tych mogło nie dojść do zanieczyszczenia wody oocystami tego pierwotniaka. Chociaż w takim środowisku oocysty mogą być bardzo rozproszone i przy niewielkiej kontaminacji, możliwe, że nie zostały wykryte.

Nie wystąpiła także inhibicja PCR. Można ten fakt przypisać zastosowaniu techniki IMS do odzysku oocyst *T. gondii*, gdyż jednym z zadań tej metody jest przeciwdziałanie inhibicji PCR przez oddzielenie oocyst od zanieczyszczeń znajdujących się w wodzie.

Oocysty rozsiewane w środowisku przez wiatr lub splukiwane z powierzchni gruntu po wystąpieniu opadów deszczu mogą zanieczyszczać zbiorniki wodne. Większość epidemii toksoplazmozy na świecie wywołanych oocystami *T. gondii* miała swoje źródło w zanieczyszczonej wodzie. Przykładem może być epidemia, która wystąpiła w Viktorii w Kanadzie w 1995 roku. 110 przypadków toksoplazmozy wywołanych było piciem wody ze zbiornika niefiltrowanej wody pitnej, do którego dostały się zawierające oocysty *T. gondii* odchody kotów. Zatem, podjęto próby ustalenia metodyki wykrywania oocyst *T. gondii* w wodzie. Większość eksperymentów była przeprowadzana w warunkach laboratoryjnych (woda destylowana lub wodociągowa zanieczyszczana wysoką liczbą oocyst), które są dalekie od tych, panujących w naturalnie skontaminowanych próbach środowiskowych [Kourenti i wsp., 2003; Villena i wsp., 2004; Dumètre i Dardé, 2007]. Jedynie nieliczne badania dotyczyły wykrywania oocyst *T. gondii* w naturalnie skontaminowanej wodzie [Dumètre i Dardé, 2003; Villena i wsp., 2004; Kourenti and Karanis, 2006; de Moura i wsp., 2006; Sroka i wsp., 2006]. W Polsce wykryto je w wodzie pobieranej ze studni (odkrytych, płytkich, o niskim standardzie sanitarnym) znajdujących się w okolicach Lublina [Sroka i wsp., 2006].

6.2.4 Analiza wyników badania prób powietrza

Wszystkie przebadane próby powietrza były ujemne w badaniach molekularnych na obecność *T. gondii*. W żadnej nie odnotowano także inhibicji PCR. Są to wyniki spodziewane. Istnieje pewne prawdopodobieństwo, że w sprzyjających warunkach (m. in. przy dużym zanieczyszczeniu ziemi oocystami *T. gondii* w miejscach defekacji kotów) może nastąpić zanieczyszczenie powietrza pasożytem. Jednak istnieje wiele ograniczeń metodyki badań. Przy pobieraniu prób bardzo istotne są, m. in. warunki pogodowe (słoneczna pogoda, suchy grunt, niewielki wiatr). Poza tym, oocysty, które znajdowałyby się w powietrzu byłyby prawdopodobnie rozproszone, co utrudnia ich wykrycie i wymusza filtrowanie dużych objętości powietrza. Do tej pory nie ukazały się żadne publikacje opisujące badania prób powietrza na obecność *T. gondii*. Była to zatem pierwsza próba badania tego materiału środowiskowego pod kątem kontaminacji oocystami tego pasożyta.

6.2.5 Analiza wyników genotypowania dodatnich prób środowiskowych

Izolaty *T. gondii* zostały sklasyfikowane w trzy główne typy klonalne (I, II, III), na podstawie pojedynczego loci (gen SAG2), bądź analizy opartej na wielu loci [Howe i Sibley, 1995; Nowakowska i wsp., 2006]. Nie ulega wątpliwości, że rozpowszechnienie genotypu *T. gondii* w środowisku pozostaje wciąż nieznane, a z punktu widzenia zagrożenia dla zdrowia człowieka jest to kluczowa informacja. W tej pracy w badanych próbach środowiskowych zostały wykryte dwa genotypy: SAG2 typ I oraz SAG2 typ II. Informacje na temat występowania genotypów *Toxoplasma* w Polsce są bardzo skąpe. Najpierw pojawiły się doniesienia o wykryciu genotypu II u dzieci cierpiących na toksoplazmozę wrodzoną [Nowakowska i wsp., 2004], a ostatnio opisano dwa izolaty z mięsa kurczaków jako nieokreślony typ, z allelem typu I na SAG2 locus [Dubey i wsp., 2008]. Co ciekawe, wyniki moich badań wykazały obecność pasożytów o genotypie SAG2 typ I w 12 przypadkach (6 w próbach ziemi i 6 w próbach /warzyw) oraz SAG2 typ II w 5 przypadkach (3 w próbach ziemi i 2 w próbach warzyw). Te dane są niespodziewane, gdyż typ I jest rzadziej spotykany u ludzi i zwierząt w całej Europie, podczas gdy typ II dominuje [Owen and Tress, 1999; Ajzenberg i wsp., 2002]. Nie ulega natomiast wątpliwości, że oba wykryte

w próbach środowiskowych genotypy są niebezpieczne dla człowieka. Jak wynika z danych literaturowych, genotypy te mają udział w wywoływaniu toksoplazmozy nabytej oraz wrodzonej. Ciekawy jest także przypadek, że w dwóch różnych próbach, ale pobranych z tej samej hałdy piachu gospodarczego (nr matrycy 10 i 27) wykryto genotyp SAG2I oraz SAG2II (Załącznik 7). Świadczy to o możliwości występowania na jednym terenie oocyst *T. gondii* o różnych genotypach. Jak wykazano wcześniej, popularna metoda genotypowania oparta na amplifikacji genu SAG2 *T. gondii* ma poważne ograniczenia – takie jak niekompletna amplifikacja obu końców genu SAG2, czy niedotrąwienie produktów PCR. Badania prowadzone w tej pracy potwierdziły te doniesienia. Największy problem stanowi „kapryśna” amplifikacja fragmentów genu SAG2. Często amplifikacji ulegał tylko jeden z fragmentów (Wyniki 5.6.1.5, Rycina 45; Załącznik 7 i 10), co niestety uniemożliwiało przeprowadzenie analizy restrykcyjnej, bądź sekwencjonowania i w konsekwencji ustalenie genotypu. W literaturze pojawia się coraz więcej doniesień o alternatywnych metodach genotypowania *T. gondii* (np. analiza mikrosatelitarna [Ajzenberg i wsp., 2004], analiza innych niż SAG2 polimorficznych genów, np. GRA6 [Edvinsson i wsp., 2006]), które powinny w przyszłości zastąpić (uzupełnić) genotypowanie oparte na polimorfizmie genu SAG2.

6.2.6 Problem określania żywotności oocyst *T. gondii*

Przeprowadzone badania nie pozwoliły na określenie żywotności wykrytych oocyst *T. gondii* i tym samym ustalenie ich inwazyjności dla ludzi. Z punktu widzenia zagrożenia dla zdrowia człowieka, informacja o stosunku ilości żywych i martwych oocyst *T. gondii* występujących w środowisku jest istotna. Badania te nie mogły zostać przeprowadzone z kilku powodów. Brakowało odpowiednich warunków do przeprowadzenia biometody z użyciem myszy. Jest to także metoda droga i wymagałaby użycia dużej liczby zwierząt. Alternatywą mogłoby być wykrywanie RNA pasożyta metodą odwrotnej transkrypcji (RT-PCR) lub fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Są to bardzo obiecujące techniki, ale jeszcze niedostępne dla *T. gondii*. FISH opracowano już, m.in. do wykrywania żywych oocyst *Cryptosporidium* oraz

Giardia. Realizując tą pracę nawiązano współpracę z profesorem T. Graczykiem z Baltimore University (USA), gdzie opracowywane są sondy molekularne specyficzne do RNA *T. gondii*, jednak badania te nie są jeszcze ukończone. Badania nad zastosowaniem RT-PCR nie mogły być przeprowadzone z uwagi na ograniczenia finansowe projektu.

W przyszłości badania oparte na detekcji RNA *T. gondii* powinny zastąpić metodę *in vivo*, która jest niepraktyczna w badaniach epidemiologicznych. Badania dotyczące wykrywania oocyst *T. gondii* w wodzie środowiskowej wykazały, że biometoda nie potwierdziła żadnego przypadku, w którym wykryto DNA pasożyta. Poważnym jej ograniczeniem jest zatem niemożność wykrycia uszkodzonych oocyst (np. na skutek zastosowanych procedur odzysku). Wykrycie RNA byłoby zatem lepszym rozwiązaniem.

Reasumując, dzięki zbadaniu dużej liczby prób uzyskano cenne informacje o stopniu skażenia środowiska pasożytem *T. gondii* w Polsce północnej oraz określono skuteczność nowoczesnych metod w badaniach środowiskowych. Udowodniono, że istnieje realne ryzyko zarażenia się ludzi pasożytem *T. gondii* przez kontakt z zanieczyszczonym środowiskiem.

Badania dostarczyły ważnych informacji uzupełniających wiedzę na temat pasożyta oraz mają znaczenie praktyczne. Ich wyniki mogą przyczynić się w przyszłości do skutecznego monitorowania zanieczyszczenia środowiska i oceny stopnia zagrożenia dla ludzi *T. gondii*. Ponadto, opracowanie metod dla tego gatunku otwiera drogę do zastosowania podobnych rozwiązań do wykrywania innych patogenów. Testowane obecnie techniki będą modyfikowane i dostosowywane do kolejnych badań. W MIMMiT GUMed uruchamiana jest linia do badania wody w kierunku postaci rozwojowych pasożytów występujących w środowisku. Wyniki obecnych badań stanowią ważny element w jej konstruowaniu.

Ponadto określenie źródeł zagrożenia zarażenia się ludzi *T. gondii* może posłużyć opracowaniu w Polsce skuteczniejszego programu profilaktyki przeciw toksoplazmowej.

W badaniach wykorzystano cały zestaw nowoczesnych metod biologii molekularnej. Ponieważ metodyka do identyfikacji *T. gondii* w materiale środowiskowym jest bardzo skąpa, wymagało to dostosowania oraz opracowania i optymalizacji nowych metod. Niektóre z nich były wprowadzone do badań tego typu materiału po raz pierwszy w Polsce, a także na świecie.

7. WNIOSKI

WNIOSKI ZWIĄZANE Z METODYKĄ PROWADZENIA BADAŃ ŚRODOWISKOWYCH

- Ekstrakcja DNA z oocyst *T. gondii* komercyjnie dostępnymi zestawami do izolacji DNA jest mało wydajna i wymaga zastosowania etapu wstępnej dezintegracji ściany oocyst.
- Procedury odzysku oocyst *T. gondii* z prób środowiskowych powodują starty materiału wahające się od 10 do 1000 razy, w zależności od zastosowanej metody i rodzaju próby środowiskowej.
- Wielokopijny gen B1 jest lepszym celem molekularnym do wykrywania DNA *Toxoplasma gondii* w próbach środowiskowych niż geny jednokopijne (np. SAG2). W ilościowym badaniu DNA *T. gondii* (Real-time QPCR) z prób środowiskowych metoda specyficznej detekcji oparta na sondach molekularnych jest lepsza niż metoda niespecyficzna wykorzystująca barwnik SYBR Green.
- Real-time PCR jest czulszy niż tradycyjny PCR w wykrywaniu DNA *Toxoplasma gondii*. Granica wykrywalności stosowanej w tej pracy metody PCR wynosi 50 kopii, a dla Real-time PCR 5 kopii amplifikowanego fragmentu genu B1 *T. gondii*.

WNIOSKI WYNIKAJĄCE Z PRZEPROWADZONYCH BADAŃ ŚRODOWISKOWYCH

- Ziemia, a także warzywa i owoce mogą być źródłem zarażenia pasożytem *T. gondii*. Co więcej, wykryte pasożyty charakteryzowały się genotypem I i II – oba są niebezpieczne dla zdrowia człowieka.
- Ładunek patogenny oszacowany na podstawie wyników Real-time QPCR wynosił w większości od kilku do kilkudziesięciu oocyst *T. gondii* w próbce ziemi, a tylko średnio 3 oocysty w próbce warzyw i owoców. Ujemne wyniki z prób wody oraz powietrza, świadczą o braku zanieczyszczenia tych

matryc *T. gondii*. Z drugiej strony te dwa środowiska są trudne do zbadania, ze względu na duże rozproszenie oocyst.

- Duża liczba piaskownic zanieczyszczonych oocystami *T. gondii* stwarza ryzyko nabycia pierwotnej toksoplazmozy przez dzieci i opiekujących się nimi dorosłych.
- Zanieczyszczenie *T. gondii* warzyw i owoców dotyczy prób uzyskanych z mniejszych sklepików, od handlarzy przydrożnych i sprzedawców bazarowych, podczas gdy próby z dużych hipermarketów były ujemne.
- Próby środowiskowe, głównie warzyw i owoców, rzadziej ziemi, zawierają inhibitory PCR, których nie zanotowano w próbach wody i powietrza.
- Dostępne metody odzysku oocyst *T. gondii* sprawdzają się przy dużej kontaminacji materiału, stąd też zanieczyszczenie środowiska może być znacznie większe niż stwierdzono.
- Istnieje konieczność zwiększenia świadomości ludzi, a w szczególności kobiet ciężarnych i/lub planujących ciążę o możliwości zarażenia się pasożytem *T. gondii* przez kontakt z zanieczyszczonym środowiskiem (szczególnie kontakt z ziemią oraz jedzenie niemytych, surowych warzyw i owoców).

8. LITERATURA

1. Afonso E., Lemoine M., Poulle, M-L., Ravat M-C., Romand S., Thulliez P., Villena I., Aubert D., Rabilloud M., Riche B., Gilot-Fromot E. Spatial distribution of soil contamination by *Toxoplasma gondii* in relation to cat defecation behavior in an urban area. *Int. J. Parasitol.* 2008. 38:1017-1023
2. Ajzenberg D., Bañuls A.L., Su C, Dumetrè A., Demar M., Carme B. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 2004. 34:1185–1196.
3. Ajzenberg D., Bañuls A.L., Tibayrenc M., Dardé, M.L. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int. J. Parasitol.* 2002. 32: 27–38.
4. Anonymous (1997). *Cyclospora cayetanensis* protocol: concentration and preparation of oocysts from produce for the polymerase chain reaction (PCR) and microscopy (www document). URL: <http://www.cfsan.fda.gov/mow/cyclmet.html>.
5. Anonymous (1999). Standard Operating Protocol, 2000, for the Monitoring of *Cryptosporidium* Oocysts in Treated Water Supplies to Satisfy Water Supply (Water Quality) (Amendment) Regulations 1999. SI No. 1524.
6. Aouizerate F., Cazenave J., Poirire L., Verin Ph., Cheyrou A., Beguert J., Lagoutte F. Detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor by polymerase chain reaction. *Br. J. Ophthalmol.* 1993. 77: 107–109.
7. Aramini J.J., Stephen C., Dubey J.P., Engelstoff C., Schwantje H., Ribble C.S. Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Epidemiol. Infect.* 1999. 122: 305–315.
8. Arkush K.D., Miller M.A., Leutenegger, Ch.M., Gardner I.A., Packham A.E., Heckerth A.R., Tenter A.M., Barr B.C., Conrad P.A. Molecular and bioassay detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int. J. Parasitol.* 2003. 33: 1087–1097.
9. Aspinall, T.V., Guy E.C., Roberts K.E., Joynson D.H.M., Hyde J.E., Sims P.F.G. Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications. *Int. J. Parasitol.* 2003. 33: 97-103.

10. Aubert D., Villena I. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne Region, France. 2009. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 2009. 104: 290-295.
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. Beazley D.M., Egerman R.S. Toxoplasmosis. *Semin. Perinatol.* 1998. 4: 332-338.
13. Behzadi R., Roohvand F., Razavi M., Hovanessian A, Assmar M. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients and mice by PCR-RFLP assay. *Iranian J. Biotechnol.* 2003. 2: 82-86
14. 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.
15. Bitkowska E., Waloch M., Dzbeński T. H. Oznaczanie awidności swoistych przeciwciał klasy G w serologicznej diagnostyce toksoplazmozy. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2000. 52: 295–300.
16. Bitkowska E., Waloch M., Dzbeński T. H. Wykrywanie krążącego antygenu *Toxoplasma gondii* metodą ELISA. *Wiad. Parazytol.* 1989. 35: 283–242.
17. Boothroyd J. C. Population biology of *Toxoplasma*: clonality, virulence, and speciation. *Infect. Agents Dis.* 1993. 3: 100-102.
18. Bowie W.R., King A.S., Werker D.H., Isaac-Renton J.L., Bell A., Eng S.B., Marion S.A. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet* 1997. 350: 173–177.
19. Burg J.L., Grover C.M., Pouletty P., Boothroyd J.C. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1989. 27: 1783-1792.
20. Carme B., Bissuel F., Ajzenberg D., Bouyne R., Aznar C., Demar M. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J. Clin. Microbiol.* 2002. 40: 4037–4044.
21. Cassaing S., Bessieres M.H., Berry A., Berrebi A., Fabre R., Magnaval J.F. Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis of real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2006. 44: 720-724.

22. Christie E., Pappas P.W., Dubey J.P. Ultrastructure of excystation of *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Protozool.* (1978). 25: 438–443.
23. Chung E., Aldom J.E., Chagla A.H., Kostrzynska M., Lee H., Palmateer G., Trevors J.T., Unger S., De Grandis S. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in municipal water samples by the polymerase chain reaction. *J. Microbiol. Methods.* 1998. 33: 171–180.
24. Cook A.J.C., Gilbert R.E., Buffolano W., Zufferey J., Petersen E., Jenum P.A., Foulon W., Semprini A.E., Dunn D.T. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *Br. Med. J.* 2000. 321: 142-147.
25. Coutinho S.G., Lobo R., Dutra G. Isolation of *Toxoplasma* from the soil during an outbreak of toxoplasmosis in a rural area in Brazil. *J. Parasitol.* 1982. 68: 866–868.
26. Cox E.F. Control of coccidiosis: lessons from other sporozoa. *Int. J. Parasitol.* 1998. 28: 165–179.
27. Cox E.F. Systematics of the parasitic Protozoa. *Trends Parasitol.* 2002.18: 108.
28. Darde M. L. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 2004. 40: 57-63.
29. De Moura L., Bahia-Oliveira L.M., Wada M.Y., Jones J.L., Tuboi S.H., Carmo E.H., Ramalho W.M., Camargo N.J., Trevisan R., Graça R.M., da Silva A.J., Moura I., Dubey J.P., Garrett D.O. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg. Infect. Dis.* 2006.12: 326-329.
30. Desmonts G., Daffos F., Forestier F., Capella-Pavlovsky M., Thulliez P., Chartier M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Lancet.* 1985. 1: 500-504.
31. Długońska H. Inwazyjność i wewnątrzkomórkowe pasożytnictwo *Toxoplasma gondii*. *Wiad. Parazytol.* 2005. 51: 213-217.
32. Długońska H. *Toxoplasma gondii* – pasożyt znany i nieznany. *Wiad. Parazytol.* 2008. 54: 199-204.
33. 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.
34. Dubey J.P. Beattie C.P. Toxoplasmosis of Animals and Man, 220 pp. CRC Press, Boca Raton, FL. 1988.

35. Dubey J.P. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *J. Parasitol.* 1996. 82: 957–961.
36. Dubey J.P. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. *J. Parasitol.* 2002. 88: 713–717.
37. Dubey J.P., Barr B.C., Barta J.R., Bjerkås I., Björkman C., Blagburn B.L., Bowman D.D., Buxton D., Ellis J.T., Gottstein B., Hemphill A., Hill D.E., Howe D.K., Jenkins M.C., Kobayashi Y., Koudela B., Marsh A.E., Mattsson J.G., McAllister M.M., Modrý D., Omata Y., Sibley L.D., Speer C.A., Trees A.J., Uggla A., Upton S.J., Williams D.J.L., Lindsay D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int. J. Parasitol.* 2002. 32: 929–946.
38. Dubey J.P., Chunelei Su. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 2009. 104: 190–195.
39. Dubey J.P., Frenkel J.K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J. Protozool.* 1972. 19: 155–177.
40. Dubey J.P., Jenkins M.C., Thayer D.W. Irradiation killing of *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1996. 45: 123.
41. Dubey J.P., Miller N.L., Frenkel J.K. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 1970. 56: 447–456.
42. Dubey J.P., Speer C.A., Shen S.K., Kwok O.C.H., Blixt J.A. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Parasitol.* 1997. 83: 870–882.
43. Dubey J.P., Thayer D.W., Speer C.A., Shen S.K. Effect of gamma irradiation on unsporulated and sporulated *Toxoplasma gondii* oocysts. *Int. J. Parasitol.* 1998. 28: 369–375.
44. Dubey J.P., Weigel R.M., Siegel A.M., Thulliez P., Kitron U.D., Mitchell M.A., Mannelli A., Mateus-Pinilla N.E., Shen S.K., Kwok O.C.H., Todd K.S. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *J. Parasitol.* 1995. 81: 723–729.
45. Dubey J.P. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *J. Parasitol.* 1998. 84: 862–865
46. Dubremetz J. F. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Trends. Microbiol.* 1998. 6: 27–30.

47. Dumètre A., Dardé M.L. . Purification of *Toxoplasma gondii* oocysts by cesium chloride gradient. *J. Microbiol. Methods*. 2004. 56: 427- 430.
48. Dumètre A., Dardé M.L. Detection of *Toxoplasma gondii* in water by an immunomagnetic separation method targeting the sporocysts. *Parasitol. Res.* 2007.101: 989-96.
49. Dumètre A., Dardé M.L. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? *FEMS Microbiol. Rev.* 2003. 27: 651-661.
50. Dumètre A., Dardé M.L. Immunomagnetic separation of *Toxoplasma gondii* oocysts using a monoclonal antibody directed against the oocyst wall. *J. Microbiol. Methods*. 2005. 61: 209-217.
51. Dupouy-Camet J., Gavinet M. F., Paugam A., Tourte Schaefer Cl. Mode de contamination, incidence et prévalence de la toxoplasmose. *Méd. Mal. Infect.* 1993. 23: 139-147.
52. Dytnerka K., Stączek P., Długońska H. *Toxoplasma gondii* – kosmopolityczny pasożyt o małym zróżnicowaniu genetycznym. *Post. Mikrobiol.* 2004. 43:141-154.
53. Dzbeński T.H. Walory i wady niektórych testów serologicznych używanych w diagnostyce toksoplazmozy wrodzonej i nabytej. *Materiały IV Konferencji Naukowo–Szkoleniowej nt. Toksoplazmozy*. 1985.Poznań.
54. Dzbeński T.H.: Intrygujące aspekty odporności i zapobiegania w toksoplazmozie. *Przegl. Epidemiol.* 2003. 57: 571-577
55. Dzbeński, T. Zasady diagnostyki laboratoryjnej toksoplazmozy. W: Milewska-Bobula B (red) Warszawa. 1999. 31-39.
56. Dziubek Z., Żarnowska-Prymek H. Choroby pasożytnicze człowieka. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 1999, Warszawa.
57. Edvinsson B., Dardé M. L., Pelloux H, Evengard B. Rapid genotyping of *Toxoplasma gondii* by pyrosequencing. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006. 13: 424-429.
58. Fayer R., Dubey J.P., Lindsay D.S. Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends Parasitol.* 2004. 20: 531-536.
59. Fayer R., Graczyk T.K., Lewis E.J., Trout J.M., Farley C.A. Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. 64: 1070–1074.

60. Freire-Santos F., Oteiza-López A.M., Vergara-Castiblanco C.A., Ares-Mazás E., Alvarez-Suárez E., García-Martín O. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve molluscs destined for human consumption. *J. Parasitol.* 2000. 86: 853–854.
61. Freire-Santos F., Oteiza-López A.M., Vergara-Castiblanco C.A., Ares-Mazás E. Study of the combined influence of environmental factors on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water evaluated by fluorogenic vital dyes and excystation techniques. *Vet. Parasitol.* 2000. 89: 253–259.
62. Frenkel J. K. *Toxoplasma* in and around us. *BioScience.* 1973. 23: 343 – 352.
63. Frenkel J.K., Dubey J.P. Effects of freezing on the viability of *Toxoplasma* oocysts. *J. Parasitol.* 1973. 59: 587–588.
64. Frenkel J.K., Hassanein K.M., Hassanein R.S., Brown E., Thulliez P., Quintero-Nunez R. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama City, Panama: a five-year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1995. 53: 458–468.
65. Frenkel J.K., Ruiz A., Chinchilla M. Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1975. 24: 439–443
66. Fuentes I., Rubio J.M., Ramirez C., Alvar J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 2001. 39: 1566-1570.
67. Garcia L. S. Diagnostic Medical Parasitology. ASM Press. 2007. 130-140.
68. Grigg M. E., Ganatra J. C. Boothroyd and T. P. Margolis. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 2001. 184: 633.
69. Grob U., Roggenkamp A., Janitschke K., Heesemann J. Improved sensitivity of the polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii* in biological human clinical specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1992. 11: 33-39.
70. Grover C. M., Thulliez P., Remington J. S. Boothroyd J. C. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *J. Clin. Microbiol.* 1990. 28: 2297 – 2301.

71. Grzeszczuk A., Bobrowska E. Ocena serologicznej diagnostyki toksoplazmozy przy użyciu metody immunoenzymatyczno-fluorescencyjnej (ELFA) i immunofluorescencji pośredniej (IF). *Diag. Lab.* 1995. 31: 245-248.
72. Hallier-Soulier S., Guillot E. An immunomagnetic separation polymerase chain reaction assay for rapid and ultra-sensitive detection of *Cryptosporidium parvum* in drinking water. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999. 176: 285–289.
73. Hallier-Soulier S., Guillot E. Detection of *Cryptosporidia* and *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental water samples by immunomagnetic separation-polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.* 2000. 89: 5–10.
74. Hassan M. Mansour S., Atta M., Schalaby M., Seksaka M., Awad A., The importance of detecting circulating *Toxoplasma* antigens in human cases. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 1997. 27: 27-34.
75. Herwaldt B. L. Laboratory – acquired parasitic infection from accidental exposures. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001. 14: 659-699.
76. Ho – Yen D. O., Joss A. W. L., Balfour A. H., Smyth E. T., Baird D., Chatterton J. M.W. Use of the polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in human blood samples. *J. Clin. Pathol.* 1992. 45: 910 – 913.
77. Ho A.Y., Lopez A.S., Eberhart M.G., Levenson R., Finkel B.S., da Silva A.J., Roberts J.M., Orlandi P.A., Johnson C.C., Herwaldt B.L. Outbreak of cyclosporiasis associated with imported raspberries, Philadelphia, Pennsylvania, 2000. *Emerg. Inf. Dis.* 2002. 8: 783–788.
78. Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, Verschueren H Identification of a 200 to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int. J. Parasitol* 2000. 30: 69-75.
79. Howe D., Sibley L.D. *Toxoplasma gondii* Comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 1995. 172: 1561-1566.
80. Howe DK, Honoré S, Derouin F, Sibley LD. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 1997. 35: 1411-1414.
81. Inouye S., Hasegawa A., Matsuno S., Katow S. Changes in antibody avidity after virus infections: detection by an immunosorbent assay in

- which a mild protein – denaturing agent is employed. *J. Clin. Microbiol.* 1984. 20: 525 – 9.
82. Isaac-Renton J., Bowie W.R., King A., Irwin G.S., Ong, C.S., Fung C.P., Shokeir M.O., Dubey J.P. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. 64: 2278-2280.
83. Israelski D.M., and Remington J.S. Toxoplasmosis in the non-AIDS immunocompromised host. *Curr. Clin. Top. Infect. Dis.* 1993. 13: 322-356.
84. Jędrzejewski Sz., Graczyk T. K., Słodowicz-Kowalska A., Tamang L., Majewska A. C. Quantitative Assessment of Contamination of Fresh Food Produce of Various Retail Types by Human-Virulent Microsporidian Spores. *J. Infect. Dis.* 2007. 184: 633–639.
85. Johnson D.W., Pieniazek N.J., Griffin D.W., Misener I., Rose J.B. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. 61: 3849–3855.
86. Kadłubowski R., Kornatowska A. (red). Zarys parazytologii lekarskiej. PZWL. Warszawa 1979.
87. Kasprzak W. i Majewska A.C. Kryptosporydioza – parazytoza o typowym uwarunkowaniu środowiskowym. *Wiad. Parazytol.* 1995. 41: 149-154.
88. Kasprzak W., Rauhut W., Mazur T.: przenoszenie cyst *Gardia*. Owoce i jarzyny jako źródło inwazji. *Wiad. Parazytol.* 1981. 27: 565-571.
89. Keenihan S.H., Schettters T., Taverne J. *Toxoplasma* in Brasil. *Trends Parazytol.* 2002.18: 203-204.
90. Kniel K.E., Lindsay D.S., Sumner S.S., Hackney C.R., Pierson M.D., Dubey J.P. Examination of attachment and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts on raspberries and blueberries. 2002. *J. Parasitol.* 88: 790–793.
91. Kocięcka W. Toksoplazmoza nabyta dzieci i osób dorosłych. W: Toksoplazmoza. Milewska-Bobula (red). Warszawa. 1999.
92. Kourenti C., Heckerroth A., Tenter A., Karanis P. Development and application of different methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. 69: 102-106.
93. Kourenti C., Karanis P. Evaluation and applicability of a purification method coupled with nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. *Lett. Appl. Microbiol.* 2006. 43: 475-481.

94. Kourenti C., Karanis P. Development of a sensitive polymerase chain reaction method for the detection of *Toxoplasma gondii* in water. *Water Sci Technol* 2004.50: 287-291.
95. Kraszewski J. i Miller A. Epidemie XXI wieku – Toksoplazmoza. *Alergia*. 2004. 2: 30-37
96. Kutičić V., Wikerhauser T. Studies of the effect of various treatments on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts and oocysts. *Curr. Trop. Microbiol. Immunol.* 1996. 219: 261–265.
97. Lieberg O., Sandell M. Spatial organization and reproductive tactics in the domestic cat and other felids. In: Turner D.C., Beteson P. (Eds.) *The Domestic Cat, the Biology of its Behaviour.* Cambridge University Press, 1988. 83–98.
98. Lin M-H., Chen T-Ch., Kuo T-T., Tseng Ch-Ch., Tsen Ch-P. Real-time PCR for Quantitative Detection of *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.* 2000. 38: 4121–4125.
99. Lindsay D.S., Blagburn B.L., Dubey J.P. Survival of nonsporulated *Toxoplasma gondii* oocysts under refrigerator conditions. *Vet. Parasitol.* 2002. 103: 309–313.
100. Lindsay D.S., Phelps K.K., Smith S.A., Flick G., Sumner S.S., Dubey J.P. Removal of *Toxoplasma gondii* oocysts from sea water by eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Eukaryot. Microbiol. Suppl.* 2001. 197–198
101. Lipka B. i Milewska-Bobula B. Toksoplazmoza wrodzona. *Pediat. Pol.* 2001. 76: 79-84
102. Luft B.J., and Remington J.S. 1992. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 15: 211-222.
103. MacDonald D.W., The ecology of carnivore social behavior. *Nature.* 1983. 301: 379–389.
104. Matheson Z, Hargy T.M., McCuin R.M., Clancy J.L., Fricker C. An evaluation of the Gelman envirochek capsule for the simultaneous concentration of *Cryptosporidium* and *Giardia* from water. *J. Appl. Microbiol.* 1998. 85: 755-761.
105. Michalski M. i Platt-Samoraj A. Ekstensywność inwazji *Toxoplasma gondii* u kotów z terenu Olsztyna. *Wiad. Parazytol.* 2004. 50: 303-305.

106. Milewska-Bobula, B. Toksoplazmoza wrodzona. W: Toksoplazmoza. Warszawa. 1999.
107. Miller M.A., Gardner I.A., Kreuder C., Paradies D.M., Worcester K.R., Jessup D.A., Dodd E., Harris M.D., Ames J.A., Packham A.E., Conrad P.A. Coastal freshwater runoff is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *Int. J. Parasitol.* 2002. 32: 997–1006.
108. Mizgajska-Wiktor, H. Recommended method for recovery of *Toxocara* and other geohelminth eggs from soil. *Wiad. Parazytol.* 2005. 51: 21-22.
109. Mondragon R., Howe D.K., Dubbey J.P., Sibley L.D. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. *J. Parasitol.* 1998. 84: 639-641.
110. Nieminski E.C.F.W. Schaefer III Ongerth J.E. Comparison of two methods for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. 61: 1714–1719.
111. Niewiadomska K., Pojmańska T., Machnicka B., Czubaj A. Zarys parazytologii ogólnej. Wyd. Naukowe PWN Warszawa, 2001.
112. Nowakowska D., Colón I., Remington J. S., Grigg M., Gołąb E., Wilczyński J., Sibley L. D. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multiplex PCR and peptide-based serological testing of samples from infants in Poland diagnosed with congenital toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 2006. 44: 1382-1389.
113. Owen M.R., Trees A.J. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. *J. Parasitol.* 1999. 85: 382-384.
114. Patrzałek M., Sieczko W., Reznier A. Występowanie zarażeń *Toxoplasma gondii* wśród dzieci województwa kieleckiego. *Przegl. Epidem.* 1990. 44: 323-326.
115. Paul M. Potencjalne źródła zarażenia *Toxoplasma gondii* w przypadkach badanych w krótkim czasie po zarażeniu. *Przegl. Epidem.* 1998. 52: 447-454.
116. Paul M. Toksoplazmoza – groźna choroba pasożytnicza kobiet ciężarnych i pacjentów z osłabioną funkcją układu odpornościowego. *Kosmos – problemy nauk biologicznych.* 2005. 54: 77- 88.
117. Paul M. Zastosowanie metody ISAGA w wykrywaniu swoistych przeciwciał IgM, IgA, IgE w nabytej i wrodzonej toksoplazmozie. *Wiad. Parazytol.* 1998. 43: 39 – 51.

118. Pawłowski Z.: Epidemiologia toksoplazmozy i jej zapobieganie. W: Toksoplazmoza (red.) Milewska-Bobula B. 1999 Warszawa.
119. Pawłowski Z. Epidemiologia kliniczna toksoplazmozy w województwie poznańskim. *Klin. Perin. Gin. Suppl.* 1995. 11: 5-11.
120. Petersen E., Dubey J.P. Biology of *Toxoplasma gondii*. In: Joynson D.H., Wreghitt T. (Eds.). *Toxoplasmosis: a Comprehensive Clinical Guide, Cambridge University Press, Cambridge.* 2001. 1-49.
121. Pinon J. M., Dumon, H., Chemla C., Franck J., Petersen E., Lebech M., Zuffery, J., Bessieres, M.H., Marty P., Holiman, R., Johnson, J., Luyasu, V., Lecolier B., Guy E., Joynson D.H., Decoster A., Enders G., Pelloux H., Candolfi E. Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mother and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M and A antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 2001. 39: 2267 – 2271.
122. Rochelle PA, De Leon R, Johnson A, Stewart MH, Wolfe RL Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. 65: 841-845.
123. Rose J.B., Huffman D.E., Gennaccaro A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. *FEMS Microbiol. Rev.* 2002. 26: 113–123.
124. Ruiz A., Frenkel J.K. Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1980. 29: 1161–1166.
125. Ruiz A., Frenkel J.K., Cerdas L. Isolation of *Toxoplasma* from soil. *J. Parasitol.* 1973. 59: 204–206.
126. Schwab K.J., McDevitt J.J. Development of PCR – enzyme immunoassay oligoprobe detection method for *Toxoplasma gondii* oocyst, incorporating PCR controls. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. 69: 5819-5825.
127. Sibley L. D., Boothroyd J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal line-age. *Nature.* 1992. 359: 82-85.
128. Smith D.D., Frenkel J.K. Cockroaches as vectors of *Sarcocystis muris* and other coccidia in the laboratory. *J. Parasitol.* 1978. 64: 315–319.
129. Sotiriadou I., Karanis P. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Toxoplasma gondii* in watersamples and comparative findings by polymerase chain reaction and

- immunofluorescence test (IFT). *Diagn Microbiol. Infect. Dis.* 2008. 62: 357-365.
130. Speer C.A., Clark S., Dubey J.P. Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 1998. 84: 505-12.
131. Śpiewak E., Małafiej E. Toksoplazmoza – wybrane zagadnienia epidemiologii, kliniki i diagnostyki. *Microb. Med.* 1996. 1: 14–28.
132. Sroka J., Wojcik-Fatla A., Dutkiewicz J. Occurrence of *Toxoplasma gondii* in water from wells located on farms. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2006.13: 169-175.
133. Sroka J., Zwoliński J., Dutkiewicz J. Częstość występowania przeciwciał anty-*Toxoplasma gondii* wśród pracowników Zakładów Mięsnych w Lublinie. *Wiad. Parazytol.* 2003. 49: 47-55.
134. Stagno S., Dykes A.C., Amos C.S., Head R. A., Juranek D.D., Walls K. An outbreak of toxoplasmosis linked to cats. *Pediatrics.* 1980. 65: 706-711.
135. Steward M. W., Lew A. M. The importance of antibody affinity in the performance of immunoassays for antibody. *J. Immunol. Methods.* 1985. 78: 173 – 190.
136. Sulima P. Występowanie *Giardia*, *Cryptosporidium* i *Cyclospora* w wodzie pitnej i w wodach powierzchniowych miasta Poznania i okolic. Rozprawa doktorska. Katedra Biologii i Parazytologii Lekarskiej AM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. 2001
137. Świtaj K., Master A., Borkowski P. K., Skrzypczak M., Wojciechowicz J., Zaborowski P. Association of ocular toxoplasmosis with type I *Toxoplasma gondii* strains: direct genotyping from peripheral blood samples. *J. Clin. Microbiol.* 2006. 11: 4262–4264
138. Tenter A.M. Heckerroth A.R., Weiss L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 2000. 30: 1217 – 1258.
139. Teutsch S.M., Juranek D.D., Sulzer A., Dubey J.P., Sikes R.K. Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. *N. Engl. J. Med.* 1979. 300: 695–699.
140. Turner D.C., Bateson P.B., The domestic cat, the biology of its behavior. *Cambridge University Press.* 2000.

141. Uga S., Minami T., Nagata K. Detection habits of cats and dogs and contamination by *Toxocara* eggs in public park sandpits. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996. 54: 122 – 126.
142. Umiński J., Cisak E., Badowa J., Zwoliński J. Badania nad występowaniem toksoplazmozy wrodzonej w makroregionie lubelskim. *Biul. Met.-Org. IMMiT w Gdyni.* 1994. 27: 161-162.
143. USEPA 1999. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. Office of Water. EPA-821-R-99-006.
144. Vesey G., Slide J.S., Byrne M., Shepherd K., Fricker C.R. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocyst from water. *J. Appl. Bacteriol.* 1993, 75: 82-86.
145. Villena I., Aubert D., Gomis P., Ferte H., Ingard J.Ch., Denis-Bisoux H., Dondon J. M., Pisano E., Ortis N., Pinon J.M. Evaluation of strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. 70: 4035-4039.
146. Wainwright K. E., Lagunas-Solar M., Miller M. A., Barr B.C., Gardner I. A., Pina C., Melli A.C., Packham A. E., Zeng N., Troung T., Conrad P. A. Physical inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. 17: 5663 – 5666.
147. Wąsiatycz G. Ekstensywność zarażenia kotów *Toxoplasma gondii* w Poznaniu i jego okolicy w aspekcie niebezpieczeństwa inwazji tego pierwotniaka dla człowieka. *Wiad. Parazytol.* 1998. 44: 693-704.
148. Wawrzyniak U. Eksperymentalna ocena stopnia wykrywalności jaj helmintów w podłożu przy zastosowaniu dwóch metod. *Wiad. Parazytol.* 1991. 37: 351-355.
149. Weigel R.M., Dubey J.P., Dyer D., Siegel A.M. Risk factors for infection with *Toxoplasma gondii* for residents and workers on swine farms in Illinois. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999. 60: 793-798.
150. Wiedenmann, A., Krüger, P., Botzenhart, K. PCR detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental samples - a review of published protocols and current developments. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1998. 21:150–166.
151. Wilson R. J., Williamson D. H., Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1997. 61: 1-16.

152. Won Y.C., Nam H.W., Kwak N.H. i wsp. Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 1997. 175: 1280-1282.
153. Wong S.Y., Remington J.S. Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS.* 1993.7: 299-316.
154. Wong S.Y., Remington J.S.. Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin. Infect. Dis.* 1994. 18: 853-861.
155. Yilmaz S.M., Hopkins S.H. Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Parasitol.* 1972. 58: 938–939
156. Zaremba L.M., Borowski J.: Mikrobiologia lekarska dla studentów medycyny. Wyd. III, PZWL. 2001.

9. INDEKS SKRÓTÓW

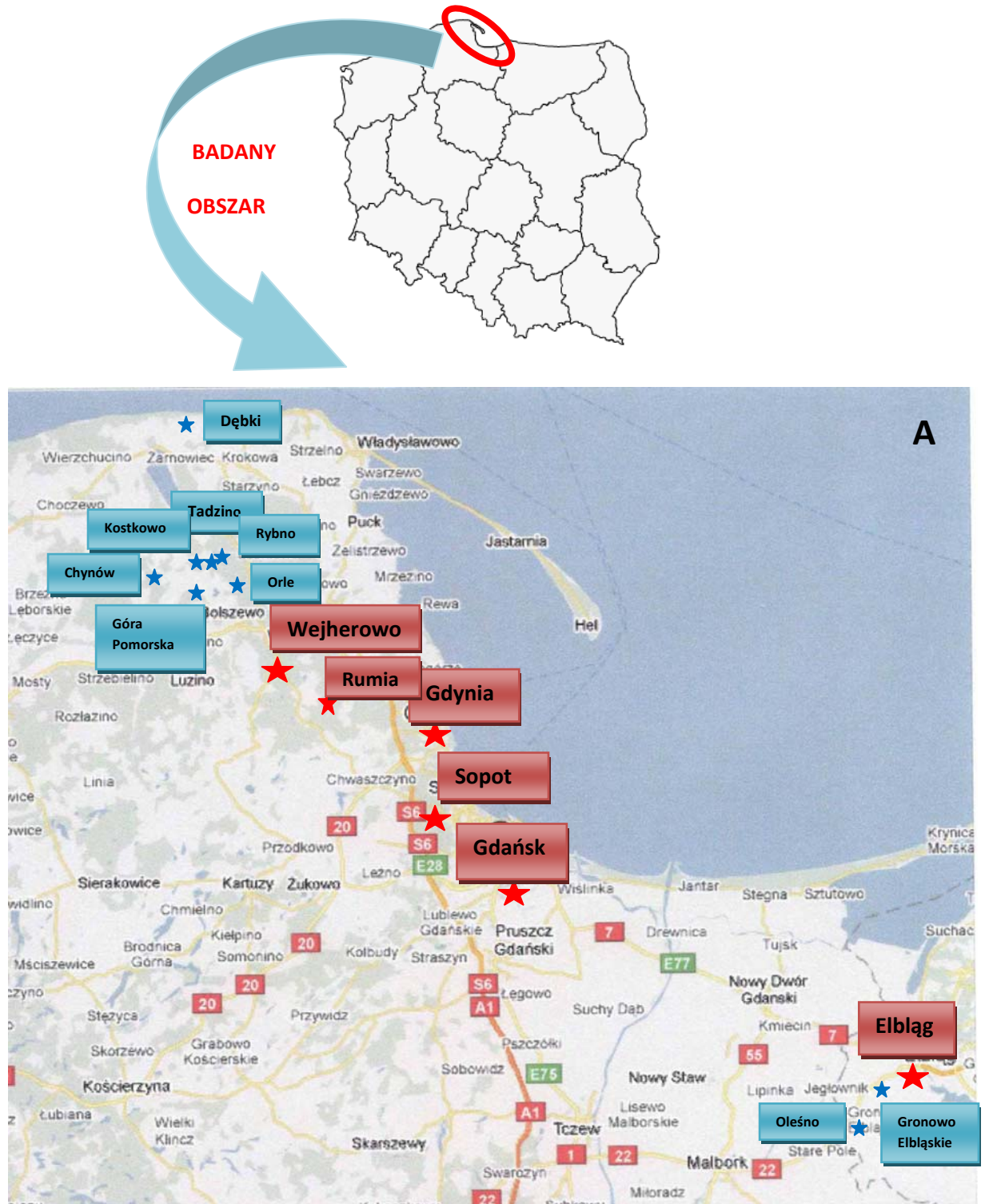
- AIDS – Zespół Nabytego Braku Odporności (ang. Acquired Immunodeficiency Syndrome)
- BSA – albumina osocza krwi bydlęcej (ang. Bovine Serum Albumin)
- CDC – agencja rządu federalnego USA: Centrum Zwalczania i Zapobiegania Chorób (ang. Centers for Disease Control and Prevention)
- Da – dalton (nazwa jednostki masy atomowej)
- DNA – kwas deoksyrybonukleinowy
- ELIFA – technika immunoenzymatyczno – fluorescencyjna (ang. Enzyme Linked Fluorescent Assay)
- ELISA – technika immunoenzymatyczna (ang. Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
- FISH – technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (ang. Fluorescence *in situ* Hybridisation)
- IFA – technika immunofluorescencyjna (ang. Immunofluorescent assay)
- IMS – technika immunomagnetycznej separacji (ang. Immunomagnetic Separation)
- ISAGA – technika aglutynacji immunoabsorbcyjnej (ang. Immunosorbent Agglutination Assay)
- MS – sekwencje mikrosatelitarne (krótkie, powtarzające się sekwencje nukleotydów)
- PCR – Polimerazowa Reakcja Łańcuchowa (ang. Polymerase Chain Reaction)
- pz – raz zasad
- RAPD - losowa amplifikacja polimorficznych fragmentów DNA (ang. Random Amplification of Polymorphic DNA)
- RFLP - analiza polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych (ang. Restriction Fragment Length Polymorphism)
- RT-PCR – reakcja odwrotnej transkrypcji sprzężona z łańcuchową reakcją polimerazy (ang. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)
- SDS – sól sodowa siarczanu dodecyłu
- Tris – tris[hydroksymetylo]aminometan

10. ZAŁĄCZNIKI

W tym rozdziale umieszczono szczegółowe dane dotyczące zebranego materiału badawczego oraz wyniki badań w formie dokładnych zestawień i map. Jest to uzupełnienie i rozszerzenie rozdziałów: „Materiały i metody” oraz „Wyniki”, które umożliwiają pełną interpretację wyników badań, a umieszczenie ich w głównych częściach rozprawy mogłoby zaburzyć czytelność całej pracy.

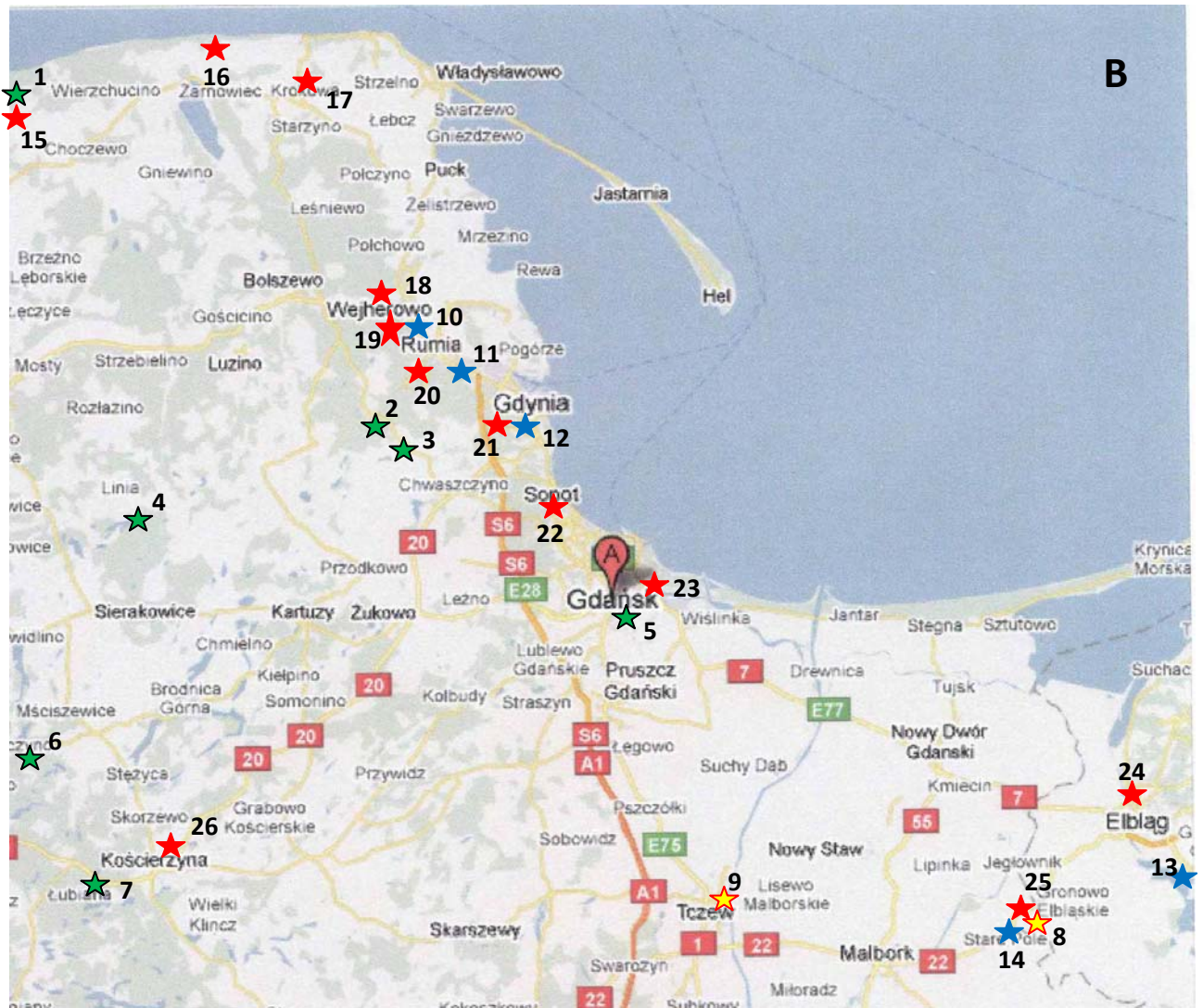
Załącznik 1.

Poniżej, na mapach (Rycina 54 A, B, C) zaznaczono orientacyjnie tereny Polski Północnej, z których pobierane były próby środowiskowe do badań.



★ miasta, ★ wsie, w których pobierano próby środowiskowe

Rycina 54 A. Mapa miejsc pobierania prób ziemi, powietrza, warzyw i owoców.



Rycina 54 B. Mapa miejsc pobierania prób wody ze studni, rzek oraz wody wodociągowej.

- ★ Studnie głębinowe: 1 – Kopalino (matryca 13-17), 2 – Bieszkowice (matryca 23), 3 – Koleczkowo (matryca 20), 4 – Kopalino (matryca 19), 5 – Gdańsk (matryca 24), 6 – Żakowo (matryca 30), 7 – Garczyn (matryca 35)
- ★ Studnie odkryte 8 – Oleśno (matryce 1-4), 9 – Tczew (matryca 5)
- ★ Rzeki: 10 – rz. Reda (matryca 44), 11 – rz. Zagórzanka (matryca 34), 12 – rz. Kacza (matryca 45), 13 – Kanał Elbląski (matryca 47), 14 – rz. Fiszewka (matryca 48)
- ★ Woda wodociągowa: 15 – Kopalino (matryca 12), 16 – Dębki (matryca 49), 17 – Krokowa (matryca 27), 18 – Wejherowo (matryca 7), 19 – Reda (matryca 31), 20 – Rumia (matryca 11), 21 – Gdynia (matryca 8 – 10), 22 – Sopot (matryce 43), 23 – Gdańsk (matryce 24, 25, 28, 42), 24 – Elbląg (matryca 6), 25 – Oleśno (matryca 50), 26 – Kościerzyna (matryca 40).



Rycina 54 C. Mapa miejsc pobierania wody z jezior.

★ woda pobrana z jezior (kąpieliska):

1- J. Żarnowieckie (matryca 32), 2 - J. Choczewskie (nr matryca 33), 3 – J. Salino (nr matryca 29), 4 - J. Orle (matryca 36), 5 - J. Wyspowo (matryca 46), 6 - J. Wygoda (matryca 21), 8 – J. Marchowo (matryca 18), 9 – J. Białe (matryca 38), 10 – J. Klasztorne (matryca 37), 12 - J. Raduńskie (matryca 39).

Rycina 54 A, B, C. Mapy ilustrujące badane rejony, w których pobierano próby środowiskowe do badań. W nawiasach podano numery matryc pochodzących z danego miejsca zaznaczonego na mapie.

Załącznik 2.

Tabela 39. Zestawienie zebranych prób środowiskowych ziemi.

numer matrycy	miejsce pobrania próby	rodzaj pobranej próby
1	Gdańsk Chełm, ul. Cieszyńskiego	piaskownica
2	Gdańsk Chełm, ul. Kopeckiego	piaskownica
3	Gdańsk Chełm, ul. Dragana	piaskownica
4	Gdańsk Chełm, ul. Witosa (OSIR)	piaskownica
5	Gdańsk Chełm, ul. Więckowskiego	piaskownica
6	Gdańsk Chełm, ul. Jabłońskiego	piaskownica
7	Gdańsk Chełm, ul. Chałubińskiego (przedszkole)	piaskownica
8	Gdynia Karwiny, ul. Makuszyńskiego	piaskownica
9	Gdynia Redłowo, ul. Legionów	piaskownica
10 *	Gdynia, ul. Powstania Styczniowego, IMMiT	hałda piachu(piach gospodarczy)
11	Gdańsk Starówka	piaskownica
12	Gdańsk Śródmieście, teren Pałacu młodzieży	piaskownica
13	Gdańsk Śródmieście, przedszkole	piaskownica
14	Gdańsk Śródmieście, ul. Rzeźnicka	piaskownica
15	Gdańsk Śródmieście, ul. Podwale Staromiejskie	piasek przy śmietniku osiedlowym
16	Gdańsk Morena, ul. Warneńska	piasek przy bloku osiedlowym
17	Gdańsk Morena, ul. Belgradzka	Piaskownica
18	Gdańsk Morena, ul. Bulońska	piasek przy śmietniku osiedlowym
19	Gdańsk Morena, ul. Orańska	piaskownica
20	Sopot, ul. Kasprowicza	piaskownica
21	Sopot, ul. Bitwy pod Płowcami	piaskownica
22	Sopot, ul. Chopina	piaskownica
23	Sopot, ul. 23 Marca	piaskownica (plac zabaw)
24	Gdynia Obłuze, ul. Unruga	piaskownica
25	Gdynia Główna, ul. Dworcowa	piaskownica
26	Gdynia Redłowo, ul. Balladyny	piaskownica
27 *	Gdynia ul. Powstania Styczniowego, IMMiT	hałda piasku (piach gospodarczy)
28	Gdańsk Morena, ul. Warneńska	piasek przy śmietniku osiedlowym
29	Gdańsk Siedlce, ul. Szara	piaskownica
30	Gdańsk Śródmieście, ul. Zakopiańska	piaskownica
31	Gdańsk Śródmieście ul. Sołtecka	piaskownica
32	Gdańsk Śródmieście, ul. Roweckiego	piasek przy śmietniku osiedlowym
33	Gdańsk Chełm, ul Cieszyńskiego	piaskownica
34	Gdynia Dąbrowa, ul. Waniliowa	piaskownica
35	Gdynia Redłowo, ul. Buraczana	piaskownica
36	Gdynia Dąbrowa, ul. Nowowiczlińska	piaskownica
37	Gdynia Dąbrowa, ul. Imbirowa	piaskownica
38	Gdynia Pogórze, ul. Baczyńskiego	piaskownica
39	Gdynia Obłuze, ul. Cechowa	piaskownica
40	Gdynia Chylonia, ul. Kcyńska	piaskownica
41 *	Gdynia, ul. Powstania Styczniowego, IMMiT	hałda piasku (piach gospodarczy)
42	Gdynia Karwiny, ul. Porazińskiej	piaskownica
43	Gdynia Chylonia, ul. Hutnicza	piaskownica
44	Gdynia Chylonia, ul. Morska	piaskownica
45	Gdynia Dąbrowa, ul. Lukrecjowa	piaskownica

46	Gdynia Dąbrowa, ul. Sezamowa	piaskownica
47	Gdynia Karwiny, ul. Tuwima	piaskownica
48	Gdynia Dąbrowa, ul. Paprykowa	piasek przy śmietniku osiedlowym
49	Gdynia Chylonia, ul. Sucharskiego	piaskownica
50	Sopot, ul. Żeromskiego	piaskownica
51	Sopot, ul. Tuwima	piaskownica
52	Sopot, ul. Mickiewicza	piasek przy śmietniku osiedlowym
53	Sopot, ul. Prusa	piaskownica
54	Sopot, ul. Abrahama	piaskownica
55	Sopot, ul. Paderewskiego	piaskownica
56	Gdańsk Oliwa, ul. Husa	piaskownica
57	Gdańsk Oliwa, ul. Wąsowicza	piaskownica
58	Gdańsk Oliwa, ul. Kręckiego	piaskownica
59	Gdańsk Oliwa, ul. Asnyka	piaskownica
60	Gdańsk Oliwa, ul. Kaprów	piaskownica
61	Gdańsk Oliwa, ul. Startowa	piaskownica
62	Gdańsk Zaspa, ul. Drzymały	piaskownica
63	Gdańsk Zaspa, ul. Pilotów	piaskownica
64	Gdańsk Zaspa, ul. Dywizjonu 303	piasek przy bloku osiedlowym
65	Gdańsk Zaspa, ul. Kombatantów	piasek przy bloku osiedlowym
66	Gdańsk Zaspa, ul. Meissnera	piaskownica
67 *	Gdynia, ul. Powstania Styczniowego, IMMiT	hałda piasku (piach gospodarczy)
68 *	Gdynia, ul. Powstania Styczniowego, IMMiT	hałda piasku (piach gospodarczy)
69	Gdańsk Brzeźno, ul. Sternicza	piaskownica
70	Gdańsk Brzeźno, ul. E. Plater	piaskownica
71	Gdańsk Brzeźno, ul. Mazurska	piaskownica
72	Gdańsk Brzeźno, ul. Herbowa	piaskownica
73	Gdańsk Brzeźno, ul. Broniewskiego	piaskownica
74	Gdańsk Przymorze, ul. Sztormowa	piaskownica
75	Gdańsk Przymorze, ul. Rybacka	piaskownica
76	Gdańsk Przymorze, ul. Gospody	piaskownica
77	Gdańsk Przymorze, ul. Szyprów	piaskownica
78	Gdańsk Przymorze, ul. Gdyńska	piaskownica
79	Gdańsk Przymorze, ul. Gdyńska	piaskownica
80	Sopot, ul. 23 Marca	piaskownica
81	Sopot, ul. Chopina	piaskownica
82	Sopot, ul. Tuwima	piaskownica
83	Sopot, ul. Żeromskiego	piaskownica
84	Gdańsk Chełm, ul. Cieszyńskiego	piaskownica
85	Gdańsk Chełm, ul. Dragana	piaskownica
86	Gdańsk Chełm, ul. Witosa	piaskownica
87	Gdańsk Chełm, ul. Więckowskiego	piaskownica
88	Gdańsk Chełm, ul. Biegańskiego	piaskownica
89	Gdańsk Chełm, ul. Warneńska	piaskownica
90	Gdańsk Wrzeszcz, ul. Jesionowa	piaskownica
91	Gdańsk, Wrzeszcz, ul. Patyzantów	Piaskownica
92	Gdańsk, Wrzeszcz, ul. Batorego	piaskownica
93	Gdańsk, Wrzeszcz, ul. Staszica	piaskownica
94	Sopot, ul. Parkowa (park k. Łazienek Północnych)	piaskownica
95	Sopot, ul. Parkowa	piaskownica
96	Sopot, ul. 3 Maja	piaskownica
97	Sopot, ul. 3 Maja	piaskownica
98	Sopot, ul. 3 Maja	piaskownica

99	Sopot, ul. Parkowa	piaskownica
100	Sopot, ul. Parkowa	piaskownica
101	Sopot, ul. 3 Maja	piaskownica
102	Gdynia Obuże, ul. Cechowa	piaskownica
103	Gronowo Elbląskie (gospodarstwo1)	ogród warzywny 1
104	Gronowo Elbląskie (gospodarstwo1)	ogród warzywny 2
105	Gronowo Elbląskie (gospodarstwo1)	podwórko (obejście domu)
106	Gronowo Elbląskie (gospodarstwo2)	ogród warzywny
107	Gronowo Elbląskie (gospodarstwo2)	ogród kwiatowy
108	Oleśno (gospodarstwo3)	ogród warzywny
109	Elbląg , działka1	ogródek działkowy
110	Elbląg, działka2	ogródek działkowy
111	Kostkowo (gospodarstwo1)	podwórko, hałda piasku 1
112	Kostkowo (gospodarstwo 1)	podwórko, hałda piasku2
113	Kostkowo (gospodarstwo 2)	podwórko domowe
114	Kostkowo (gospodarstwo 3)	ogród warzywny
115	Rybno (gospodarstwo1)	podwórko 1
116	Rybno (gospodarstwo 1)	podwórko 2
117	Gdynia, ul. Powstania Wielkopolskiego	piasek przy bloku osiedlowym
118	Gdynia Chylonia, ul. Wejherowska	piaskownica
119	Gdynia Redłowo, ul. Kurlanda	piasek przy bloku osiedlowym
120	Gdynia Redłowo, ul. Cylikowskiego	piasek przy bloku osiedlowym
121	Gdynia, ul. Powstania wielkopolskiego 68	piasek przy bloku osiedlowym
122	Gdynia, ul. Powstania wielkopolskiego 97	piasek przy bloku osiedlowym
123	Gdynia Redłowo, ul. Powstania Śląskiego	piasek przy bloku osiedlowym
124	Dębki (gospodarstwo)	ogród
125	Gdynia Główna, ul. Wójta Radkego	piasek przy śmietniku osiedlowym
126	Gdynia Chylonia, Park Chyloński	piaskownica
127	Gdynia Redłowo ,przy Al. Zwycięstwa	ogródki działkowe
128	Gdynia Redłowo ,przy Al. Zwycięstwa	ogródki działkowe
129	Gdańsk Zaspą, ul. Startowa	piasek przy bloku osiedlowym
130	Gdańsk Zaspą, ul. Startowa	piasek przy śmietniku osiedlowym
131	Wejherowo, ul. Ofiar Piaśnicy	ogród przydomowy (kwiatowy)
132	Wejherowo, ul. Ofiar Piaśnicy	ogród przydomowy (kwiatowy)
133	Wejherowo, ul. Ofiar Piaśnicy	podwórko
134	Gdańsk Brzeźno, ul. Korzeniowskiego	piaskownica
135	Gdańsk Brzeźno, ul. Oksywska	piaskownica
136	Gdańsk Brzeźno, ul. Miła	piaskownica
137	Wejherowo, ul. Harcerska	piasek przy bloku osiedlowym
138	Wejherowo, ul. Chopina	piasek przy bloku osiedlowym
139	Gdynia Chylonia, ul. Tczewska	ogródek kwiatowy 1
140	Gdynia Chylonia, ul. Tczewska	ogródek kwiatowy 2
141	Gdynia Chylonia, ul. Chylońska	piasek przy bloku osiedlowym
142	Góra Pomorska	ogród warzywny
143	Góra Pomorska	podwórko
144	Orle	ogród
145	Orle	podwórko
146	Gdynia Redłowo, przy Al. Zwycięstwa	ogródki działkowe
147	Gdynia Redłowo, przy Al. Zwycięstwa	ogródki działkowe
148	Wejherowo	ogródki działkowe

149	Wejherowo	ogródki działkowe
150	Wejherowo, ul. Harcerska	piasek przy śmietniku osiedlowym
151	Wejherowo, ul. Chopina	piasek przy śmietniku osiedlowym

*5 różnych prób pobranych z tego samego miejsca (ta sama hałda piasku gospodarczego)

Załącznik 3.

Tabela 40. Zestawienie zebranych prób warzyw i owoców.

numer matrycy	miejsce pochodzenia próby	rodzaj próby	miejsce zakupu lub zebrania materiału
1	Gdańsk Wrzeszcz	sałata	rynek
2	Gdańsk Wrzeszcz	sałata	rynek
3	Gdańsk Chełm, ul. Cieszyńskiego	sałata	ogródek
4	Gdańsk Chełm, ul. Cieszyńskiego	sałata	ogródek
5	Gdańsk Wrzeszcz	rzodkiewka	rynek
6	Gdańsk Wrzeszcz	rzodkiewka	rynek
7	Gdańsk Chełm, ul. Witosa	rzodkiewka	ogródek
8	Gdańsk Chełm ul. Witosa	rzodkiewka	ogródek
9	Gdańsk Wrzeszcz	marchew	rynek
10	Gdańsk Wrzeszcz	marchew	rynek
11	Gdańsk Wrzeszcz	truskawki	rynek
12	Gdańsk Wrzeszcz	truskawki	rynek
13	Gdańsk Chełm, ul. Witosa	truskawki	sklep
14	Gdańsk Wrzeszcz	truskawki	rynek
15	Gdańsk Główny	truskawki	hala targowa
16	Gdańsk Główny	truskawki	hala targowa
17	Gdańsk Wrzeszcz, ul. Mickiewicza	truskawki	sklep spożywczy
18	Gdańsk Główny	rzodkiewka	hala targowa
19	Gdańsk Główny	rzodkiewka	hala targowa
20	Gdańsk Wrzeszcz, ul. Mickiewicza	rzodkiewka	sklep spożywczy
21	Gdańsk Wrzeszcz, ul. Wajdeloty	rzodkiewka	sklep spożywczy
22	Gdańsk Główny	sałata	hala targowa
23	Gdańsk Główny	sałata	hala targowa
24	Gdańsk Wrzeszcz, ul. Wajdeloty	sałata	sklep spożywczy
25	Gdańsk Wrzeszcz, ul. Wajdeloty	sałata	sklep spożywczy
26	Sopot, ul. Władysława Łokietka	truskawki	sklep spożywczy
27	Sopot, ul. Władysława Łokietka	truskawki	sklep spożywczy
28	Gdańsk Wrzeszcz, ul. Dmowskiego	truskawki	sklep
29	Gdańsk Wrzeszcz, ul. Dmowskiego	truskawki	sklep
30	Gdańsk Wrzeszcz	truskawki	rynek
31	Gdańsk Wrzeszcz	truskawki	rynek
32	Gdańsk Wrzeszcz	rzodkiewka	rynek
33	Gdańsk Wrzeszcz	rzodkiewka	rynek
34	Gdańsk Wrzeszcz	rzodkiewka	rynek
35	Gdańsk Wrzeszcz	rzodkiewka	rynek
36	Sopot, ul. 3 maja	truskawki	sklep

37	Sopot, ul. 3 maja	truskawki	sklep
38	Gdańsk Wrzeszcz, ul. Waryńskiego	truskawki	sklep
39	Gdańsk Wrzeszcz, ul. Waryńskiego	truskawki	sklep
40	Gdańsk Chełm, ul. Witosa	truskawki	sklep
41	Gdańsk Chełm, ul. Witosa	truskawki	sklep
42	Sopot, ul. 3 maja	rzodkiewki	sklep
43	Sopot, ul. 3 maja	rzodkiewka	sklep
44	Gdańsk, Wrzeszcz ul. Waryńskiego	rzodkiewka	sklep
45	Gdańsk, Wrzeszcz ul. Waryńskiego	rzodkiewka	sklep
46	Sopot, ul. 3 maja	sałata	sklep
47	Gdańsk Wrzeszcz, ul. Waryńskiego	sałata	sklep
48	Gdańsk Wrzeszcz, ul. Dragana	truskawki	sklep
49	Gdańsk Wrzeszcz, ul. Dragana	truskawki	sklep
50	Sopot, ul. Kościuszki	truskawki	sklep
51	Gdynia Redłowo, ul. Legionów	truskawki	sklep
52	Gdynia Redłowo, ul. Legionów	truskawki	sklep
53	Gdańsk Wrzeszcz, ul. Grunwaldzka	truskawki	sklep
54	Gdańsk Wrzeszcz, ul. Grunwaldzka	truskawki	sklep
55	Gdynia Redłowo, ul. Legionów	rzodkiewka	sklep
56	Gdańsk, Wrzeszcz ul. Grunwaldzka	rzodkiewka	sklep
57	Gdańsk, Wrzeszcz ul. Grunwaldzka	rzodkiewka	sklep
58	Gdynia Redłowo, ul. Legionów	sałata	sklep
59	Gdańsk, Wrzeszcz ul. Grunwaldzka	sałata	sklep
60	Gdańsk Wrzeszcz, ul. Grunwaldzka	sałata	sklep
61	Gdynia Redłowo, ul. Lotników	rzodkiewka	sklep
62	Gdynia Redłowo, ul. Lotników	rzodkiewka	sklep
63	Gdynia Redłowo, ul. Lotników	rzodkiewka	sklep
64	Gdynia Redłowo, ul. Lotników	sałata	sklep
65	Gdynia Główna, ul. Świętojańska	truskawki	sklep
66	Gdynia Główna, ul. Świętojańska	truskawki	sklep
67	Gdynia Główna, ul. Świętojańska	truskawki	sklep
68	Gdańsk Wrzeszcz, ul. Wyspiańskiego	truskawki	sklep
69	Gdańsk Wrzeszcz, ul. Wyspiańskiego	truskawki	sklep
70	Gdańsk Wrzeszcz, ul. Wyspiańskiego	truskawki	sklep
71	Gdańsk Wrzeszcz, ul. Wyspiańskiego	marchew	sklep
72	Gdańsk Wrzeszcz, ul. Wyspiańskiego	marchew	sklep
73	Gdynia Główna, ul. Świętojańska	sałata	sklep
74	Gdynia Główna, ul. Świętojańska	sałata	sklep
75	Gdańsk Wrzeszcz	rzodkiewka	rynek
76	Gdańsk Wrzeszcz	rzodkiewka	rynek
77	Gdańsk Wrzeszcz	rzodkiewka	rynek
78	Gdańsk Wrzeszcz	rzodkiewka	rynek
79	Gdynia Orłowo, ul. Wrocławska	rzodkiewka	sklep
80	Gdynia Orłowo, ul. Wrocławska	sałata	sklep
81	Gdynia Orłowo, ul. Wrocławska	truskawka	sklep
82	Gdynia Orłowo, ul. Wrocławska	truskawka	sklep

83	Gdynia Orłowo, ul. Źródłana	truskawka	sklep
84	Gdynia Orłowo, ul. Źródłana	truskawka	sklep
85	Gdynia Orłowo, ul. Źródłana	rzodkiewka	sklep
86	Gdynia Orłowo, ul. Źródłana	rzodkiewka	sklep
87	Gdynia Mały Kack, ul. Płocka	truskawka	sklep
88	Gdynia Mały Kack, ul. Płocka	rzodkiewka	sklep
89	Gdynia Mały Kack, ul. Płocka	rzodkiewka	sklep
90	Gdynia Mały Kack, ul. Płocka	marchew	sklep
91	Gdańsk Wrzeszcz	truskawka	rynek
92	Gdańsk Wrzeszcz	truskawka	rynek
93	Gdańsk Wrzeszcz	rzodkiewka	rynek
94	Gdańsk Wrzeszcz	rzodkiewka	rynek
95	Gdańsk Wrzeszcz	marchew	rynek
96	Gdańsk Wrzeszcz	marchew	rynek
97	Gdynia Główna, ul. Świętojańska	truskawka	sklep
98	Gdynia Główna, ul. Świętojańska	truskawka	sklep
99	Gdynia Główna, ul. Świętojańska	rzodkiewka	sklep
100	Gdynia Główna, ul. Świętojańska	rzodkiewka	sklep
101	Gdynia Główna, ul. Świętojańska	sałata	sklep
102	Gdynia Główna, ul. Świętojańska	sałata	sklep
103	Gdynia Główna, ul. Dworcowa	truskawka	sklep
104	Gdynia Główna, ul. Dworcowa	truskawka	sklep
105	Gdynia Główna, ul. Dworcowa	rzodkiewka	sklep
106	Gdynia Główna, ul. Dworcowa	rzodkiewka	sklep
107	Gdynia Główna, ul. Dworcowa	marchew	sklep
108	Gdynia Główna, ul. Dworcowa	marchew	sklep
109	Sopot, ul. Kościuszki	truskawka	sklep
110	Sopot, ul. Kościuszki	truskawka	sklep
111	Sopot, ul. Kościuszki	sałata	sklep
112	Sopot, ul. Kościuszki	sałata	sklep
113	Sopot, ul. Kościuszki	marchew	sklep
114	Sopot, ul. Kościuszki	marchew	sklep
115	Sopot, ul. Sobieskiego	rzodkiewka	sklep
116	Sopot, ul. Sobieskiego	rzodkiewka	sklep
117	Sopot, ul. Sobieskiego	sałata	sklep
118	Sopot, ul. Sobieskiego	sałata	sklep
119	Sopot, ul. Sobieskiego	marchew	sklep
120	Sopot, ul. Sobieskiego	marchew	sklep
121	Sopot, ul. Chopina	truskawka	sklep
122	Sopot, ul. Chopina	truskawka	sklep
123	Sopot, ul. Chopina	rzodkiewka	sklep
124	Sopot, ul. Chopina	rzodkiewka	sklep
125	Sopot ul. Grunwaldzka	truskawka	sklep
126	Sopot, ul. Grunwaldzka	truskawka	sklep
127	Sopot, ul. Grunwaldzka	rzodkiewka	sklep
128	Sopot, ul. Grunwaldzka	rzodkiewka	sklep

129	Gdańsk Główny, ul. 3 maja	sałata	bazar
130	Gdańsk Główny, ul. 3 maja	sałata	bazar
131	Gdańsk Główny, ul. 3 maja	rzodkiewka	bazar
132	Gdańsk Główny, ul. 3 maja	rzodkiewka	bazar
133	Gdańsk Główny, ul. 3 maja	marchew	bazar
134	Gdańsk Główny, ul. 3 maja	marchew	bazar
135	Sopot Al. Niepodległości	truskawki	sklep
136	Sopot, Al. Niepodległości	truskawki	sklep
137	Sopot, Al. Niepodległości	rzodkiewka	sklep
138	Sopot, Al. Niepodległości	sałata	sklep
139	Gdynia Główna, ul. Dworcowa	rzodkiewka	sklep
140	Gdynia Główna, ul. Dworcowa	rzodkiewka	sklep
141	Gdynia Główna, ul. Dworcowa	marchew	sklep
142	Gdynia Główna ul. Dworcowa	marchew	sklep
143	Gdynia Główna, ul. Dworcowa	sałata	sklep
144	Gdańsk Stogi, ul. Stryjewskiego	rzodkiewka	ryniecdek
145	Gdańsk Stogi, ul. Stryjewskiego	sałata	ryniecdek
146	Gdańsk Stogi, ul. Stryjewskiego	marchew	ryniecdek
147	Sopot, ul. 3 maja	rzodkiewka	sklep
148	Sopot, ul. 3 maja	sałata	sklep
149	Sopot, ul. 3 maja	marchew	sklep
150	Sopot, ul. 3 maja	rzodkiewka	sklep
151	Sopot, ul. 3 maja	sałata	sklep
152	Sopot, ul. 3 maja	sałata	sklep
153	Sopot, ul. 3 maja	marchew	sklep
154	Sopot, ul. 3 maja	marchew	sklep
155	Gdynia Główna, ul. Wójta Radkego	rzodkiewka	hala targowa
156	Gdynia Główna, ul. Wójta Radkego	sałata	hala targowa
157	Gdynia Główna, ul. Wójta Radkego	sałata	hala targowa
158	Gdynia Główna, ul. Wójta Radkego	marchew	hala targowa
159	Gdynia Główna, ul. Wójta Radkego	marchew	hala targowa
160	Gdynia Główna, ul. Śląska	rzodkiewka	sklep
161	Gdynia Główna, ul. Śląska	rzodkiewka	sklep
162	Gdynia Główna, ul. Śląska	sałata	sklep
163	Gdynia Główna, ul. Śląska	sałata	sklep
164	Gdynia Główna, ul. Śląska	marchew	sklep
165	Gdynia Główna, ul. Śląska	marchew	sklep
166	Gdynia Orłowo, Plac Górnośląski	rzodkiewka	bazar
167	Gdynia Orłowo, Plac Górnośląski	rzodkiewka	bazar
168	Gdynia Orłowo, Plac Górnośląski	sałata	bazar
169	Gdynia Orłowo, Plac Górnośląski	sałata	bazar
170	Gdynia Orłowo, Plac Górnośląski	marchew	bazar
171	Gdynia Orłowo, Plac Górnośląski	marchew	bazar
172	Rumia, ul. Oksywska	sałata	ogródek
173	Rumia, ul. Oksywska	sałata	ogródek
174	Rumia, ul. Oksywska	sałata	ogródek

175	Gdynia Redłowo	truskawki	targowisko
176	Gdynia Redłowo	truskawki	targowisko
177	Gdynia Redłowo	truskawki	targowisko
178	Wejherowo	truskawki	sprzedaż przy ulicy
179	Wejherowo, ul. Nanicka	truskawki	sprzedaż przy ulicy
180	Wejherowo, ul. Nanicka	truskawki	sprzedaż przy ulicy
181	Wejherowo	truskawki	targowisko
182	Wejherowo	truskawki	targowisko
183	Wejherowo	truskawki	targowisko
184	Tadzino	marchew	gospodarstwo
185	Kostkowo	marchew	gospodarstwo 1
186	Kostkowo	sałata	gospodarstwo 1
187	Kostkowo	marchew	gospodarstwo 2
188	Kostkowo	sałata	gospodarstwo 2
189	Kostkowo	marchew	gospodarstwo 3
190	Kostkowo	marchew	gospodarstwo 3
191	Chynów	marchew	gospodarstwo
192	Chynów	sałata	gospodarstwo
193	Rybno	sałata	gospodarstwo
194	Rybno	rzodkiewka	gospodarstwo
195	Elbląg	rzodkiewka	ogródek działkowy1
196	Elbląg	sałata	ogródek działkowy2
197	Elbląg	marchew	ogródek działkowy1
198	Elbląg	sałata	ogródek działkowy1
199	Gronowo Elbląskie	marchew	gospodarstwo1
200	Gronowo Elbląskie	rzodkiewka	gospodarstwo1
201	Gronowo Elbląskie	sałata	gospodarstwo1
202	Gronowo Elbląskie	marchew	gospodarstwo2
203	Gronowo Elbląskie	sałata	gospodarstwo2
204	Gronowo Elbląskie	marchew	gospodarstwo2
205	Oleśno	marchew	gospodarstwo
206	Oleśno	rzodkiewka	gospodarstwo
207	Oleśno	sałata	gospodarstwo
208	Oleśno	marchew	gospodarstwo
209	Kostkowo	marchew	gospodarstwo
210	Dębki	marchew	ogród warzywny
211	Dębki	sałata	ogród warzywny
212	Dębki	marchew	ogród warzywny
213	Dębki	marchew	ogród warzywny
214	Orle	marchew	działka
215	Gdynia Redłowo	marchew	ogródek działkowy
216	Gdynia Redłowo	marchew	ogródek działkowy

Załącznik 4

Tabela 41. Zestawienie zebranych prób powietrza.

numer matrycy	miejsce pobrania	opis miejsca pobrania próby
1	Gdynia Redłowo, ul. Powstania Styczniowego	w pobliżu hałdy piachu gospodarczego
2	Wejherowo, ul. Ofiar Piaśnicy	podwórko
3	Wejherowo, osiedle Chopina	w pobliżu śmietników osiedlowych
4	Gdańsk, Śródmieście, ul. Podwałe Staromiejskie	w pobliżu śmietników
5	Gdańsk Zaspa, ul. Dywizjonu 303	przy ogródkach podbalkonowych (blok)
6	Gdynia Chylonia, ul. Chyłońska	w pobliżu śmietników osiedlowych
7	Gdańsk Siedlce, ul. Sałęcka	w pobliżu piaskownicy
8	Gdańsk Przymorze, ul. Sztormowa	w pobliżu śmietników
9	Gdańsk Brzeźno, ul. Broniewskiego	w pobliżu śmietników
10	Gdańsk Chełm, ul. Witosa	w pobliżu śmietników
11	Gdynia Redłowo, ul. Makuszyńskiego	w pobliżu śmietników
12	Gdynia Dąbrowa, ul. Waniliowa	przy ogródkach podbalkonowych (blok)
13	Gdynia Karwiny, ul. Tuwima	w pobliżu śmietników
14	Sopot, ul. Mickiewicza	w pobliżu śmietników
15	Gdynia Chylonia, ul. Morska	w pobliżu śmietników
16	Sopot, ul. Żeromskiego	w pobliżu piaskownicy
17	Sopot, ul. Abrahama	w pobliżu piaskownicy
18	Gdańsk Oliwa, ul. Kaprów	w pobliżu śmietników
19	Gdańsk Brzeźno, ul. Herbowa	w pobliżu piaskownicy
20	Gdańsk Przymorze, ul. Szyprów	w pobliżu piaskownicy

Załącznik 5

Tabela 42. Zestawienie zebranych prób wody.

numer matrycy	miejsce pobrania	rodzaj próby
1	Oleśno (okolice Elbląga)	studnia
2	Oleśno (okolice Elbląga)	studnia
3	Oleśno (okolice Elbląga)	studnia
4	Oleśno (okolice Elbląga)	studnia
5	Tczew	studnia
6	Elbląg	woda wodociągowa
7	Wejherowo	woda wodociągowa
8	Gdynia, ul. Wójta Radkego	woda wodociągowa
9	Gdynia Chylonia, ul. Morska	woda wodociągowa
10	Gdynia Redłowo, ul. Powstania Styczniowego	woda wodociągowa
11	Rumia, ul. Batorego	woda wodociągowa
12	Kopalino	woda wodociągowa
13	Kopalino	studnia głębinowa
14	Kopalino	studnia głębinowa
15	Kopalino	studnia głębinowa
16	Kopalino	studnia głębinowa
17	Kopalino	studnia głębinowa
18	Koleczkowo	Jezioro Marchowo, kąpielisko
19	Potęgowo	studnia głębinowa
20	Koleczkowo	studnia głębinowa
21	Okolice Wejherowa	Jezioro Wygoda, kąpielisko
22	Gdańsk, ogródki działkowe	studnia głębinowa
23	Bieszkowice	studnia głębinowa
24	Gdańsk, Niedźwiednik	woda wodociągowa
25	Gdańsk Wrzeszcz	woda wodociągowa
26	Bieszkowice	Jezioro Bieszkowice, kąpielisko
27	Krokowa	woda wodociągowa
28	Gdańsk Osowa	woda wodociągowa
29	Salino	Jezioro Salino, kąpielisko
30	Żakowo (koło Sulęczyzna)	studnia głębinowa
31	Reda	woda wodociągowa
32	Żarnowiec	Jezioro Żarnowieckie, kąpielisko
33	Choczewo	Jezioro Choczewskie, kąpielisko
34	Rumia	Rzeka Zagórzanka
35	Garczyn, Ośrodek Powiatowe Centrum Młodzieży	studnia głębinowa
36	Orle	Jezioro Orle
37	Kartuzy	Jezioro Klasztorne
38	Chmielno	Jezioro Białe
39	Raduń	Jezioro Raduńskie
40	Kościierzyna	woda wodociągowa
41	okolice Ręboszewa	Jezioro Brodno Małe

42	Gdańsk Brzeźno	woda wodociągowa
43	Sopot	woda wodociągowa
44	Reda	Rzeka Reda
45	Gdynia	Rzeka Kacza
46	Okolice Wejherowa	Jeziro Wyspowo
47	Okolice Elbląga	Kanał Elbląski
48	Fiszewo (okolice Elbląga)	Rzeka Fiszewka
49	Dębki	woda wodociągowa
50	Oleśno (okolice Elbląga)	woda wodociągowa

Załącznik 6

Tabela 43. Wyniki badań molekularnych dla prób ziemi: + wynik dodatni, - wynik ujemny.

lp	numer matrycy	miejsowość	miejsce pobrania próby	wynik PCR	wynik Real-time PCR
1	8	Gdynia, ul. Makuszyńskiego	piaskownica	+	+
2	10	Gdynia, ul. Powstania Styczniowego, IMMiT	piach gospodarczy	+	+
3	11	Gdańsk, Starówka	piaskownica	+	+
4	12	Gdańsk, Śródmieście, teren Pałacu młodzieży	piaskownica	+	+
5	13	Gdańsk, Śródmieście, przedszkole	piaskownica	+	+
6	14	Gdańsk, Śródmieście, ul. Rzeźnicka	piaskownica	+	+
7	15	Gdańsk, Śródmieście, ul. Podwale Staromiejskie	piasek przy śmietniku	+	+
8	23	Sopot, ul. 23 Marca	piaskownica (plac zabaw)	+	+
9	27	Gdynia, ul. Powstania Styczniowego, IMMiT	piach gospodarczy	+	+
10	31	Gdańsk, Siedlce, ul. Sałdecka	piaskownica	+	+
11	32	Gdańsk, Siedlce, Roweckiego	piasek przy śmietniku	-	+
12	33	Gdańsk, Chełm ul. Cieszyńskiego	piaskownica	-	+
13	41	Gdynia, ul. Powstania Styczniowego, IMMiT	piasek gospodarczy	+	+
14	42	Gdynia, ul. Porazińskiej	piaskownica	-	+
15	43	Gdynia, ul. Hutnicza	piaskownica	-	+

16	46	Gdynia, ul. Sezamowa	piaskownica	-	+
17	47	Gdynia, ul. Tuwima	piaskownica	-	+
18	51	Sopot, ul. Tuwima	piaskownica	+	+
19	52	Sopot, ul. Mickiewicza	piasek przy śmietniku	+	+
20	53	Sopot, ul. Prusa	piaskownica	+	+
21	64	Gdańsk Zaspa, ul. Dywizjonu 303	piach przy bloku osiedlowym	-	+
22	74	Gdańsk Przymorze, ul. Sztormowa	piaskownica	+	+
23	76	Gdańsk Przymorze, ul. Gospody	piaskownica	+	+
24	77	Gdańsk Przymorze, ul. Szyprów	piaskownica	+	+
25	79	Gdańsk Przymorze, ul. Gdyńska	piaskownica	+	+
26	83	Sopot, ul. Żeromskiego	piaskownica	-	+
27	87	Gdańsk Chełm, ul. Więckowskiego	piaskownica	-	+
28	115	Rybno (gospodarstwo1)	podwórko	-	+
29	126	Gdynia, Park Chyloński	piaskownica	+	+
30	134	Gdańsk Brzeźno, ul. Korzeniowskiego	piaskownica	+	+
31	137	Wejherowo, ul. Harcerska	piasek przy bloku osiedlowym	-	+
32	138	Wejherowo, ul. Chopina	piasek przy bloku osiedlowym	-	+
33	140	Gdynia Chylonia, ul. Tczewska	ogródek kwiatowy	+	+
34	141	Gdynia Chylonia, ul. Chylońska	piasek przy bloku osiedlowym	+	+
35	151	Wejherowo, ul. Chopina	piasek przy śmietniku	+	+

Załącznik 7

Tabela 44. Wyniki genotypowania (RFLP) dodatnich prób środowiskowych ziemi: I - genotyp SAG2I, II - genotyp SAG2II, NU genotyp nieustalony, + pozytywny wynik amplifikacji, - negatywny wynik amplifikacji. Oznaczenia: p – piaskownica, b – piasek pod balkonem osiedlowym, ś – piasek wokół śmietnika osiedlowego, og – ziemia ogrodowa, pg – piach gospodarczy.

lp	Nr matry-cy	miejsowość	miejsce pobrania próby	wynik PCR B1	wynik Real-time PCR B1	wynik PCR SAG2		genotyp
						koniec 3'	koniec 5'	
1	8	Gdynia, ul. Makuszyńskiego	p	+	+	+	+	I
2	10	Gdynia, ul. Powstania Styczniowego, IMMiT	pg	+	+	+	+	I
3	11	Gdańsk, Starówka	p	+	+	+	-	NU
4	12	Gdańsk, Śródmieście, teren Pałacu młodzieży	p	+	+	-	-	NU
5	13	Gdańsk, Śródmieście, przedszkole	p	+	+	+	+	I
6	14	Gdańsk, Śródmieście, ul. Rzeźnicka	p	+	+	+	+	I
7	15	Gdańsk, Śródmieście, ul. Podwale Staromiejskie	ś	+	+	-	-	NU
8	23	Sopot, ul. 23 Marca	p	+	+	-	-	NU
9	27	Gdynia, ul. Powstania Styczniowego, IMMiT	pg	+	+	+	+	II
10	31	Gdańsk, Siedlce, ul. Sałdecka	p	+	+	+	+	II
11	32	Gdańsk, Siedlce, Roweckiego	ś	-	+	-	-	NU
12	33	Gdańsk, Chełm ul. Cieszyńskiego	p		+	-	-	NU
13	41	Gdynia, ul. Powstania Styczniowego, IMMiT	pg	+	+	+	-	NU
14	42	Gdynia, ul. Porazińskiej	p	-	+	-	-	NU
15	43	Gdynia, ul. Hutnicza	p	-	+	-	-	NU
16	46	Gdynia, ul. Sezamowa	p	-	+	-	-	NU
17	47	Gdynia, ul. Tuwima	p	-	+	-	-	NU
18	51	Sopot, ul. Tuwima	p	+	+	-	-	NU
19	52	Sopot, ul. Mickiewicza	ś	+	+	+	-	NU
20	53	Sopot, ul. Prusa	p	+	+	+	+	I
21	64	Gdańsk Zaspą, ul. Dywizjonu 303	b	-	+	-	-	NU
22	74	Gdańsk Przymorze, ul. Sztormowa	p	+	+	+	-	NU
23	76	Gdańsk Przymorze, ul.	p	+	+	+	-	NU

		Gospody						
24	77	Gdańsk Przymorze, ul. Szyprów	p	+	+	-	-	NU
25	79	Gdańsk Przymorze, ul. Gdyńska	p	+	+	-	-	NU
26	83	Sopot, ul. Żeromskiego	p	-	+	-	-	NU
27	87	Gdańsk Chełm, ul. Więckowskiego	p	-	+	-	-	NU
28	115	Rybno (gospodarstwo1)	og	-	+	-	-	NU
29	126	Gdynia, Park Chyloński	p	+	+	-	+	NU
30	134	Gdańsk Brzeźno, ul. Korzeniowskiego	p	+	+	-	-	NU
31	137	Wejherowo, ul. Harcerska	b	-	+	-	-	NU
32	138	Wejherowo, ul. Chopina	b	-	+	-	-	NU
33	140	Gdynia Chylonia, ul. Tczewska	og	+	+	-	+	NU
34	141	Gdynia Chylonia, ul. Chylońska	b	+	+	+	+	II
35	151	Wejherowo, ul. Chopina	ś	+	+	+	+	I

Załącznik 8

Tabela 45. Ładunek patogeny obliczony dla dodatnich prób środowiskowych ziemi. Oznaczenia: N – Liczba kopii DNA wyznaczona w Real-time QPCR, ŁP – ładunek patogeny próby, p – piaskownica, b – piasek przy bloku osiedlowym, ś – piasek przy smietniku osiedlowym, og – ziemia ogrodowa, pg – piach gospodarczy.

lp	nr matrycy	miejsowość	miejsca pobrania próby	N	ŁP
1	8	Gdynia, ul. Makuszyńskiego	p	3966	141,6
2	10	Gdynia, ul. Powstania Styczniowego, IMMiT	pg	5229	186,7
3	11	Gdańsk, Starówka	p	3567	127,4
4	12	Gdańsk, Śródmieście, teren Pałacu młodzieży	p	189,9	6,8
5	13	Gdańsk, Śródmieście, przedszkole	p	51,5	1,8
6	14	Gdańsk, Śródmieście, ul. Rzeźnicka	p	214,4	7,6
7	15	Gdańsk, Śródmieście, ul. Podwale Staromiejskie	ś	3851	137,5
8	23	Sopot, ul. 23 Marca	p	738	26,3
9	27	Gdynia, ul. Powstania Styczniowego, IMMiT	Pg	3389	121,0
10	31	Gdańsk, Siedlce, ul. Sałecka	p	47,2	1,7

11	32	Gdańsk, Siedlce, Roweckiego	ś	17,7	0,6
12	33	Gdańsk, Chełm ul. Cieszyńskiego	P	18,7	0,7
13	41	Gdynia, ul. Powstania Styczniowego, IMMiT	Pg	4322	154,3
14	42	Gdynia, ul. Porazińskiej	p	31,3	1,1
15	43	Gdynia, ul. Hutnicza	p	31,8	1,1
16	46	Gdynia, ul. Sezamowa	p	31,9	1,1
17	47	Gdynia, ul. Tuwima	p	27,6	1,0
18	51	Sopot, ul. Tuwima	p	137,5	4,9
19	52	Sopot, ul. Mickiewicza	ś	318,9	11,4
20	53	Sopot, ul. Prusa	p	148,5	5,3
21	64	Gdańsk Zaspą, ul. Dywizjonu 303	b	42	1,5
22	74	Gdańsk Przymorze, ul. Sztormowa	p	44,2	1,6
23	76	Gdańsk Przymorze, ul. Gospody	p	47910	1711,1
24	77	Gdańsk Przymorze, ul. Szyprów	p	623,1	22,2
25	79	Gdańsk Przymorze, ul. Gdyńska	p	875	31,2
26	83	Sopot, ul. Żeromskiego	p	48,3	1,7
27	87	Gdańsk Chełm, ul. Więckowskiego	p	18,4	0,6
28	115	Rybno (gospodarstwo1)	og	32,5	1,2
29	126	Gdynia, Park Chyłoński	p	2520	90
30	134	Gdańsk Brzeźno, ul. Korzeniowskiego	p	3092	110,4
31	137	Wejherowo, ul. Harcerska	B	86,3	3,1
32	138	Wejherowo, ul. Chopina	B	46,7	1,7
33	140	Gdynia Chylonia, ul. Tczewska	Og	5138	183,5
34	141	Gdynia Chylonia, ul. Chyłońska	B	3851	137,5
35	151	Wejherowo, ul. Chopina	ś	3886	138,8

Załącznik 9

Tabela 46. Wyniki badań molekularnych dla prób warzyw i owoców: + wynik dodatni, - wynik ujemny.

lp	numer matrycy	miejsce pobrania próby	rodzaj próby	wynik PCR	wynik Real-time PCR
Warzywa/owoce ze sklepów					
1	9	Gdańsk Wrzeszcz (rynek)	marchew	+	+
2	19	Gdańsk Główny (hala targowa)	rzodkiewka	+	+
3	79	Gdynia ul. Wrocławska	rzodkiewka	+	+
4	95	Gdańsk – Wrzeszcz (rynek)	marchew	+	+
5	133	Gdańsk Główny (bazar)ul.3 maja	marchew	+	+
6	134	Gdańsk Główny (bazar)ul.3 maja	marchew	+	+

7	144	Gdańsk Stogi ul. Stryjewskiego (rynieczonek)	rzodkiewka	+	+
8	147	Sopot ul. 3 maja	sałata	-	+
9	151	Sopot ul. 3 maja	rzodkiewka	-	+
10	139	Gdynia Główna ul. Dworcowa	sałata	-	+
11	137	Sopot Al. Niepodległości	rzodkiewka	-	+
12	138	Sopot Al. Niepodległości	sałata	-	+
13	143	Gdynia Główna ul. Dworcowa	rzodkiewka	-	+
14	132	Gdańsk Główny (bazar)ul. 3 maja	rzodkiewka	-	+
Warzywa/owoce z działek/ogrodów					
15	185	Kostkowo, gospodarstwo 1	sałata	+	+
16	187	Kostkowo, gospodarstwo 2	marchew	+	+
17	205	Oleśno, gospodarstwo	marchew	+	+
18	208	Oleśno, gospodarstwo	marchew	+	+
19	191	Chynów, gospodarstwo	marchew	-	+
20	192	Chynów, gospodarstwo	sałata	-	+
21	182	Kostkowo, gospodarstwo 1	marchew	-	+

Załącznik 10

Tabela 47. Wyniki genotypowania badanych prób środowiskowych warzyw. I - genotyp SAG2I, II - genotyp SAG2II, NU genotyp nieustalony, + pozytywny wynik amplifikacji, - negatywny wynik amplifikacji.

lp	nr matrycy	miejsce pobrania próby	rodzaj próby	wynik PCR B1	wynik Real-time PCR	wynik PCR SAG2		genotyp
						koniec 3'	koniec 5'	
1	9	Gdańsk Wrzeszcz (rynek)	marchew	+	+	+	+	II
2	19	Gdańsk Główny (hala targowa)	rzodkiewka	+	+	+	+	I
3	79	Gdynia ul. Wrocławska	rzodkiewka	+	+	+	+	I
4	95	Gdańsk – Wrzeszcz (rynek)	marchew	+	+	+	+	I
5	133	Gdańsk Główny (bazar)ul. 3 maja	marchew	+	+	-	+	NU
6	134	Gdańsk Główny (bazar)ul. 3 maja	marchew	+	+	+	+	I
7	144	Gdańsk Stogi ul. Stryjewskiego (rynieczonek)	rzodkiewka	+	+	+	+	II
8	147	Sopot ul. 3 maja	sałata	-	+	-	-	NU

9	151	Sopot ul. 3 maja	rzodkiewka	-	+	-	-	NU
10	139	Gdynia Główna ul. Dworcowa	sałata	-	+	-	-	NU
11	137	Sopot Al. Niepodległości	rzodkiewka	-	+	-	-	NU
12	138	Sopot Al. Niepodległości	sałata	-	+	-	-	NU
13	143	Gdynia Główna ul. Dworcowa	rzodkiewka	-	+	-	-	NU
14	132	Gdańsk Główny (bazar)ul. 3 maja	rzodkiewka	-	+	-	-	NU
15	185	Kostkowo, gospodarstwo 1	sałata	+	+	+	+	I
16	187	Kostkowo, gospodarstwo 2	marchew	+	+	+	+	I
17	205	Oleśno, gospodarstwo (CH)	marchew	+	+	+	-	NU
18	208	Oleśno, gospodarstwo (CH)	marchew	+	+	+	-	NU
19	191	Chynów, gospodarstwo	marchew	-	+	-	-	NU
20	192	Chynów, gospodarstwo	sałata	-	+	-	-	NU
21	182	Kostkowo, gospodarstwo 1	marchew	-	+	-	-	NU

Załącznik 11

Tabela 48. Wyliczony ładunek patogeny prób środowiskowych warzyw. Oznaczenia: N – liczba kopii DNA wyznaczona w Real-time QPCR, ŁP – ładunek patogeny próby

lp	nr matrycy	miejsowość	rodzaj próby	N	ŁP
1	9	Gdańsk Wrzeszcz (rynek)	marchew	98,3	3,5
2	19	Gdańsk Główny (hala targowa)	rzodkiewka	121	4,3
3	79	Gdynia ul. Wrocławska	rzodkiewka	123,4	4,4
4	95	Gdańsk – Wrzeszcz (rynek)	marchew	141,3	5,0
5	133	Gdańsk Główny (bazar)ul. 3 maja	marchew	224,4	8,0
6	134	Gdańsk Główny (bazar)ul. 3 maja	marchew	158,0	5,6
7	144	Gdańsk Stogi ul. Stryjewskiego (ryneček)	rzodkiewka	76,4	2,7
8	147	Sopot ul. 3 maja	sałata	30,8	1,1
9	151	Sopot ul. 3 maja	rzodkiewka	35,5	1,3
10	139	Gdynia Główna ul. Dworcowa	sałata	49,4	1,8
11	137	Sopot Al. Niepodległości	rzodkiewka	58,7	2,1
12	138	Sopot Al. Niepodległości	sałata	59,4	2,1
13	143	Gdynia Główna ul.	rzodkiewka	48,2	1,7

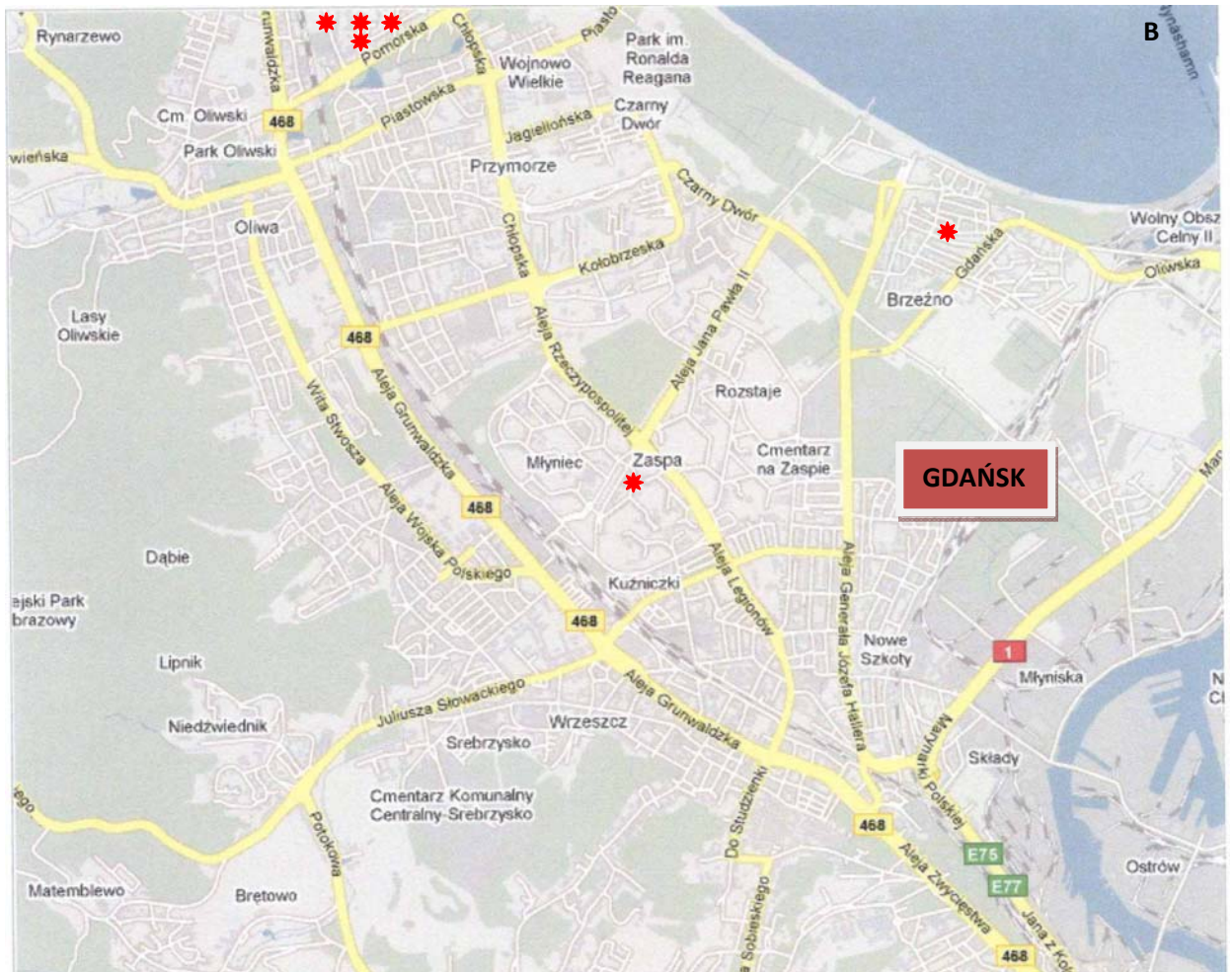
		Dworcowa			
14	132	Gdańsk Główny (bazar)ul. 3 maja	rzodkiewka	27,8	1,0
15	185	Kostkowo, gospodarstwo 1	sałata	138,5	4,9
16	187	Kostkowo, gospodarstwo 2	marchew	552,2	19,7
17	205	Oleśno, gospodarstwo (CH)	marchew	58,7	2,1
18	208	Oleśno, gospodarstwo (CH)	marchew	112,1	4,0
19	191	Chynów, gospodarstwo	marchew	40,3	1,4
20	192	Chynów, gospodarstwo	sałata	30,8	1,1
21	182	Kostkowo, gospodarstwo 1	marchew	50,8	1,8

Załącznik 12.

Poniżej, na mapach zaznaczono miejsca, w których zanotowano dodatnie próby ziemi zebranej w poszczególnych dzielnicach Gdańska.



Rycina 55 A. Mapa dzielnic Gdańska, z których pobierano materiał do badania (w białych ramkach).



Rycina 55 B. Mapa Gdańska z zaznaczonymi miejscami (czerwone punkty), w których zanotowano dodatnie próby ziemi.

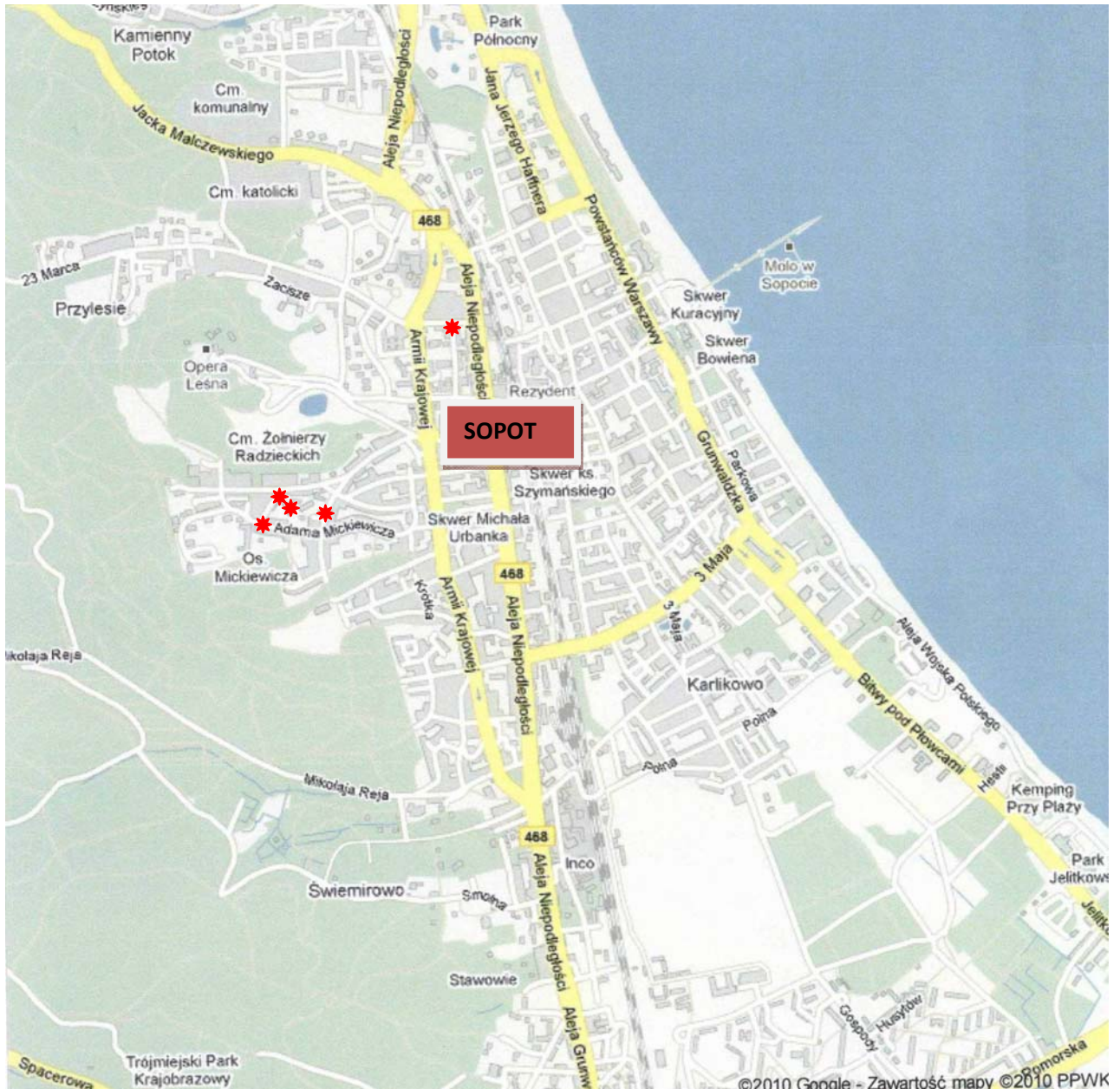


Rycina 55 C. Mapa Gdańska z zaznaczonymi miejscami (czerwone punkty), w których zanotowano dodatnie próby ziemi.

Rycina 55. A, B, C. Mapy przedstawiające badane rejony Gdańska, w których zanotowano *T. gondii* w próbach ziemi.

Załącznik 13.

Na mapie zaznaczono miejsca, w których zanotowano dodatnie próby ziemi zebranej w Sopocie.



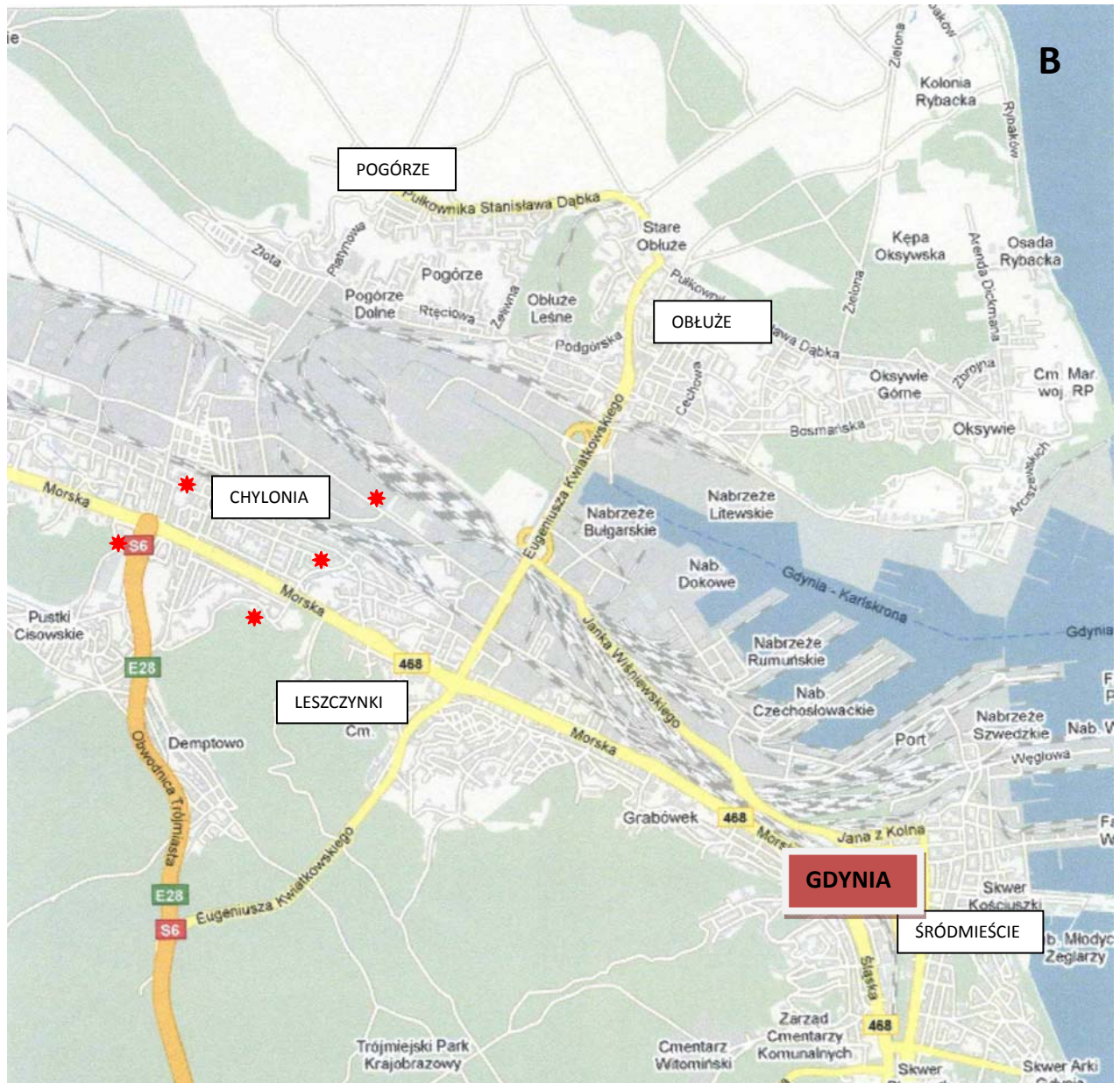
Rycina 56. Mapa ukazująca miejsca w Sopocie, w których zanotowano obecność *T. gondii* w próbach ziemi (oznaczone czerwonymi punktami).

Załącznik 14.

Ponizsze mapy ilustrują zanieczyszczenie ziemi w Gdyni pasożytem *T. gondii*.



Rycina 57 A. Mapa z zaznaczonymi dzielnicami Gdyni, w których pobierano materiał do badań (w białych ramkach) oraz zaznaczonymi miejscami, gdzie wykazano obecność *T. gondii* w ziemi (czerwone punkty).



Rycina 57 A. Mapa z zaznaczonymi dzielnicami Gdyni, w których pobierano materiał do badań (w białych ramkach) oraz zaznaczonymi miejscami, gdzie wykazano obecność *T. gondii* w ziemi (czerwone punkty).

Rycina 57 A, B. Mapy ilustrujące miejsca w Gdyni, w których zanotowano obecność *T. gondii* w próbach ziemi.

Załącznik 15

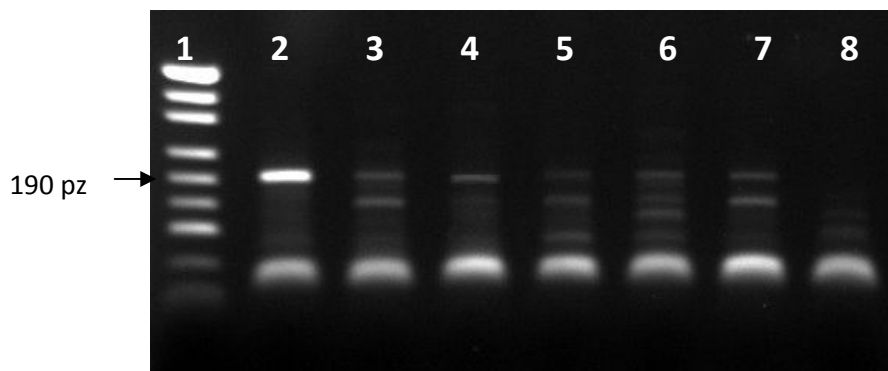
Ponizsza mapa ilustruje zanieczyszczenie ziemi w Wejherowie przez *T. gondii*.



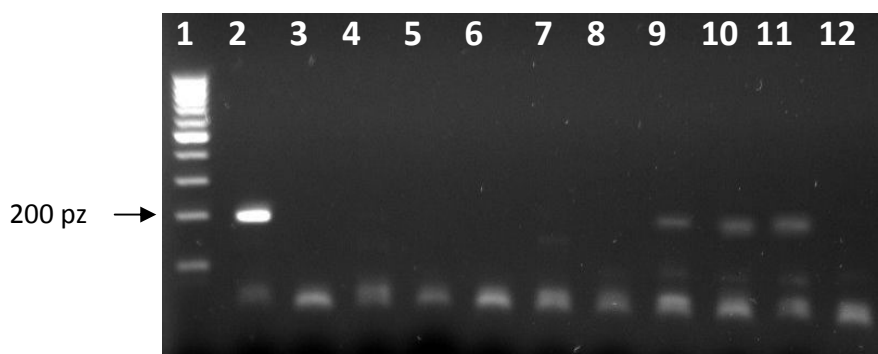
Rycina 58. Mapa ilustrująca miejsca w Wejherowie, gdzie wykryto *T. gondii* w próbach ziemi (czerwone punkty).

Załącznik 16.

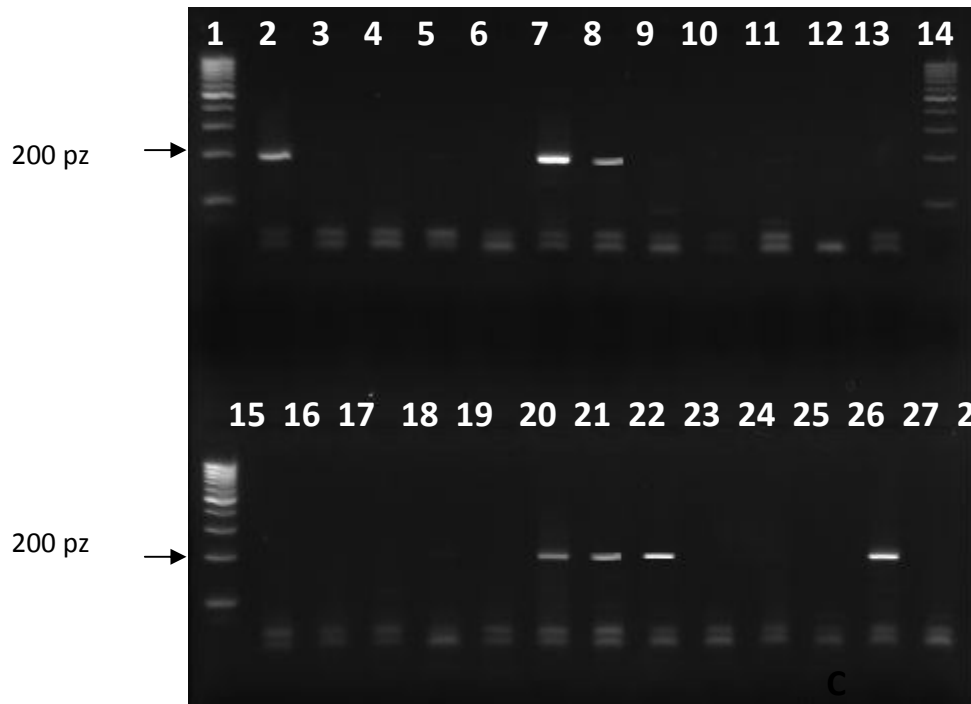
Na poniższych Rycinach przedstawiono wyniki PCR oraz Real-time PCR dla prób środowiskowych ziemi.



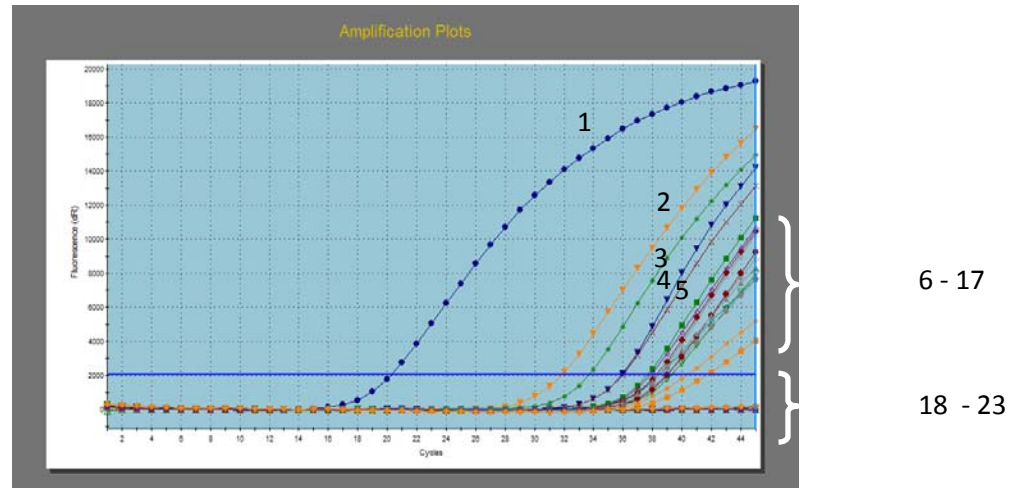
Rycina 59. Wynik PCR badanych prób ziemi. Ścieżki: 1 – marker wielkości, 2 – kontrola dodatnia *T. gondii*, 3 - Gdańsk, Starówka, piaskownica, 4 - Gdańsk, Śródmieście, teren Pałacu młodzieży, piaskownica, 5 - Gdańsk, Śródmieście, przedszkole, piaskownica, 6 - Gdańsk, Śródmieście, ul. Rzeźnicka, piaskownica, 7 - Gdańsk, Śródmieście, ul. Podwale, ziemia przy śmietniku, 8 – kontrola ujemna.



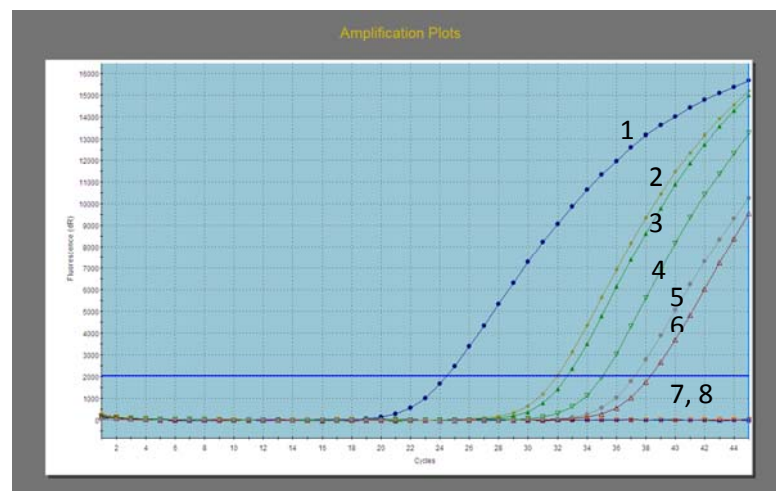
Rycina 70. Wynik PCR badanych prób ziemi. Ścieżki: 1 – marker wielkości, 2 – kontrola dodatnia *T. gondii*, 3 – Gdynia, ul. Lukrecjana, piaskownica 4 – Gdynia ul. Sezamowa, piaskownica, 5 – Gdynia, ul. Tuwima, piaskownica, 6 – Gdynia, ul. Paprykowa, ziemia przy śmietniku, 7 – Gdynia, ul. Sucharskiego, piaskownica, 8 - Sopot, ul. Żeromskiego, piaskownica, 9 - Sopot, ul. Tuwima, piaskownica, 10 - Sopot, ul. Mickiewicza, piaskownica, 11 - Sopot, ul. Prusa, piaskownica, 12 – kontrola ujemna.



Rycina 61. Wynik PCR badanych prób ziemi. Ścieżki: 1, 14, 15 – marker wielkości, 2 – kontrola dodatnia *T. gondii*, 3 – Gdynia ul. Dworcowa, piaskownica, 4 – Gdańsk Morena, ul. Warneńska, ziemia przy śmietniku, 5 – Gdańsk Siedlce, ul. Szara piaskownica, 6 – Gdańsk Siedlce, ul. Zakopiańska, piaskownica, 7 – Gdańsk Siedlce, ul. Sałecka, piaskownica, 8 - Gdańsk Przymorze, ul. Sztormowa, piaskownica, 9 – Gdańsk Przymorze, ul. Rybacka, piaskownica, 10 – Gdańsk Przymorze, ul. Gospody, piaskownica, 11 – Gdańsk Brzeźno, ul.E. Plater, piaskownica, 12 - Gdańsk Brzeźno, ul. Mazurska, piaskownica, 13 – Sopot, ul. 23 Marca, piaskownica, 15 – Sopot, ul. Chopina piaskownica, 16 – Gdańsk Chełm, ul. Cieszyńskiego, piaskownica, 17 – Gdańsk Chełm, ul. Drogowa, piaskownica, 18 – Gdańsk Chełm, ul. Witosa, piaskownica, 19 – Gdańsk Chełm, ul. Więckowskiego, piaskownica, 20 – Gdańsk Chełm, ul. Biegańskiego, piaskownica, 21 – Gdańsk Przymorze, ul. Gospody, piaskownica, 22 - Gdańsk Przymorze, ul. Szyprów, piaskownica, 23 – Gdańsk Przymorze, ul. Gdyńska, piaskownica, 24 – Gdańsk Chełm, ul. Warneńska, piaskownica, 25 – Sopot, ul. Parkowa, piaskownica, 26 – Sopot, ul. 3 Maja, piaskownica, 27 – Gdańsk Brzeźno, piaskownica, 28 - kontrola ujemna.



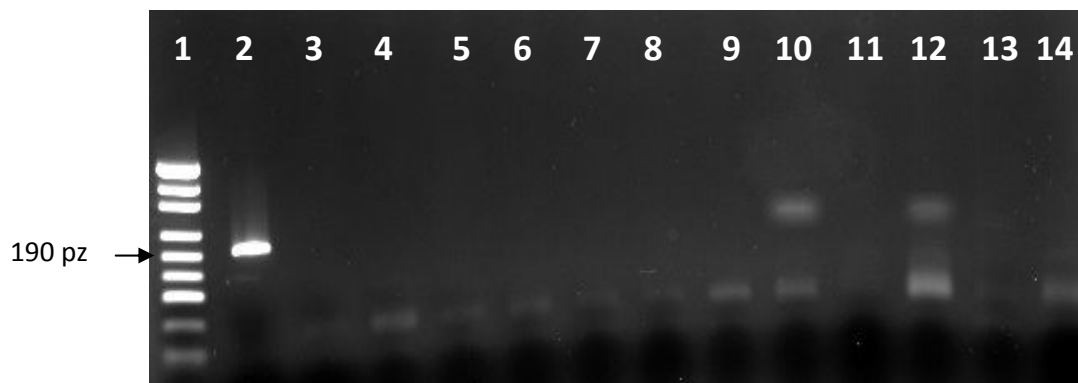
Rycina 62. Wynik Real-time PCR badanych prób ziemi. 1 - kontrola dodatnia *T. gondii*, 2 – Gdańsk Przymorze, ul. Sztormowa, 3 – Gdynia, ul. Powstania Styczniowego, IMMiT, 4 - Gdynia Chylonia, ul. Tczewska, 5 - Gdynia, ul. Makuszyńskiego, 6 - Wejherowo, ul. Chopina, 7 – Gdynia Chylonia, ul. Chyłońska, 8 - Gdańsk Brzeźno, 9 - Gdynia, Park Chyłoński, 10 - Gdańsk Przymorze, ul. Gdyńska, 11 - Gdańsk Przymorze, ul. Szyprów, 12 – Sopot, ul. Prusa, 13 - Sopot, ul. Tuwima, 14 – Gdańsk, Siedlce, ul. Sałeczka, 15 – Sopot, ul. Mickiewicza, 16 – Gdańsk, Siedlce, Roweckiego, 17 – Gdańsk, Chełm, 19 – 22 próby ujemne, 23 - kontrola ujemna.



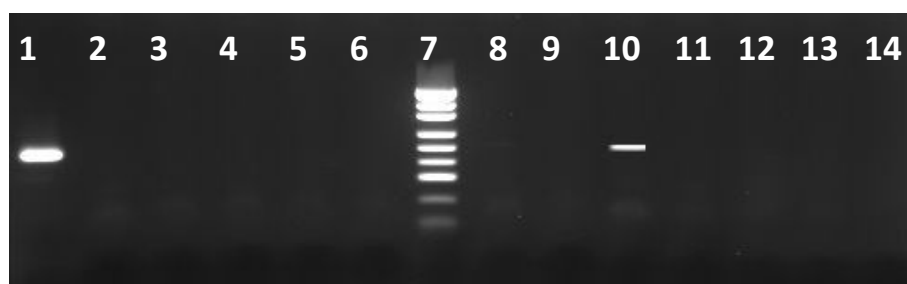
Rycina 63. Wynik Real-time PCR badanych prób ziemi. 1 – kontrola dodatnia *T. gondii*, 2 – Gdańsk, Starówka, 3 - Gdańsk, Śródmieście, teren Pałacu młodzieży, 4 - Gdańsk, Śródmieście, przedszkole, 5 - Gdańsk, Śródmieście, ul. Rzeźnicka, 6 - Gdańsk, Śródmieście, ul. Podwale, 7 - kontrola ujemna, 8 – próba ujemna.

Załącznik 17.

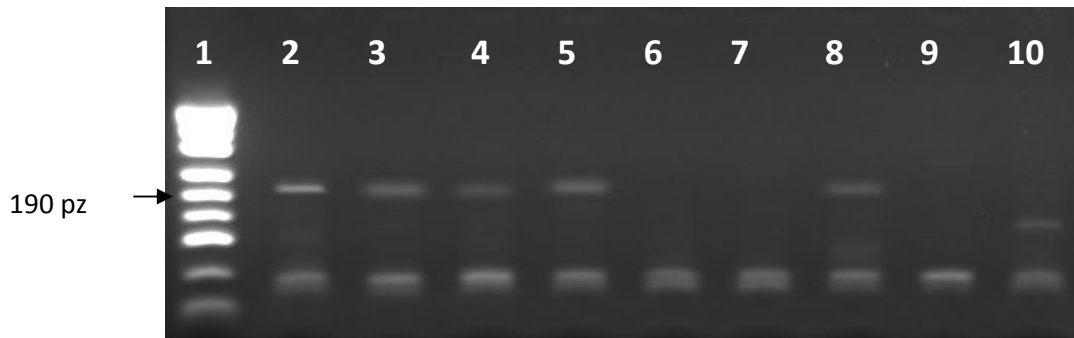
Na poniższych Rycinach przedstawiono wyniki PCR oraz Real-time PCR dla prób środowiskowych warzyw i owoców.



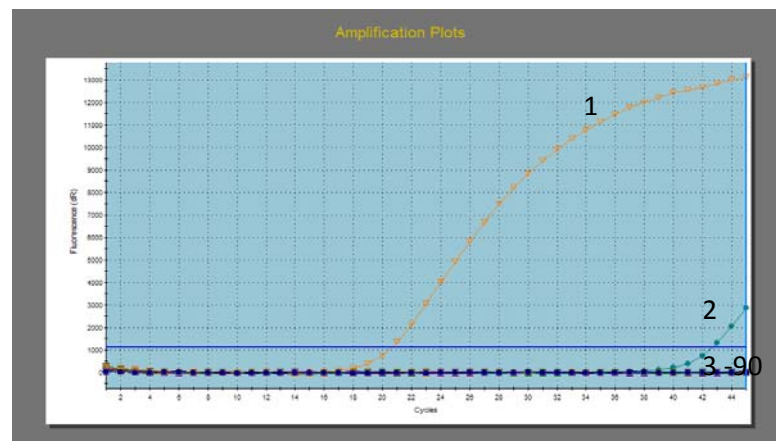
Rycina 64. Wynik PCR badanych prób warzyw/owoców. Ścieżki: 1 - marker wielkości, 2 - kontrola dodatnia *T. gondii*, 3 - truskawki, Gdynia, ul. Legionów, 4 - truskawki, Sopot, ul. Kościuszki, 5 - Gdańsk Wrzeszcz, ul. Warneńska, 6 - truskawki, Sopot, ul. 3 maja, 7 - truskawki, Gdańsk Wrzeszcz, ul. Dmowskiego, 8 - truskawki, Sopot ul. Władysława Łokietka, 9 - sałata, Gdańsk Wrzeszcz ul. Wajdeloty, 10 - marchew, Gdańsk Wrzeszcz (rynek), 11 - truskawki, Gdańsk Wrzeszcz (rynek), 12 - rzodkiewka, Gdańsk Główny (hala targowa), 13 - rzodkiewka, Gdańsk Wrzeszcz ul. Mickiewicza, 14 - kontrola ujemna.



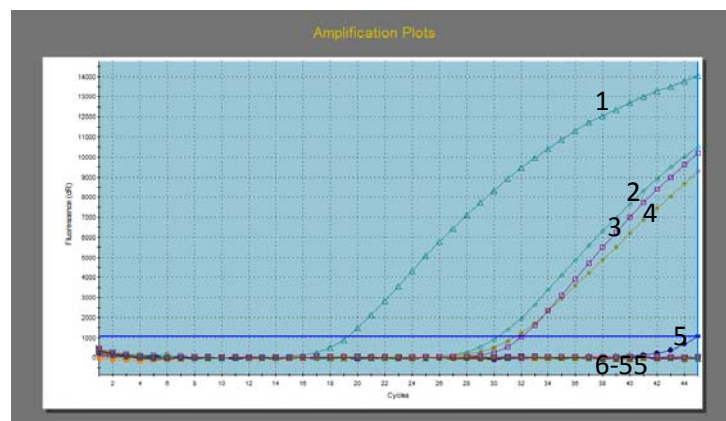
Rycina 65. Wynik PCR badanych prób warzyw/owoców. Ścieżki: 1 - marker wielkości, 2 - kontrola dodatnia, 3 - truskawki, Gdańsk – Wrzeszcz ul. Grunwaldzka, 4 - rzodkiewka, Gdynia ul. Legionów, 5 - truskawki, Gdynia ul. Świętojańska, 6 - truskawki, Gdynia ul. Świętojańska, 7 - truskawki, Gdańsk – Wrzeszcz ul. Wyspiańskiego, 8 - marchew, Gdańsk – Wrzeszcz ul. Wyspiańskiego, 9 - sałata, Gdynia ul. Świętojańska, 10 - rzodkiewka, Gdańsk Stogi ul. Stryjewskiego (ryniec), 11 - truskawki, Gdynia ul. Wrocławska, 12 - truskawki, Gdynia ul. Źródłana, 13 - rzodkiewka, Gdynia ul. Płocka, 14 - kontrola ujemna.



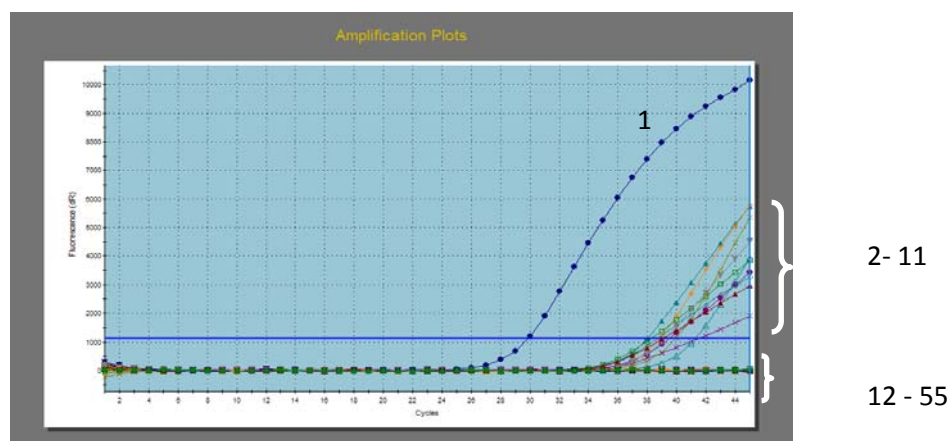
Rycina 66. Wynik PCR badanych prób warzyw/owoców. Ścieżki: 1 – marker wielkości, 2 - kontrola dodatnia, 3 – rzodkiewka, Gdynia ul. Wrocławska, 4 - marchew, Gdańsk – Wrzeszcz (rynek), 5 – marchew, Gdańsk Główny (bazar) ul. 3 maja, 6 – rzodkiewka, Gdynia ul. Dworcowa, 7 – sałata, Sopot ul. Sobieskiego, 8 – marchew, Gdańsk Główny (bazar) ul. 3 maja, 9 – rzodkiewka, Sopot ul. Grunwaldzka, 10 – kontrola ujemna.



Rycina 67. Wynik Real-time PCR badanych prób warzyw/owoców. Krzywe: 1 - kontrola dodatnia *T. gondii*, 2 - rzodkiewka, Gdańsk Główny (hala targowa), 3 - 89 próby ujemne, 90 - kontrola ujemna.



Rycina 68. Wynik Real-time PCR badanych prób warzyw/owoców. Krzywe: 1 - kontrola dodatnia *T. gondii*, 2 - Gdańsk Główny (bazar) ul. 3 maja, 3 - Gdańsk Główny (bazar) ul. 3 maja, 4 - Gdańsk Główny (bazar) ul. 3 maja, 5 - 54 próby ujemne, 55 - kontrola ujemna.



Rycina 79. Wynik Real-time PCR badanych prób warzyw/owoców. Krzywe: 1 - kontrola dodatnia *T. gondii*, 2 - marchew, Gdańsk – Wrzeszcz (rynek), 3 - rzodkiewka, Gdynia ul. Wrocławska, 4 - sałata, Gdynia Główna ul. Dworcowa, 5 - rzodkiewka, Gdynia Główna ul. Dworcowa, 6 - sałata, Sopot Al. Niepodległości, 7 - rzodkiewka, Sopot Al. Niepodległości, 8 - rzodkiewka, Gdańsk Stogi ul. Stryjewskiego (ryneček), 9 - marchew, Gdańsk Wrzeszcz (rynek), 10 - rzodkiewka, Sopot ul. 3 maja, 11 - sałata, Sopot ul. 3 maja, 12 – 54 próby ujemne, 55 – kontrola ujemna.

11. SPIS TABEL

- Tabela 1. Pozycja taksonomiczna *Toxoplasma gondii* [Długońska, 2005; Zaremba i Borowski, 2001; Niewiadomska i wsp., 2001]
- Tabela 2. Epidemie ostrej toksoplazmozy u ludzi wywołane połknięciem oocyst *T. gondii* obecnych w glebie lub wodzie
- Tabela 3. Podział toksoplazmozy za względu na kryteria [wg Kruszewskiego i Millera, 2004]
- Tabela 4. Testy serologiczne (przesiewowe i potwierdzające) stosowane w diagnostyce toksoplazmozy
- Tabela 5. Zjadliwość szczepów *T. gondii* wykazywana w stosunku do myszy laboratoryjnych [wg Howe i Sibley, 1995] oraz zdolność do wywoływania toksoplazmozy u ludzi
- Tabela 6. Odmiany techniki PCR oraz geny stosowane do wykrywania DNA *T. gondii* w próbach środowiskowych wody
- Tabela 7. Podział zebranych prób ziemi ze względu na specyfikę miejsca pobrania
- Tabela 8. Podział zebranych prób warzyw i owoców
- Tabela 9. Podział prób wody ze względu na miejsce pobrania
- Tabela 10. Profil temperaturowo - czasowy PCR (gen 65kDa)
- Tabela 11. Sekwencje starterów specyficznych do fragmentów genu SAG2 *T. gondii*
- Tabela 12. Profil temperaturowo - czasowy PCR (gen SAG2)
- Tabela 13. Profil temperaturowo - czasowy PCR (gen B1)
- Tabela 14. Profil temperaturowo - czasowy PCR (gen REP)
- Tabela 15. Profil temperaturowo - czasowy Real-time PCR (gen B1; detekcja niespecyficzna)
- Tabela 16. Profil temperaturowo – czasowy Real-time PCR (gen B1, układ I, Detekcja specyficzna)
- Tabela 17. Profil temperaturowo – czasowy Real-time PCR(gen B1, układ II, detekcja specyficzna)
- Tabela 18. Porównanie izolacji DNA z oocyst *T. gondii* z użyciem komercyjnych zestawów
- Tabela 19. Porównanie wydajności izolacji DNA z oocyst *T. gondii* za pomocą zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology) bez oraz z etapami wstępnej dezintegracji oocyst *T. gondii*
- Tabela 20. Wyniki badania mikroskopowego próby odzyskowej z piasku
- Tabela 21. Wyniki próby odzyskowej z popłuczyn warzyw
- Tabela 22. Wyniki próby odzyskowej z popłuczyn owoców (truskawek)
- Tabela 23. Wyniki badania mikroskopowego próby odzyskowej z wody

- Tabela 24. Wyniki badania mikroskopowego próby odzyskowej z filtrów do pobierania prób powietrza
- Tabela 25. Wykrywalność oocyst *T. gondii* z prób odzyskowych za pomocą PCR
- Tabela 26. Wykrywalność oocyst *T. gondii* z prób środowiskowych za pomocą Real-time PCR
- Tabela 27. Przybliżone starty materiału powodowane procedurami odzysku oocyst *T. gondii*
- Tabela 28. Porównanie granicy detekcji pasożyta *T. gondii* z odzyskowych prób środowiskowych metodą mikroskopową, PCR i Real-time PCR
- Tabela 29. Udział prób dodatnich w poszczególnej grupie badanej ziemi
- Tabela 30. Zanieczyszczenie ziemi oocystami *T. gondii* w badanych miejscowościach
- Tabela 31. Zanieczyszczenie piaskownic w Trójmieście oocystami *T. gondii*
- Tabela 32. Wyniki testu na inhibicję PCR w próbach ziemi.
- Tabela 33. Wynik genotypowania *T. gondii* izolowanego z prób środowiskowych ziemi
- Tabela 34. Stopień zanieczyszczenia prób środowiskowych ziemi oocystami *T. gondii*
- Tabela 35. Wyniki badania prób owoców i warzyw metodą RCR i Real-time PCR
- Tabela 36. Wyniki badania prób owoców i warzyw kupowanych w sklepach oraz zebranych z działek/ogrodów
- Tabela 37. Wyniki testu na inhibicję PCR w próbach owoców i warzyw
- Tabela 38. Udział prób z odnotowaną inhibicją PCR w grupie badanych warzyw i owoców kupowanych w sklepach oraz zbieranych z działek/ogrodów
- Tabela 39. Zestawienie zebranych prób środowiskowych ziemi
- Tabela 40. Zestawienie zebranych prób warzyw i owoców
- Tabela 41. Zestawienie zebranych prób powietrza
- Tabela 42. Zestawienie zebranych prób wody
- Tabela 43. Wyniki badań molekularnych dla prób ziemi
- Tabela 44. Wyniki genotypowania (RFLP) dodatnich prób środowiskowych ziemi
- Tabela 45. Ładunek patogenny obliczony dla dodatnich prób środowiskowych ziemi
- Tabela 46. Wyniki badań molekularnych dla prób warzyw i owoców
- Tabela 47. Wyniki genotypowania badanych prób środowiskowych warzyw
- Tabela 48. Wyliczony ładunek patogenny prób środowiskowych warzyw

12. SPIS RYCIN

- Rycina 1. Formy rozwojowe *Toxoplasma gondii*
- Rycina 2. Tachyzoity *Toxoplasma gondii* obserwowane w mikroskopie elektronowym
- Rycina 3. Ultrastruktura komórki *Toxoplasma gondii*
- Rycina 4. Cykl życiowy *Toxoplasma gondii*
- Rycina 5. Odsetki przypadków toksoplazmozy rozpoznawanych badaniem laboratoryjnym i klinicznym w zależności od kategorii badanych osób
- Rycina 6. Dynamika syntezy swoistych przeciwciał w przypadku toksoplazmozy nabytej
- Rycina 7. Ogólny schemat eksperymentalnego odzysku i detekcji oocyst *T. gondii* z prób środowiskowych.
- Rycina 8. Zestaw do pobierania prób powietrza. A) AirPortMD8 (Sartorius), B) Filtry żelowe (Sartorius AG, Germany).
- Rycina 9. Zestaw do filtrowania wody
- Rycina 10. Wyrząsarka do filtrów CAT S-50
- Rycina 11. Sonifikator Labsonic®M (Sartorius AG). A) Komora dźwiękoszczelna, B) zegar C) sonda, D) statyw
- Rycina 12. Urządzenia do separacji magnetycznej. A) DYNAL MPC-S, B) DYNAL MPC-L
- Rycina 13. Rotator DYNAL Sample Mixer
- Rycina 14. A) Komory aparatu do elektroforezy poziomej Horyzont (Gibco BRL, USA), B) zestaw do archiwizacji wyników GelDoc-It (Imagine Systems, USA)
- Rycina 15. Termocykler Mx 3005P (Stratagene, USA) do Real-time PCR
- Rycina 16. Przykładowa krzywa standardowa Real-time QPCR
- Rycina 17. Analizator DNA AbiPrism 310 DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA)
- Rycina 18. Ogólny schemat badania prób środowiskowych
- Rycina 19. Krzywa topnienia produktów amplifikacji fragmentu genu B1 *T. gondii* przeprowadzonej na kontroli dodatniej *T. gondii*: A) wykres charakterystyczny dla jednego produktu PCR; B) wykres wskazujący na zanieczyszczenie próby badanej zawierającej kontrolę dodatnie *T. gondii* obcym DNA (przesunięcie temperatury topnienia)
- Rycina 20. Wynik PCR specyficznej dla fragmentu genu B1 *T. gondii* przeprowadzonej na seryjnych rozcieńczeniach kontroli pJET-B1 *T. gondii*
- Rycina 21. Wyniki Real-time PCR z użyciem sondy TaqMan ToxB1S specyficznej do fragmentu genu B1 *T. gondii*. Krzywe: 1-9 seryjne

- rozcieńczenie kontroli pJET-B1 *T. gondii* (liczba kopii DNA w próbie: 1 - 5×10^8 , 2 - 5×10^7 , 3 - 5×10^6 , 4 - 5×10^5 , 5 - 5×10^4 , 6 - 5×10^3 , 7 - 5×10^2 , 8 - 5×10^1 , 9 - 5, 10 - 0,5) 11 – kontrola ujemna
- Rycina 22. Wynik testu izolacji DNA z oocyst *T. gondii* z użyciem zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology). Elektroforeza produktów amplifikacji genu B1 *T. gondii* w 2% żelu agarozowym
- Rycina 23. Wynik testu izolacji DNA z oocyst *T. gondii* z użyciem zestawu NucliSens MiniMAG (Biomerieux). Elektroforeza produktów amplifikacji genu B1 *T. gondii* w 2% żelu agarozowym
- Rycina 24. Wynik testu izolacji DNA z oocyst *T. gondii* z użyciem zestawu Fast DNA Spin kit (for soil) (BIO 101 Systems). Elektroforeza produktów amplifikacji genu B1 *T. gondii* w 2% żelu agarozowym
- Rycina 25. Wynik izolacji DNA z oocyst *T. gondii* zestawem GenomicMini (A&A Biotechnology): A) bez etapów wstępnej dezintegracji oocyst; B) z etapami wstępnej dezintegracji oocyst i użyciem detergentu SDS; C) z etapami wstępnej dezintegracji oocyst i użyciem detergentu Tween 20
- Rycina 26. Wynik testu izolacji DNA z oocyst *T. gondii* zestawem GenomicMini (A&A Biotechnology) z etapami wstępnej dezintegracji oocyst i użyciem detergentu SDS. Krzywe amplifikacji genu B1 *T. gondii* w Real-time PCR
- Rycina 27. Zdjęcie preparatu świeżego wykonanego z próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z piasku oglądane pod mikroskopem świetlnym
- Rycina 28. Zdjęcie preparatu świeżego wykonanego z próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z wody oglądanego pod mikroskopem fluorescencyjnym, obserwacja autofluorescencji oocyst
- Rycina 29. Zdjęcie preparatu barwionego według Ziehl-Neelsena wykonanego z próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z rzodkiewek
- Rycina 30. Wynik próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z ziemi
- Rycina 31. Wynik próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z warzyw (rzodkiewka)
- Rycina 32. Wynik próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z owoców (truskawki)
- Rycina 33. Wynik próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z wody
- Rycina 34. Wynik próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z filtrów powietrza
- Rycina 35. Wynik próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z gleby. Krzywe amplifikacji genu B1 *T. gondii* w Real-time PCR
- Rycina 36. Wynik próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z warzyw (rzodkiewki). Krzywe amplifikacji genu B1 *T. gondii* w Real-time PCR
- Rycina 37. Wynik próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z owoców (truskawki). Krzywe amplifikacji genu B1 *T. gondii* w Real-time PCR
- Rycina 38. Wynik próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z wody. Krzywe amplifikacji genu B1 *T. gondii* w Real-time PCR
- Rycina 39. Wynik próby odzyskowej oocyst *T. gondii* z filtrów żelowych. Krzywe amplifikacji genu B1 *T. gondii* w Real-time PCR

- Rycina 40. Zanieczyszczenie ziemi oocystami *T. gondii* w badanych miejscowościach
- Rycina 41. Stopień zanieczyszczenia piaskownic oocystami *T. gondii* w Trójmieście
- Rycina 42. Przykładowy wynik amplifikacji fragmentu genu B1 *T. gondii* techniką PCR z prób środowiskowych ziemi
- Rycina 43. Wynik amplifikacji fragmentu genu B1 *T. gondii* techniką Real-time PCR z prób środowiskowych ziemi
- Rycina 44. Kontrola inhibicji dla prób środowiskowych ziemi
- Rycina 45. Wynik amplifikacji fragmentów genu SAG2 *T. gondii* przeprowadzonej na próbach ziemi wybranych do genotypowania *T. gondii*
- Rycina 46. Wynik RFLP (przykładowy elektroforogram): A) trawienie końca 3'; B) trawienie końca 5' amplifikowanego fragmentu genu SAG2 *T. gondii*
- Rycina 47. Przykładowa krzywa standardowa Real-time QPCR wykreślona na podstawie parametrów amplifikacji standardów (klonowana kontrola *T. gondii*)
- Rycina 48. Zanieczyszczenie badanych prób warzyw i owoców oocystami *T. gondii*
- Rycina 49. Wynik amplifikacji fragmentu genu B1 *T. gondii* techniką PCR z prób środowiskowych warzyw i owoców
- Rycina 50. Wynik amplifikacji fragmentu genu B1 *T. gondii* techniką PCR z prób środowiskowych owoców i warzyw
- Rycina 51. Kontrola inhibicji dla prób środowiskowych warzyw i owoców
- Rycina 52. Krzywa standardowa Real-time QPCR wykreślona na podstawie parametrów amplifikacji standardów (klonowana kontrola *T. gondii*).
- Rycina 53. Wynik sekwencjonowania fragmentu genu B1 *T. gondii* uzyskanego z jednej z badanych prób środowiskowych ziemi
- Rycina 54. Mapy ilustrujące badane rejony, w których pobierano próby środowiskowe
- Rycina 55. Mapy przedstawiające badane rejony Gdańska, w których zanotowano *T. gondii* w próbach ziemi
- Rycina 56. Mapa ukazująca miejsca w Sopocie, w których zanotowano obecność *T. gondii* w próbach ziemi
- Rycina 57. Mapy ilustrujące miejsca w Gdyni, w których zanotowano obecność *T. gondii* w próbach ziemi
- Rycina 58. Mapa ilustrująca miejsca w Wejherowie gdzie wykryto *T. gondii* w próbach ziemi
- Rycina 59. Wynik PCR badanych prób ziemi
- Rycina 60. Wynik PCR badanych prób ziemi
- Rycina 61. Wynik PCR badanych prób ziemi
- Rycina 62. Wynik Real-time PCR badanych prób ziemi

-
- Rycina 63. Wynik Real-time PCR badanych prób ziemi
Rycina 64. Wynik PCR badanych prób warzyw/owoców
Rycina 65. Wynik PCR badanych prób warzyw/owoców
Rycina 66. Wynik PCR badanych prób warzyw/owoców
Rycina 67. Wynik Real-time PCR badanych prób warzyw/owoców
Rycina 68. Wynik Real-time PCR badanych prób warzyw/owoców
Rycina 69. Wynik Real-time PCR badanych prób warzyw/owo

