

Εργαστήριο Περιγραφικής Ανατομικής  
Διευθυντής: Αναγνωστοπούλου Σοφία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

## Διάγνωση της τοξοπλάσμωσης με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο Ανάλυση της μικροσκοπικής δομής

Ε. ΠΑΝΑΓΟΥΛΗ, Α. ΧΑΤΖΗΓΕΩΡΓΙΟΥ, Ι. ΜΗΤΣΟΥ, Σ. ΣΤΕΡΓΙΟΠΟΥΛΟΣ, Ε. ΚΟΤΣΙΟΜΗΤΗΣ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου η ανάλυση της μικροσκοπικής δομής για τη διάγνωση της τοξοπλάσμωσης. Το υλικό που εξετάστηκε ελήφθη από ανθρώπινο πτώμα το οποίο μεταφέρθηκε άμεσα μετά το θάνατο προς μονιμοποίηση στο εργαστήριο Περιγραφικής Ανατομικής, διότι η αποθανούσα (επρόκειτο για θήλυ) ήταν δότρια σώματος για την εκπαίδευση των δευτεροετών φοιτητών της Ιατρικής.

### Εισαγωγή

Η ανάλυση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ιδιαίτερα λεπτών τομών ιστού επέτρεψε τη διάγνωση της τοξοπλάσμωσης σε περίπτωση ασθενούς, η οποία με τις συμβατικές μεθόδους θα έμενε αδιάγνωστη. Η ιστολογική εξέταση αποκάλυψε μικροοργανισμούς οι οποίοι μορφολογικά δεν ήταν δυνατόν να διαγνωστούν. Από την μικροσκοπική εξέταση επρόκειτο για μικροοργανισμούς μεγέθους  $3 \times 2 \mu\text{m}$ , οι οποίοι αποτελούνταν από λίγα μικροϊνίδια, διέθεταν κονίδιο και πολλαπλασιάζονταν με ενδογένεση. Τα χαρακτηριστικά αυτά αντιστοιχούν στο *Toxoplasma gondii*, η δομή του οποίου μελετήθηκε από τους Scholtzseck και Melhorn σε προσβληθέντα πειραματόζωα. Η ανάλυση της μικροσκοπικής δομής με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μπορεί να αποδεικτεί ιδιαίτερα χρήσιμη στη διάγνωση του τοξοπλάσματος.

Σε υπόνοια λοίμωξης από πρωτόζωα και όταν ο εντοπιζόμενος μικροοργανισμός δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί με τα συμβατικά μέσα, η επιβεβαίωση της διάγνωσης είναι απαραίτητη. Στους ζώντες μπορούν να γίνουν ορολογικές εξετάσεις και η διάγνωση τίθεται με την παρουσία υψηλών τίτλων αντισωμάτων έναντι του Τοξοπλάσματος (με ανοσοκαθήλωση ή αιμοσυγκόλληση). Η ορολογική διάγνωση δύναται να μην είναι ακριβής σε ανοσοανεπάρκεια ή ανοσοκαταστολή, ενώ είναι αδύνατη μετά θάνατον. Έως τώρα, δεν ήταν εφικτό να εντοπιστεί το *T. gondii* ικανοποιητικά μέσω ανοσοφθορισμού απευθείας σε δείγματα ιστών λόγω του φαινομένου του αυτοφθορισμού το οποίο ενισχύει τη χρήση φορμόλης. Η εξέταση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο λεπτών τομών ιστού είχε ικανοποιητικά αποτελέσματα, αλλά η διαφοροδιάγνωση του Τοξοπλάσματος από τα άλλα διεισδυτικά κοκκίδια απαιτεί συστηματική ανάλυση των μικροσκοπικών δομών.

Ο Scholtzseck και οι συνεργάτες του μελέτησαν με προσοχή τη δομή και τις λειτουργίες των σποροζώων

και συγγενών μικροοργανισμών σε πειραματόζωα. Σύμφωνα με αυτή τη μελέτη η ταξινόμηση των σποροζώων γίνεται με βάση: α) τη μέθοδο πολλαπλασιασμού β) το μέγεθος και τις διαστάσεις του μικροοργανισμού σε διάφορα στάδια γ) τον αριθμό των μικροϊνιδίων δ) τη θέση και τη δομή των ροπτριών.

Τα σποροζώα εμφανίζουν στάδια στον κύκλο ζωής τους κατά τα οποία πολλαπλασιάζονται με ενδογένεση, γεγονός που τα διακρίνει από τα άλλα παράσιτα. Τα μικροϊνίδια είτε κατανέμονται κυβοειδώς, είτε εμφανίζονται ως ένας σχηματισμός στο πρόσθιο άκρο του μικροοργανισμού. Οι ροπτρίες είναι σακκοειδείς σχηματισμοί οι οποίοι προέρχονται από το πρόσθιο τριτημόριο του μικροοργανισμού και εκβάλλουν στο πρόσθιο άκρο αυτού, στο κονίδιο. Τα μικροϊνίδια λειτουργούν ως εκκριτικά οργάνια. Το προϊόν το οποίο παράγουν και μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένζυμο, αποθηκεύεται στις ροπτρίες και από αυτές στη συνέχεια φέρεται στο κονίδιο από το οποίο αποβάλλεται προς το περιβάλλον με σκοπό να βοηθήσει την διείσδυση του παράσιτου στα κύτταρα του ξενιστή. Τα μεροζωΐδια τα οποία βρέθηκαν μέσα σε κύστες της *Sarcocystis* περιείχαν πάνω από 400 μικροϊνίδια, της *Frenkelia* 50-70, της *Besnoitia* 80-100 και του *Toxoplasma* 30-50. Ο αριθμός των ροπτριών είναι μέχρι 11 στη *Sarcocystis*, 5-8 στην *Frenkelia*, 3-5 στην *Besnoitia* και 5-9 στο *Toxoplasma*. Το μήκος και πλάτος των μικροοργανισμών αστών σε  $\mu\text{m}$  είναι: της *Sarcocystis* 10-15x3,4 $\mu\text{m}$ , της *Frenkelia* 7-9x2-2,7 $\mu\text{m}$ , της *Besnoitia* 7-9x2-2,5 $\mu\text{m}$  και του *Toxoplasma* 5,8-8x1-2 $\mu\text{m}$ .

Η διεθνής επιστημονική κοινότητα, αλλά και διάφορα επιστημονικά συνέδρια αναγνώρισαν σαν κριτήρια ταξινόμησης την ανάλυση των μικροσκοπικών δομών. Η αποδοχή των κριτηρίων αυτών απαιτεί μια μέθοδο διάγνωσης χωρίς τη χρήση φορμόλης. Στην παρούσα εργασία περιγράφουμε περίπτωση ασθενούς, όπου η

ανάλυση μικροσκοπικών δομών ήταν η απαιτούμενη μέθοδος για τη διάγνωση.

### Παρουσίαση περιστατικού

Γυναίκα 52 ετών, με ελεύθερο ιατρικό ιστορικό, προσήλθε σε κρατικό νοσοκομείο αιτιούμενη βήχα, ρινική καταρροή, πυρετό, ανορεξία και απώλεια βάρους ενάρξεως προ 10 μηνών. Επίσης παρουσίαζε επιφανειακό έλκος στην περιοχή του αιδοίου για το οποίο είχε λάβει τετρακυκλίνη. Ο βήχας υποχώρησε, παρέμεινε όμως ο πυρετός ο οποίος συνοδευόταν από ρίγος. Στη συνέχεια αναπτύχθηκαν ανάλογα έλκη στα χείλη και στο στόμα της ασθενούς και συστήθηκε η εισαγωγή της στο νοσοκομείο. Η ακτινογραφία θώρακος έδειξε την παρουσία πυκνών διηθημάτων στους πνεύμονες. Πραγματοποιήθηκε βιοψία πνεύμονα η οποία ήταν θετική για την *Pneumocystis Carinii*. Στην ασθενή χορηγήθηκε πενταμίνιο και η κατάστασή της βελτιώθηκε για αρκετές ημέρες. Σε αυτό το χρονικό διάστημα διερευνήθηκε ιδιαίτερα η περίπτωση της. Τα επίπεδα των IgG, IgA, IgM, C<sub>1</sub> και C<sub>3</sub> ήταν μειωμένα. Η δερμοαντίδραση για φυματίωση, ιστοπλάσμωση και κοκκιδιοειδομυκητίαση ήταν επίσης αρνητική. Παρόλα αυτά η κατάσταση της ασθενούς άρχισε και πάλι να επιδεινώνεται. Στις καλλιέργειες σωματικών υγρών και τρημάτων που ελήφθησαν αναπτύχθηκαν μικροοργανισμοί: *Enterococcus*, *E.coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas* και *Candida albicans*. Έγινε έναρξη ισχυρής αντιβιοτικής αγωγής, συμπεριλαμβανομένης και της αμφοτερικίνης-Β, χωρίς όμως αποτέλεσμα. Τελικά η ασθενής προσβλήθηκε από εγκεφαλίτιδα και κατέληξε. Παρόλο που δεν τεκμηριώθηκε διάγνωση προ θανάτου, υπήρξε έντονη υπόνοια για παρουσία κακοήθειας.

Η καρδιά ήταν απόλυτα φυσιολογική. Οι πνεύμονες ήταν σκληροί και βαρύτεροι του φυσιολογικού. Λεπτές τομές τους ανέδειξαν πολλές σκληρές κιτρινωπές περιοχές, κυρίως στην περιοχή των μικρών βρόγχων. Στο κατώτερο τριτημόριο του οισοφάγου εντοπίστηκε έλκη ανάλογα με αυτά του στόματος και του περινέου. Παρατηρήθηκε τέλος εγκεφαλομαλάκυνση στον αριστερό ινιακό λοβό και σε τμήμα του αριστερού λοβού της παρεγκεφαλίδας. Δεν εντοπίστηκε πουθενά όγκος ή ένδειξη κάποιας κακοήθειας.

Η μικροσκοπική εξέταση των πνευμόνων ανέδειξε την παρουσία παχύρρευστου υγρού στις κυψελίδες, το οποίο ήταν πλούσιο σε λεμφοκύτταρα, πλασματόκυτταρα και κυψελιδικά μακροφάγα. Επίσης εντοπίστηκαν πολλαπλές νεκρωτικές εστίες οι οποίες αντιστοιχούσαν στις κιτρινωπές περιοχές που είχαν παρατηρηθεί μακροσκοπικά. Ανάμεσα στις εστίες νέκρωσης εντοπίστηκαν αρκετοί διάσπαρτοι εμπύρνηνοι μικροοργανισμοί μεγέθους 2-3 μμ με σχήμα νυστεριού. Στο υπόλοιπο πνευμονικό παρέγχυμα παρατηρήθηκαν ευμεγέθη πνευμονοκύτταρα τα οποία περιείχαν μεγάλα ενδοπυρηνικά έγκλειστα (τύπου Cowdry-A) τα οποία είναι χαρακτηριστικό της νόσου των εγκλειστών. Παρόμοια κύτταρα εντοπίστηκαν επίσης στο ήπαρ, το δέρμα και τον οισοφάγο, ενώ στην καρδιά, τους πνεύμονες και τον εγκέφαλο παρατηρήθηκαν πολλές βασεόφιλες κύστες διαμέτρου 12

μμ οι οποίες περιείχαν πολλές μικρές (1-2μμ) εσωτερικές δομές. Παρόλες τις ειδικές τεχνικές, οι κύστες αυτές καθώς και οι εμπύρνηνοι μικροοργανισμοί που εντοπίστηκαν δεν ήταν δυνατόν να ταυτοποιηθούν με ακρίβεια. Περισσότερες ομοιότητες, πάντως, εμφανίζουν με το *Trypanosoma Cruzi* και το *T. gondii*. Η *P. carinii* δεν εντοπίστηκε πουθενά, ενώ η *C. albicans* βρέθηκε στην ουροδόχο κύστη. Δεν υπήρξε κανένα μικροσκοπικό εύρημα ενδεικτικό για κακοήθεια, ενώ ο μυελός των οστών ήταν φυσιολογικός. Οι λεμφικοί αδένες ήταν άδειοι από κύτταρα και χωρίς βλαστικά κέντρα. Δεν βρέθηκε καμία αιτία για την παρουσία ανοσοκαταστολής. Τέλος, ορολογικές εξετάσεις δεν είχαν γίνει στη γυναίκα όσο ζούσε και η λήψη ορού μετά θάνατον είναι αδύνατη.

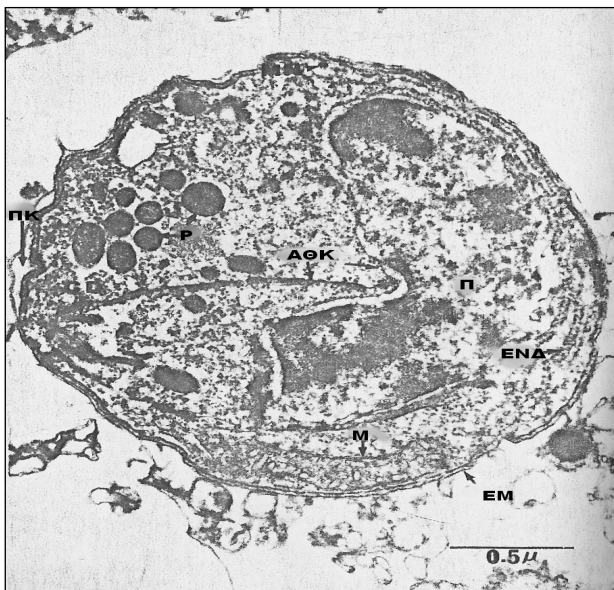
### Υλικό και Μέθοδοι

Δείγμα πνευμονικού ιστού από τη νεκροτομή ασθενούς η οποία κατέληξε από ποικίλες λοιμώξεις και επιπλοκές, συμπεριλαμβανομένης και της ανοσοκαταστολής, εστάλη στο κέντρο ελέγχου νοσημάτων (CDC, center of disease control), προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι κύστες που εντοπίστηκαν. Οι κύστες αυτές ήταν συμβατές με το *Trypanosoma cruzii*, όπως διαπιστώθηκε μετά από χρώση των δειγμάτων με αιματοξυλίνη. Επειδή όμως ήταν συμβατές και με άλλους μικροοργανισμούς έγινε χρήση και ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, προκειμένου να ταυτοποιηθούν με ακρίβεια.

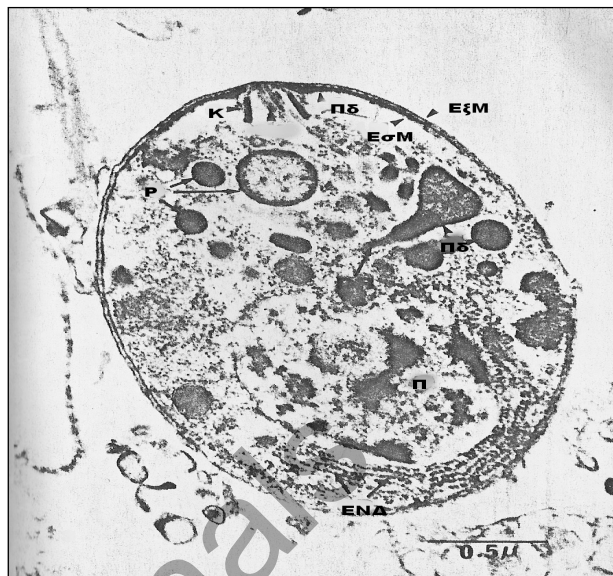
Για τη μελέτη με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο οι υπό φερμόλη ιστοί κόπηκαν σε κύβους του 1 mm και τοποθετήθηκαν σε 1% OsO<sub>4</sub> v/v με 0.2 M S-collidine ρυθμιστικό διάλυμα. Οι ιστοί αποξηράνθηκαν σε αλκοολικά διαλύματα, εγκλείστηκαν σε Maraglas<sup>®</sup> 732 και κόπηκαν με Reichert<sup>®</sup> OMU2 μικροτόμο, εφοδιασμένο με λεπίδα από διαμάντι. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε χάλκινα διαχωριστικά, χρωματίστηκαν με διοξείδιο του ουρανίου και κιτρικό οξύ και μελετήθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο Philips<sup>®</sup> E.M. 200.

### Αποτελέσματα

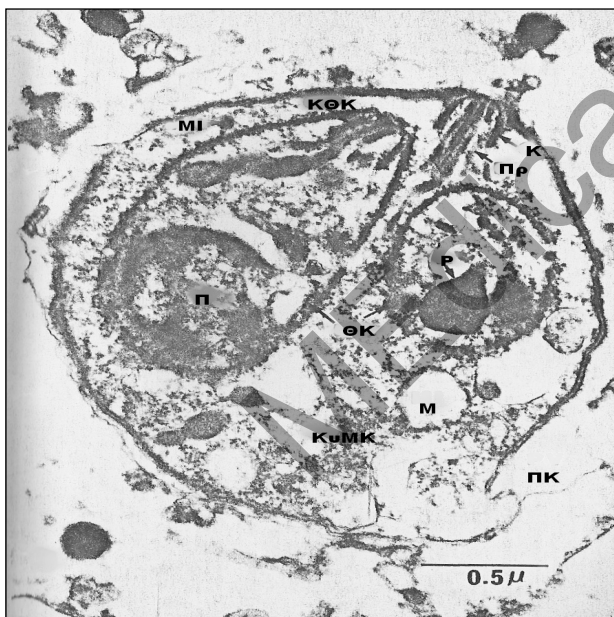
Οι μικροοργανισμοί που εντοπίστηκαν στους ιστούς βρίσκονταν συνήθως μέσα σε παρασιτοφόρα κενοτόπια στα κύτταρα του ξενιστή (Εικ. 1 και 2). Πρόκειται για σφαιρικούς μικροοργανισμούς με πλάτος 2 μμ και μήκος 3μμ. Η γενική δομή των μικροοργανισμών, η παρουσία δηλαδή μονήρους πυρήνα, μεμβράνης ή κάψας έθεσαν την υπόνοια ότι πρόκειται για πρωτόζωα. Το κύτταρο περικλειόταν από κάψα τριών στοιβάδων, η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό των «κινητών» σταδίων των πρωτόζωων. Η εξωτερική μεμβράνη είχε μία στοιβάδα και ήταν συνεχής (Εικ. 3). Η έσω μεμβράνη αποτελούνταν από δύο στοιβάδες και κατέληγε στο πρόσθιο άκρο, στο πολικό δακτύλιο (Εικ. 3). Ο μικροοργανισμός εμφάνιζε δύο πόλους. Το κονίδιο, ένα οργανίδιο στον κορυφαίο πόλο και χαρακτηριστικό των «κινητών» σταδίων των σποροζώων (*Apicomplexa*), εμφάνιζε δύο προκωνοειδείς δακτυλίους (Εικ. 2 και 3). Στο κυτταρόπλασμα παρατηρήθηκαν πολλές ωσμόφιλες δομές, οι οποίες προφανώς αποτελούσαν πόρους των ροπτριών, και εισέρχονταν στο κονίδιο



**Εικ. 1.** *Toxoplasma gondii*, κυστικό στάδιο - έναρξη ενδογένεσης. x 44,560.



**Εικ. 3.** *Toxoplasma gondii* σε κυστικό στάδιο (μεροζωΐδιο) - παρουσίαση των μικροσκοπικών δομών του. x 44,560



**Εικ. 2.** Διαίρεση του μητρικού κυττάρου σε δύο θυγατρικά μεροζωΐδια. x 44,560.

(Εικ. 1-3). Επίσης παρατηρήθηκαν λίγα μόνο μικροϊνίδια, γεγονός το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό του *T. gondii* (Εικ. 2). Ο πυρήνας ήταν δομικά φυσιολογικός και περιείχε πολλαπλά έγκλειστα ποικίλων πυκνοτήτων (Εικ. 1-3).

Πολλά κύτταρα βρίσκονταν στο στάδιο της διαίρεσης. Η αναπαραγωγή δια εκβλαστήσεως είναι τυπική στα Apicomplexa, στα οποία ανήκει και το *T.*

*gondii* και καλείται ενδογένεση (Εικ. 1 και 2). Κατά την ενδογένεση το μητρικό κύτταρο διαιρείται σε 2 δύο θυγατρικά (μεροζωΐδια - Εικ. 2). Στην εικόνα φαίνεται ένα τοξόπλασμα στην αρχική φάση της ενδογένεσης και στην Εικ. 2 σε προχωρημένη ενδογένεση. Από το μητρικό κύτταρο προκύπτουν δύο θυγατρικά τα οποία παρουσιάζουν τα χαρακτηριστικά του *T. gondii*. Συμπερασματικά, η παρουσία κωνοειδούς και πολλαπλασιασμού με ενδογένεση απέκλεισαν το *T. cruzi*, το μέγεθος 3x2 μm, η παρουσία ελάχιστων μικροϊνιδίων και η παρουσία μέχρι εννέα ραπτριών που απέκλεισαν την *Sarcocystis*, την *Besnoitia* και την *Frenkelia*, οδήγησαν στην ταυτοποίηση του μικροοργανισμού ως *Toxoplasma gondii*.

### Συζήτηση

Τα γένη των Apicomplexa που μπορεί να προσβάλουν τον άνθρωπο και αφορούν το συγκεκριμένο περιστατικό είναι η *Sarcocystis*, η *Frenkelia*, η *Besnoitia* και το *T. gondii*. Η *Sarcocystis* προσβάλλει τον άνθρωπο και δημιουργεί κύστες οι οποίες τείνουν να περιορίζονται στο νευρικό σύστημα. Η *Besnoitia* μπορεί να εντοπιστεί στις μυϊκές περιτονίες και στο σπλαχνικό περιτόναιο, όχι όμως στους πνεύμονες. Η *Frenkelia* αποτελεί παράσιτο του Κ.Ν.Σ. Η ταυτοποίηση με ανάλυση της μικροσκοπικής δομής αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τη διάγνωση της τοξοπλάσμωσης. Όπως παρουσιάστηκε στο συγκεκριμένο περιστατικό, με τη μέθοδο αυτή το *T. gondii* δύναται να διαφοροδιαγνωστεί όχι μόνο από συγγενείς μικροοργανισμούς όπως η *Besnoitia*, η *Sarcocystis* και η *Frenkelia* αλλά και από άλλα παράσιτα άλλου είδους και παρόμοιας δομής. Στην προκειμένη περίπτωση παραμένει άγνωστο κατά πόσο η τοξοπλάσμωση

προκάλεσε το θάνατο της ασθενούς ή απλά έδρασε ως επιβαρυντικός παράγοντας, επιπλέοντας τη νόσο των εγκλειστών και την ανοσοκαταστολή. Η ανάλυση μικροσκοπικών δομών μπορεί να πραγματοποιηθεί σε υλικό βιοψίας από ζώντα ή μετά από νεκροτομή και μπορεί να οδηγήσει στη διάγνωση σώζοντας τη ζωή του ασθενούς.

#### Συνομογραφίες:

**K:** κονίδιο  
**KOK:** κονίδιο θυγατρικού κυττάρου  
**KMK:** κυτταρόπλασμα μητρικού κυττάρου  
**ΘΚ:** θυγατρικό κύτταρο  
**ΑΘΚ:** αρχέγονο θυγατρικό κύτταρο  
**Πρ:** πόροι των ροπριών  
**ΕΝΔ:** ενδοπλασματικό δίκτυο  
**ΕσΜ:** έσω μεμβράνη  
**M:** μιτοχόνδριο  
**ΜΙ:** μικροϊνίδια  
**Π:** πυρήνας  
**ΕΞΜ:** εξωτερική μεμβράνη  
**Πδ:** πολικός δακτύλιος  
**ΠΚ:** παρασιτοφόρα κενोटία  
**P:** ροπρίες

#### ABSTRACT

The analysis of fine structures by electron microscopic examination of ultrathin tissue sections permitted a diagnosis of toxoplasmosis in a human case that would have gone undiagnosed by conventional methods. Fine-structural analysis showed the organisms to be 3 x 2 micrometer in size, to contain few micronemes, to contain as many as nine rhoptries, to possess an apical conoid, and to multiply by endodyogeny. Fine-structural analysis can be a valuable adjunct in the diagnosis of toxoplasmosis

#### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ashburn D, Chatterton JM, Evans R, et al: Success in the toxoplasma dye test. *J Infect* 2001
2. Dubey JP: *Toxoplasma, Besnoitia, Hamodia, Sarcocystis and other tissue cyst-forming coccidian of man and animals*, 1977
3. Erlandson RA: A new maraglas, E.E.R.( R )732, embedment for electron microscopy, 1964
4. Gagne SS: *Toxoplasmosis. Prim Care Update Ob Gyns*, 2001
5. Goldman M, Carver K, Sultzer AJ: *Reproduction of toxoplasma gondii by internal budding*, 1958
6. Hammond DM, Long PL: *The Coccidia*. Baltimore, University Park Press, 1973
7. Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP: *Biology and epidemiology of Toxoplasma gondii in man and animals*. 2005
8. Joynton, DH.; Wreghitt, TJ. *Toxoplasmosis: A Comprehensive Clinical Guide*. Cambridge, UK: Cambridge Univ Press, 2001.
9. Luder CG, Bohne W, Soldati D: *Toxoplasmosis: a persisting challenge*. 2001
10. Montoya JG, Rosso F: *Diagnosis and management of toxoplasmosis*, 2005
11. Scholtyseck E, Mehlhorn H, Friedhoff K: *The fine structure of the conoid of sporozoa and related organisms*. 1970
12. Scholtyseck E, Mehlhorn H, Muller BEG: *Identifikation von Merozoiten der vier cystenbildenden coccidian (Sarcocystis, Toxoplasma, Besnoitia, Frenkelia) and Grund feinstruktureller Kriterien*. 1970
13. Scholtyseck E, Mehlhorn H: *Ultra-structural study of characteristic organelles (paired organelles, micronemes, micropores) of Sporozoa and related organisms*. 1973
14. Scholtyseck E, Pierkarski G: *Elektron-mikroskopische Untersuchungen an Merozoiten Von Eimerien (E. perforans and E. stiedae) and Toxoplasma gondii. Zur systematischen Stellung von Toxoplasma gondii*. 1965
15. Schwartzman JD: *Toxoplasmosis. Curr Infect Dis Rep* 2001
16. Senaud J: *Contributions a l'etude des scarospridies et toxoplasmes*, 1967

□