

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Maja KODRIČ

**UGOTAVLJANJE OKUŽB S KRIPTOSPORIDIJI Z
VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Maja KODRIČ

**UGOTAVLJANJE OKUŽB S KRIPTOSPORIDIJI Z VERIŽNO
REAKCIJO S POLIMERAZO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**DETECTION OF *Cryptosporidium* spp. INFECTIONS USING A
POLYMERASE CHAIN REACTION**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je potekalo v Laboratoriju za parazitologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan prof. dr. Jernej Logar, za somentorico asist. dr. Barbara Šoba in za recenzenta prof. dr. Alojz Ihan.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Jernej Logar

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: asist. dr. Barbara Šoba

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: prof. dr. Alojz Ihan

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem besedilu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Maja Kodrič

KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 616.993.1-078:577.2.083(043)=163.6
KG	paraziti/ <i>Cryptosporidium</i> spp./ <i>Cryptosporidium parvum</i> /kriptosporidioza/ diagostične metode/neposredni imunofluorescenčni test/diagostične metode/ PCR v realnem času/optimizacija metod
AV	KODRIČ, Maja
SA	LOGAR, Jernej (mentor)/ŠOBA, Barbara (somentorica)/IHAN, Alojz (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2012
IN	UGOTAVLJANJE OKUŽB S KRIPTOSPORIDIJI Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 65 str., 6 pregl., 12 sl., 1 pril., 136 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Praživali iz rodu <i>Cryptosporidium</i> povzročajo kriptosporidiozo, ki predstavlja velik javnozdravstveni problem povsod po svetu. Bolezen najpogosteje prizadene majhne otroke in osebe z oslabljeno imunostjo. Namen diplomskega dela je bil optimizirati za rod <i>Cryptosporidium</i> in vrsto <i>C. parvum</i> specifično multiplo PCR v realnem času. Z optimiziranim protokolom multiple PCR v realnem času smo testirali 131 vzorcev blata bolnikov, obolenih za gastroenteritisom, in rezultate primerjali z rezultati neposrednega imunofluorescenčnega testa (DIF), ki ga v Laboratoriju za parazitologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo uporabljajo v vsakodnevni diagnostiki kriptosporidioze. Od skupno 131 vzorcev smo z DIF prisotnost kriptosporidijev ugotovili v 3 (2,29 %) vzorcih, z multiplo PCR v realnem času pa v 4 (3,05 %) vzorcih blata. V treh od štirih pozitivnih vzorcev blata smo z multiplo PCR v realnem času ugotovili prisotnost vrste <i>C. parvum</i> , v enem vzorcu pa prisotnost vrste kriptosporidijev, ki ni bila <i>C. parvum</i> . Z našo raziskavo smo ugotovili, da je multipla PCR v realnem času občutljivejša v primerjavi z DIF, zato bi jo lahko v diagnostiki kriptosporidioze skupaj z DIF uspešno uporabljali, predvsem pri imunsко oslabljenih bolnikih in v primeru, ko bi poskušali ugotoviti vir te okužbe.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 616.993.1-078:577.2.083(043)=163.6
CX	parasites/ <i>Cryptosporidium</i> spp./ <i>Cryptosporidium parvum</i> /cryptosporidiosis/diagnostics/direct immunofluorescence assay/Real-Time PCR/method optimisation
AU	KODRIČ, Maja
AA	LOGAR, Jernej (supervisor)/ŠOBA, Barbara (co-advisor)/IHAN, Alojz (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2012
TI	DETECTION OF <i>Cryptosporidium</i> spp. INFECTIONS USING A POLYMERASE CHAIN REACTION
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XII, 65 p., 6 tab., 12 fig., 1 ann., 136 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Parasitic protozoa from the genus <i>Cryptosporidium</i> cause cryptosporidiosis which represents a big public-health problem all over the world. The disease most commonly affects small children and immunodeficient people. The purpose of this thesis was to optimize for the <i>Cryptosporidium</i> spp. and <i>C. parvum</i> specific multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR). With the optimized protocol of the multiplex Real-Time PCR we tested 131 stool specimens of patients sickened from gastroenteritis. We compared the results with the results of the Direct Immunofluorescence Assay (DIF) which is used in routine diagnostics of cryptosporidiosis in the Laboratory of Parasitology of the Institute of Microbiology and Immunology. From 131 stool specimens we detected infection with DIF at 3 (2,29 %) and with multiplex Real-Time PCR at 4 (3,05 %) specimens. At three out of four positive stool specimens with Real-Time PCR, we detected the presence of <i>C. parvum</i> and at one specimen we detected the presence of the species of <i>Cryptosporidium</i> that was not <i>C. parvum</i> . With our research we came to a conclusion that the Real-Time PCR is more sensitive than DIF, so, together with DIF, it could be successfully used in diagnostics of cryptosporidiosis, particularly in immunodeficient patients and in the case when we would try to determine the source of this infection.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA.....	1
2 PREGLED OBJAV.....	2
2.1 ZGODOVINSKI PREGLED	2
2.2 TAKSONOMIJA KRIPTOSPORIDIJEV	2
2.3 BIOLOGIJA IN MORFOLOGIJA KRIPTOSPORIDIJEV	4
2.3.1 Metabolizem	4
2.3.2 Življenjski krog	4
2.3.3 Zgradba oociste	6
2.3.4 Mehanizmi pripenjanja in vdora v celico gostitelja.....	7
2.4 GENOM	7
2.5 EPIDEMIOLOGIJA KRIPTOSPORIDIOZE PRI LJUDEH	9
2.6 PATOGENEZA IN KLINIČNA SLIKA	11
2.7 IMUNSKI ODZIV	11
2.7.1 Prirojen imunski odziv	12
2.7.2 Pridobljen imunski odziv	13
2.8 ZDRAVLJENJE KRIPTOSPORIDIOZE	13
2.9 PREPREČEVANJE KRIPTOSPORIDIOZE	14
2.10 DIAGNOSTIKA KRIPTOSPORIDIOZE	15
2.10.1 Metode barvanja	15
2.10.2 Dokazovanje antigenov kryptosporidijev z imunodiagnostičnimi metodami	16
2.10.2.1 Neposredni imunofluorescenčni testi.....	16
2.10.2.2 Neposredni encimsko imunski testi	17
2.10.3 Serološke metode.....	17
2.10.4 Molekularno biološke metode.....	18
2.10.4.1 Teoretične osnove verižne reakcije s polimerazo	18
2.10.4.2 Teoretične osnove PCR v realnem času.....	19
3 MATERIALI IN METODE.....	21
3.1 MATERIALI.....	21
3.1.1 Vzorci	21

3.1.2	Materiali in reagenti za neposredni imunofluorescenčni test Merifluor® <i>Cryptosporidium/Giardia</i> (Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, Ohio, ZDA).....	21
3.1.3	Materiali in reagenti za osamitev DNA iz vzorcev blata s komercialnim kompletom reagentov QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hamburg, Nemčija)	22
3.1.4	Materiali in reagenti za PCR v realnem času za ugotavljanje prisotnosti DNA kryptosporidijev	22
3.1.5	Materiali in reagenti za PCR v realnem času za ugotavljanje prisotnosti DNA interne kontrole	23
3.1.6	Materiali in reagenti za analizo pridelkov PCR z agarozno gelsko elektroforezo	23
3.1.7	Laboratorijska oprema	23
3.1.8	Potrošni material.....	24
3.2	METODE	25
3.2.1	Neposredni imunofluorescenčni test Merifluor® <i>Cryptosporidium/Giardia</i>	25
3.2.2	Osamitev DNA iz vzorcev blata	25
3.2.3	PCR v realnem času.....	26
3.2.3.1	Optimizacija PCR v realnem času za pomnoževanje DNA kryptosporidijev ..	26
3.2.3.1.1	Vpliv koncentracije začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA kryptosporidijev	28
3.2.3.1.2	Vpliv koncentracije sond na uspešnost pomnoževanja DNA kryptosporidijev.	29
3.2.3.1.3	Vpliv temperature pripenjanja začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA kryptosporidijev	29
3.2.3.2	Ugotavljanje DNA kryptosporidijev v kliničnih vzorcih.....	30
3.2.3.3	Preverjanje uspešnosti pomnoževanja z interno kontrolo.....	30
3.2.3.4	Analiza pridelkov PCR z agarozno gelsko elektroforezo	31
3.2.3.5	Kontrola kontaminacije.....	32
4	REZULTATI	33
4.1	ZNAČILNOSTI TESTIRANIH VZORCEV	33
4.2	REZULTATI NEPOSREDNEGA IMUNOFLUORESCENČNEGA TESTA MERIFLUOR® <i>Cryptosporidium/Giardia</i>	34
4.3	REZULTATI OPTIMIZACIJE PCR V REALNEM ČASU ZA POMNOŽEVANJE DNA KRIPTOSPORIDIJEV	34
4.3.1	Rezultati ugotavljanja vpliva koncentracije začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA kryptosporidijev.....	34
4.3.2	Rezultati ugotavljanja vpliva koncentracije sond na uspešnost pomnoževanja DNA kryptosporidijev	37
4.3.3	Rezultati ugotavljanja vpliva temperature pripenjanja začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA kryptosporidijev	40

4.3.4	Rezultati preverjanja uspešnosti pomnoževanja DNA kriptosporidijev z optimiziranim protokolom	42
4.4	UGOTAVLJANJE DNA KRIPTOSPORIDIJEV V KLINIČNIH VZORCIH	43
4.5	PRIMERJAVA DIF IN PCR V REALNEM ČASU	44
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	46
5.1	RAZPRAVA	46
5.1.1	Optimizacija PCR v realnem času za pomnoževanje DNA kriptosporidijev	46
5.1.2	Ugotavljanje prisotnosti kriptosporidijev v kliničnih vzorcih	48
5.1.3	Primerjava DIF in PCR v realnem času	49
5.2	SKLEPI	52
6	VIRI	53

ZAHVALA**PRILOGE**

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Primerjava genomov vrst <i>C. parvum</i> in <i>C. hominis</i> (Xu in sod., 2004)	8
Preglednica 2:	Učinkovitost reakcije (E), koeficient variacije (R^2) in cikel praga detekcije (C_T) pri različnih koncentracijah začetnih oligonukleotidov.	35
Preglednica 3:	Učinkovitost reakcije (E), koeficient variacije (R^2) in cikel praga detekcije (C_T) pri različnih koncentracijah sond.....	38
Preglednica 4:	Učinkovitost reakcije (E), koeficient variacije (R^2) in cikel praga detekcije (C_T) pri različnih temperaturah pripenjanja začetnih oligonukleotidov.	40
Preglednica 5:	Vzorci, pozitivni po testiranju z DIF in z optimizirano PCR v realnem času, ter njihove lastnosti.....	43
Preglednica 6:	Rezultati vzorcev blata, testiranih z DIF in s PCR v realnem času.	44

KAZALO SLIK

Slika 1:	Življenjski krog <i>Cryptosporidium</i> spp. (Putignani in Menichella, 2010)	6
Slika 2:	Prikaz neobarvanega in z nekoliko spremenjenim barvanjem po Ziehl-Neelsenu obarvanega preparata oocist kryptosporidijev (CDC, 2012a; CDC, 2012b).....	15
Slika 3:	Oociste <i>Cryptosporidium</i> spp. pod fluorescenčnim mikroskopom (EPA, 2012).....	17
Slika 4:	Prikaz krivulje pomnoževanja DNA tekom PCR.....	20
Slika 5:	Starostna razporeditev bolnikov z gastroenteritisom, vključenih v raziskavo	33
Slika 6:	Grafični prikaz pomnoževanja dela gena za 18S rRNA kryptosporidijev različnih redčitev DNA pozitivnega vzorca pri različnih koncentracijah začetnih oligonukleotidov (ΔR_n je jakost fluorescenčnega signala).....	36
Slika 7:	Grafični prikaz pomnoževanja polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste <i>C. parvum</i> različnih redčitev DNA pozitivnega vzorca pri različnih koncentracijah začetnih oligonukleotidov (ΔR_n je jakost fluorescenčnega signala)	36
Slika 8:	Pridelki PCR v realnem času, preverjeni z agarozno gelsko elektroforezo	37
Slika 9:	Grafični prikaz pomnoževanja dela gena za 18S rRNA kryptosporidijev različnih redčitev DNA pozitivnega vzorca pri različnih koncentracijah sonde (ΔR_n je jakost fluorescenčnega signala).	39
Slika 10:	Grafični prikaz pomnoževanja polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste <i>C. parvum</i> različnih redčitev DNA pozitivnega vzorca pri različnih koncentracijah sonde (ΔR_n je jakost fluorescenčnega signala).....	39
Slika 11:	Grafični prikaz pomnoževanja dela gena za 18S rRNA kryptosporidijev različnih redčitev DNA pozitivnega vzorca pri različnih temperaturah pripajanja začetnih oligonukleotidov (ΔR_n je jakost fluorescenčnega signala).	41
Slika 12:	Grafični prikaz pomnoževanja polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste <i>C. parvum</i> različnih redčitev DNA pozitivnega vzorca pri različnih temperaturah pripajanja začetnih oligonukleotidov (ΔR_n je jakost fluorescenčnega signala).	42

KAZALO PRILOG

Priloga A: Rezultati testiranja in lastnosti zbranih vzorcev bolnikov, obolelih za gastroenteritisom

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AIDS	sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti (ang. acquired immune deficiency syndrome)
ATP	adenozin trifosfat (ang. adenosine-5'-triphosphate)
BHQ	dušilec sonde (ang. black hole quencher)
bp	bazni par
<i>C. parvum</i>	pražival <i>Cryptosporidium parvum</i>
C _T	cikel praga detekcije (ang. threshold cycle)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
dATP	deoksiadenozin trifosfat
dCTP	deoksicitidin trifosfat
dGTP	deoksigvanozin trifosfat
dNTP	deoksinukleozid trifosfat
dUTP	deoksiuridin trifosfat
DIF	neposredni imunofluorescenčni test (ang. direct immunofluorescent assay)
EDTA	etilendiaminetetraacetna kislina (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA	enzimskoimunski test (ang. enzyme linked immunosorbent assay)
F	pozitivno usmerjen začetni oligonukleotid (ang. forward primer)
FAM	fluorofor karboksi-fluorescein (ang. carboxyfluorescein)
FDA	ameriški vladni urad za zdravila in prehrano (ang. food and drug administration)
FITC	fluorescentno barvilo (ang. fluorescein isothiocyanate)
<i>G. intestinalis</i>	pražival <i>Giardia intestinalis</i>
HAART	visoko aktivna antiretrovirusna terapija (ang. highly active antiretroviral therapy)
HIV	virus imunske pomanjkljivosti (ang. human immunodeficiency virus)
Ig	imunoglobulin
kDa	kiloDalton
Mbp	megabajni par

MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks (ang. major histocompatibility complex)
min	minuta
ml	mililiter
nm	nanometer
nM	nanomolarna koncentracija, nmol/l
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
R	negativno usmerjen začetni oligonukleotid (ang. reverse primer)
ROX	fluorescenčno barvilo (ang. 6-karboxi-N,N,N',N'-tetramethylrhodamin)
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina (ang. ribosomal ribonucleic acid)
spp.	latinska okrajšava za več vrst istega rodu
sek	sekunda
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
tRNA	prenašalna RNA (ang. transfer RNA)
UDG	uracil DNA glikozilaza
UV	ultravijolično valovanje
V	volt
µm	mikrometer
µM	mikromolarna koncentracija, µmol/l

1 UVOD

Praživali iz rodu *Cryptosporidium* so za ljudi in živali patogeni paraziti. Povzročajo bolezen kryptosporidiozo, ki se kaže v akutni ali kronični driski (Fayer, 2004). Bolezen najpogosteje prizadene otroke in osebe z imunsko pomanjkljivostjo, predvsem bolnike z AIDS-om. Slednje lahko okužba življenjsko ogrozi (Mak, 2004). Največ okužb pri ljudeh povzročita vrsti *C. hominis* in *C. parvum*, možni povzročitelji humane kryptosporidize pa so tudi druge vrste in genotipi kryptosporidijev (Xiao in sod., 2004; Robinson in sod., 2008).

Kryptosporidioza se pojavlja sporadično in epidemično (Dietz in sod., 2000). Predstavlja velik medicinski in veterinarski problem povsod po svetu. Infektivna oblika parazita so izredno odporne oociste, ki jih gostitelj izloča z blatom. Človek se z njimi okuži posredno z vodo ali hrano ali neposredno od okuženih ljudi in živali (Koch in sod., 1985). Uspešnega zdravila za zdravljenje kryptosporidioze zaenkrat še ni, zato sta preprečevanje okužbe in ustrezna diagnostika zelo pomembni (Petry, 2000).

Rutinske diagnostične metode za ugotavljanje okužb s kryptosporidijii večinoma temeljijo na svetlobni in fluorescenčni mikroskopiji. Diagnostična moč teh metod pogosto zavisi od izkušenj laboratorijskega osebja (Casemore in sod., 1985; Pedraza-Diaz in sod., 2000). Molekularno biološke metode so visoko občutljive in specifične, a se v vsakodnevni diagnostiki kryptosporidioze izjemno redko uporabljajo. Predvsem zaradi visoke cene je njihova uporaba omejena na raziskovalne in referenčne diagnostične laboratorije (Xiao, 2010).

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bil optimizirati verižno reakcijo s polimerazo (PCR) v realnem času za ugotavljanje prisotnosti kryptosporidijev v blatu bolnikov, obolelih za gastroenteritisom, in jo primerjati z neposrednim imunofluorescenčnim testom (DIF), ki ga v Laboratoriju za parazitologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani uporabljajo v rutinski diagnostiki kryptosporidioze.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Glede na rezultate podobnih raziskav, ki so jih opravili drugod po svetu, smo pričakovali, da bo PCR v realnem času občutljivejša v primerjavi z DIF.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINSKI PREGLED

Ameriški parazitolog E. E. Tyzzer je leta 1907 prvi opisal pražival *Cryptosporidium* (Tyzzer, 1907). Osamil jo je iz želodčnih žlez miši, zato so pražival poimenovali *C. muris* (lat. muris – miš) (Fayer in sod., 1997). Tyzzer je leta 1912 prav tako prvi opisal vrsto *C. parvum*, ki velja za eno najpogostejših povzročiteljic okužb s kriptosporidijami pri človeku (Tyzzer, 1912). V naslednjih nekaj desetletjih so rod *Cryptosporidium* zasledili pri številnih drugih vrstah živali, vendar so šele leta 1955, ko je Slavin poročal o močnih driskah v jati puranov, kriptosporidije označili kot patogene mikroorganizme (Slavin, 1955).

Bolezen kriptosporidiozo so začeli resno obravnavati v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja, ko so ugotovili prve primere okužbe pri ljudeh (Meisel in sod., 1976; Nime in sod., 1976). Leta 1982 so kriptosporidiozo prvič opisali pri bolnikih z AIDS-om, pri katerih je okužba kronična in pogosto smrtno nevarna (Ma in Soave, 1983).

Z razvojem preprostih diagnostičnih metod je postalo jasno, da so kriptosporidiji pogosti povzročitelji driske pri ljudeh (Tzipori, 1983). Pojavljanje številnih epidemij kriptosporidioze, predvsem pa najobsežnejše, ki je leta 1993 prizadela 403 000 ljudi v Milwaukeeju (Mac Kenzie in sod., 1994), je privedlo do spoznanja, da je voda najpogostejši vzrok epidemij te bolezni. Zaradi možnosti prenosa okužbe preko javnega vodovoda in pomanjkanja učinkovitih kemoterapevtskih sredstev za zdravljenje kriptosporidioze je javnozdravstveni pomen kriptosporidijev izjemno narastel (Coombs, 1999; Rose in sod., 2002).

Posledično je narastla tudi potreba po razvoju čim boljših diagnostičnih metod za ugotavljanje okužb s kriptosporidiji. S tradicionalnimi diagnostičnimi metodami lahko le potrdimo ali izključimo okužbo, o virusu le-te pa ne izvemo nič. Leto 1991, ko je Mark Laxer prvič uporabil metodo PCR za ugotavljanje prisotnosti kriptosporidijev, zato predstavlja veliko prelomnico v proučevanju teh praživali (Laxer in sod., 1991). S hitrim razvojem molekularno-bioloških tehnik se je izboljšalo razumevanje taksonomije tega rodu in prenosa vrst oz. genotipov med različnimi vrstami gostiteljev (Morgan in sod., 2000; Xiao in sod., 2000; Xiao in sod., 2001).

2.2 TAKSONOMIJA KRIPTOSPORIDIJEV

V rod *Cryptosporidium* je zaenkrat uvrščenih 20 vrst in več kot 60 genotipov kriptosporidijev s še nerazjasnjenim statusom vrste (Plutzer in Karanis, 2009).

Rod *Cryptosporidium* uvrščamo v deblo Apicomplexa (organizmi iz tega debla imajo apikalni komlepks), razred Sporozoasida (organizmi iz tega razreda se razmnožujejo spolno in nespolno), podrazred Coccidiásina (življenjski krog organizmov iz tega podrazreda obsega merogonijo, gametogonijo in sporogonijo), red Eucoccidiida (življenjski krog organizmov iz tega reda obsega shizogonijo), podred Eimeriina (organizmi z neodvisnim razvojem mikrogamet in makrogamet) in družino Cryptosporidiidae (organizmi s štirimi golimi sporozoiti znotraj oocist) (Levine, 1985).

Značilnosti, ki ločijo rod *Cryptosporidium* od ostalih kokcidijev, so naslednje:

- znotrajcelična, vendar ekstracitoplazemska lokacija znotraj gostiteljske celice (Current in Reese, 1986),
- večmembranski prehranjevalni organel (Thompson in sod., 2005),
- prevladujejo geni brez intronov
- značilna raba kodonov (Karanis in Aldeyarbi, 2011)
- sposobnost avtoinfekcije (Chalmers in sod., 2011)
- odpornost proti protikokidijskim sredstvom (O'Donoghue, 1995)
- navzkrižna reaktivnost protiteles proti kriptosporidijem z antigeni gregarin (Bull in sod., 1998)

Barta in Thompson (2006) se s trenutno veljavno taksonomijo ne strinjata, zato sta predlagala, da bi bilo bolj smiselno rod *Cryptosporidium* uvrstiti v taksonomsko skupino, ločeno od kokcidijev in bližje gregarinam. Ta predlog podpirajo izsledki številnih filogenomskeih analiz (Templeton in sod., 2010; Carreno in sod., 1999; Leander in sod., 2003). Tudi dejstvo, da imajo kriptosporidiji cianid rezistentno alternativno oksidazo, ki je prisotna pri rodu *Ascogregarina* kaže, da je rod *Cryptosporidium* bolj soroden gregarinam in ločen od druge večje gruče organizmov iz debla Apicomplexa, ki obsega tudi kokcidije (Abrahamsen in sod., 2004; Templeton in sod., 2010).

V preteklosti sta veljala dva genotipa vrste *C. parvum* kot edina, ki lahko okužita ljudi. To sta bila humani genotip (genotip I ali H) in bovini genotip (genotip II ali C). Za humani genotip je veljalo, da lahko okuži zgolj ljudi in primati, bovini genotip pa poleg ljudi predvsem domače in nekatere vrste divjih živali (Peng in sod., 1997; Rose in sod., 2002). Na podlagi številnih raziskav, ki so pokazale na precejšnje razlike med obema genotipoma, sta danes genotipa uvrščena v ločeni vrsti – genotip I v vrsto *C. hominis*, genotip II pa v vrsto *C. parvum* (Morgan-Ryan in sod., 2002). Danes tudi vemo, da vrsti *C. hominis* in *C. parvum* nista edini vrsti, ki lahko povzročita okužbe pri ljudeh, sta pa vsekakor najpogostejši povzročiteljici humane kriptosporidioze.

2.3 BIOLOGIJA IN MORFOLOGIJA KRIPTOSPORIDIJEV

Pražival *Cryptosporidium* je obligatni znotrajcelični kokcidijski parazit, ki zajeda v gostiteljskih celicah v predelu zunaj celične citoplazme. Prizadene epitelijske celice gastrointestinalnega, redkeje tudi respiratornega in biliarnega trakta ljudi in živali (Logar, 1999; Logar, 2010; Egyed in sod., 2003).

2.3.1 Metabolizem

Kryptosporidijem manjkajo številne metabolne poti za sintezo nujnih komponent ali pa so te poti močno okrnjene. Gradnike za sintezo nukleinskih kislin, ogljikovodikov, lipidov in proteinov morajo tako pridobiti od gostitelja, zato imajo veliko prenašalcev (Abrahamsen in sod., 2004). Za transport lipidov, sterolov, metabolitov in zdravil imajo okrog 19 prenašalcev, ki so tipa ABC (Zapata in sod., 2002). Imajo vsaj 7 ATPaz tipa P, ki so vključene v prenos kationov, ena izmed njih pa prenaša tudi fosfolipide. Prenašalec težkih kovin specifično veže baker in je povezan s plazemsko membrano (LaGier in sod., 2001), vakuolarna ATPaza tipa V pa prenaša protone (Abrahamsen in sod., 2004).

Glavna pot pridobivanja energije pri kryptosporidijih je glikoliza. Energija se skladišči v obliki polisaharidov (Harris in sod., 2004; Thompson in sod., 2005). Maščobne kisline kryptosporidiji sintetizirajo s pomočjo sintaze maščobnih kislin. Pri *C. parvum* ima to vlogo verjetno sintaza maščobnih kislin tipa I – FAS (Zhu, 2004; Zhu in sod., 2000). Po dosedanjih raziskavah imajo kryptosporidiji le encime, ki omogočajo podaljševanje verig maščobnih kislin, kar nakazuje na to, da celotne sinteze maščobnih kislin verjetno niso sposobni. Tudi purinov in pirimidinov ne morejo sintetizirati sami, kar je splošna lastnost parazitov iz debla Apicomplexa. Biosinteza purinov je odvisna od transporta adenozina, biosinteza pirimidinov pa od transporta nukleotidov (Galazka in sod., 2006). Kryptosporidiji prav tako niso zmožni sinteze aminokislin. Večino jih prevzamejo od gostitelja, pri čemer sodeluje vsaj 11 prenašalcev, nekatere pa lahko pridobijo s pretvorbo prevzetih aminokislin (Abrahamsen in sod., 2004).

2.3.2 Življenjski krog

Življenjski krog kryptosporidijev je monoksen, kar pomeni, da je za njihov spolni in nespolni razvoj potreben le en gostitelj. Skoraj celoten razvoj se odvije znotraj gostiteljevega epitelija, endogeno. Eksogena je le stopnja oociste (Tzipori in Ward, 2002).

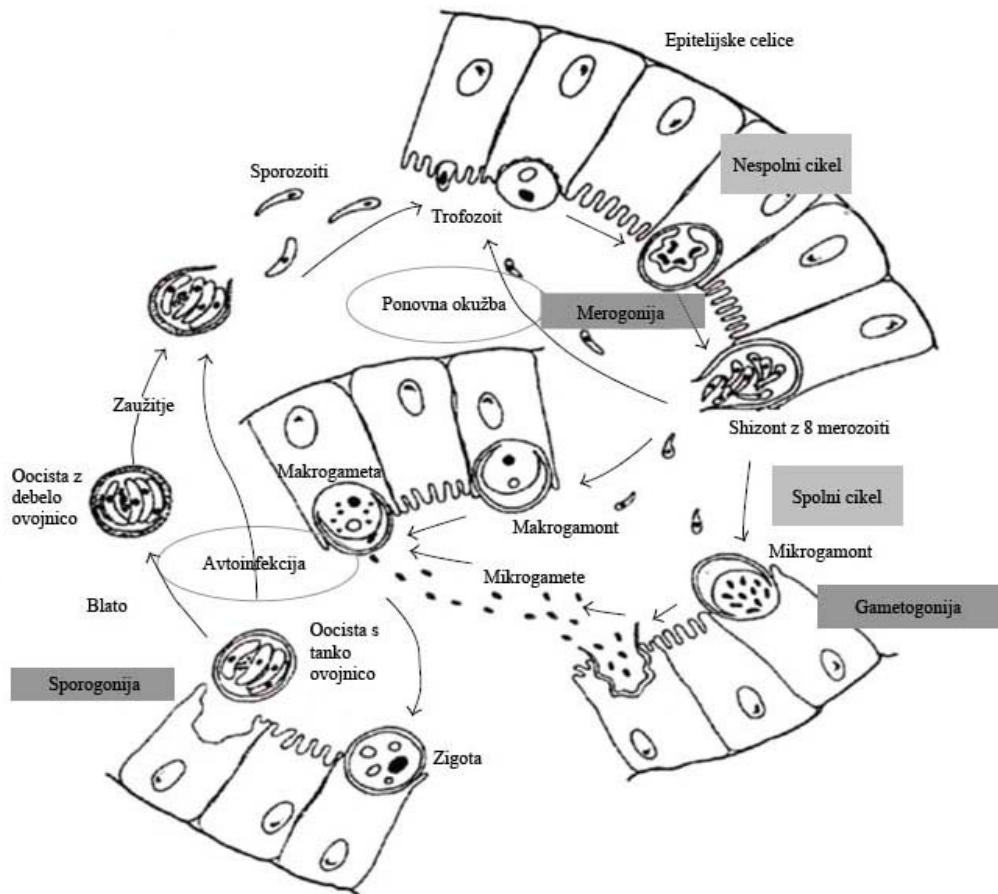
Po zaužitju oocist se na epiteliju gastrointestinalnega, respiratornega ali biliarnega trakta gostitelja iz vsake oociste sprostijo širje sporozoiti, kar poteka skozi šiv vzdolž stene

oocist. Šiv se ob vstopu v gostitelja stopi zaradi sprememb temperature, pH, prisotnosti žolčnih soli in encimov trebušne slinavke (Reduker in sod., 1985). Endogena faza razvoja se prične, ko sproščeni sporozoiti napadejo epitelijske celice, da lahko začnejo svoj nespolni razvoj ali sporogonijo (Fayer in sod., 1997; Tzipori in Widmer, 2000). Sporozoiti se gibajo s krožnim in spiralnim drsenjem in se s sprednjim koncem pritrdijo na luminalno površino epitelijskih celic (Wetzel in sod., 2005; Borowski in sod., 2010). V gostiteljski celici se zaokrožijo v trofozoite, katerih jedra se delijo pri shizogoniji ali merogoniji 1. Nastanejo meronti tipa 1, znotraj katerih je 6-8 merozoitov prve generacije. Zreli merozoiti zapustijo meront in okužijo nove gostiteljske celice. Merogonija 1 se lahko ponovi ali pa se merozoiti prve generacije z merogonijo 2 razvijejo v meronte tipa 2. Slednji vsebujejo štiri merozoite druge generacije (Fayer, 2008; Tzipori in Widmer, 2000).

Po okužbi novih epitelijskih celic z merozoiti druge generacije pride do preobrazbe le-teh v mikrogamonte ali makrogamonte. Mikrogamont lahko vsebuje do 16 jeder in vsako od teh je vključeno v eno mikrogameto. Makrogamont ostane enojedern. Sledi spolno razmnoževanje, pri katerem iz mikrogamonta sproščene mikrogamete vstopijo v citoplazmo makrogamonta (Fayer, 2008). Pri tem nastane zigota, iz katere se po dveh nespolnih delitvah razvije infektivna oocista (Current in Garcia, 1991).

Nastaneta dva tipa oocist s širimi sporozoiti. Približno 20 % nastalih oocist ima tanko, enoslojno ovojnicu, 80 % pa jih ima debelo, dvoslojno ovojnicu. Oociste s tanko ovojnicou se razpočijo že v gostitelju in so sposobne ponovno začeti življenjski cikel (t. i. avtoinfekcija). Poleg ponavljače se merogonije 1 imajo tako pomembno vlogo pri vzdrževanju okužbe v istem gostitelju. Oociste z debelo ovojnicou se izločijo z iztrebki v okolje in lahko okužijo novega gostitelja (Current in Reese, 1986). V okolju preživijo in ohranijo infektivnost več mesecev zaradi odpornosti na zunanje vplive (Rose in Slifko, 1999).

Prepatentno obdobje (t. j. čas od zaužitja oocist do zaključka endogenega razvoja) lahko pri ljudeh traja 4-22 dni, patentno (t. j. obdobje izločanja oocist) pa 1-20 dni (DuPont in sod., 1995).



Slika 1: Življenjski krog *Cryptosporidium* spp. (Putignani in Menichella, 2010)

2.3.3 Zgradba oociste

Oociste različnih vrst kriptosporidijev so gladke, brezbarvne, ovalne do elipsaste oblike (O'Donoghue, 1995). Stena oocist je robustna in je ključ za preživetje parazita zunaj gostitelja (Reduker in sod., 1985). Z disulfidnimi vezmi bogata stena je dvoslojna (Mitschler in sod., 1994). Zunanji sloj sestavljajo kisli glikoproteini (Reduker in sod., 1985). Rigidnost in elastičnost stene oocist omogočata osrednji glikolipidni/lipoproteinski sloj in gost notranji filamentozni sloj iz glikoproteinov (Bonnin in sod., 1991). Na površini oocist so molekule, ki vsebujejo N-acetil-galaktozamin. S temi molekulami se oociste pripnejo na epitelijske celice gostitelja (Stein in sod., 2006).

2.3.4 Mehanizmi pripenjanja in vdora v celico gostitelja

Za parazite iz debla Apicomplexa je značilen apikalni kompleks. To je poseben skupek organelov na sprednjem, koničastem polu parazita, ki obsega roptrij, mikroneme in goste granule (ang. dense granules). Potreben je za vdor in uveljavitev parazita znotraj celice gostitelja (Lumb in sod., 1988; Tetley in sod., 1998).

Pripenjanje kriptosporidijev na gostiteljsko celico se prične z iztezanjem roptrija do mesta pripenjanja. Pri tem se mikroneme in goste granule premaknejo v območje apikalnega konca sporozoita (Huang in sod., 2004). Vakuoli podobne strukture na apikalnem koncu sporozoita se povežejo z membrano sporozoita in membrano gostiteljske celice. Nato pride do fuzije membran. Nastane tunel, ki povezuje parazita z gostiteljsko celico (Lumb in sod., 1988; Huang in sod., 2004). To je začetna stopnja v razvoju posebnega večmembranskega prehranjevalnega organela parazita, ki posreduje selektivni transport hranil ter energije med gostiteljem in parazitom (Thompson in sod., 2005; Barta in Thompson, 2006). Po pritrdirtvji sporozoita se mikrovili gostiteljske celice podaljšajo in obdajo sporozoit. Nastane t.i. parazitoftorna vakuola, ki jo obkroža parazitoftorna vakuolarna membrana. V parazitoftorni vakuoli je parazit ločen od citoplazme gostiteljske celice, kar mu daje prav posebno zaščito (Bonnin in sod., 1999; Umemiya in sod., 2005).

Prepoznavanje celic gostitelja in pripenjanje nanje je odvisno od več dejavnikov. To so: infektivna doza, temperatura, pH, čas inkubacije, divalentni kationi in status diferenciacije gostiteljske celice (Nesterenko in sod., 1997; Joe in sod., 1998). Prisotnost žolčnih soli, temperatura, citoskelet in koncentracija znotrajceličnega kalcija imajo ključno vlogo pri pripenjanju in vstopu sporozoita v gostiteljsko celico, saj spodbujajo izločanje proteinov (Chen in sod., 2004; Feng in sod., 2006). S tem prihaja do depolarizacije membrane sporozoita, povečanja koncentracije kalcija znotraj sporozoita in hitre redukcije virov notranje energije (King in sod., 2009; Matsubayashi in sod., 2010). Sporozoit mora zato čimprej vstopiti v celico gostitelja (Matsubayashi in sod., 2010). Na okužbo s kriptosporidiji epiteljske celice gostitelja odgovorijo s prilagajanjem citoskeleta, kot sta polimerizacija aktina in agregacija vilina (Chen in LaRusso, 2000; Elliott in Clark, 2000).

2.4 GENOM

Genom kriptosporidijev je organiziran v 8 kromosomov različnih dolžin. V primerjavi z genomi ostalih kokcidijev je majhen, saj ima kraje medgenske regije ter manjše število intronov in genov (Abrahamsen, 2001; Abrahamsen in sod., 2004).

Trenutno sta objavljena celotna genoma vrst *C. parvum* (Abrahamsen in sod., 2004) in *C. hominis* (Xu in sod., 2004). Poznan je tudi genom vrste *C. muris*, ki je dostopen v javnih podatkovnih bazah, vendar še ni objavljen (Rider in Zhu, 2010).

Genoma vrst *C. parvum* in *C. hominis* sta homologna in imata enako vsebnost genov (Abrahamsen in sod., 2004; Xu in sod., 2004). Odstotek podobnosti nukleotidnih zaporedij med temi vrstama je 90-95 %. Genoma obeh vrst se razlikuje predvsem v mikrosatelitnih in minisatelitnih regijah (Tanriverdi in sod., 2007). Zaradi visoke podobnosti med genomoma teh dveh parazitov lahko rezultate študij na enem parazitu prenesemo tudi na drugega. V preglednici 1 je prikazana primerjava lastnosti genomov obeh vrst (Xu in sod., 2004).

Preglednica 1: Primerjava genomov vrst *C. parvum* in *C. hominis* (Xu in sod., 2004).

	<i>C. hominis</i>	<i>C. parvum</i>
Velikost genoma (Mbp)	9,16	9,11
Vsebnost GC (%)	31,7	30,3
Kodirajoče regije		
Velikost kodirajoče DNA (Mbp)	6,29	6,80
Vsebnost GC (%)	32,3	31,9
Število genov	3.994	3.952
Povprečna dolžina gena (bp)	1.576	1.720
Odstotek genov z introni (%)	5-20	5
Medgenske regije		
Velikost nekodirajoče DNA (Mbp)	2,87	2,32
Vsebnost GC (%)	30,3	25,6
Število medgenskih regij	4.003	3.960
Povprečna dolžina (bp)	716	585
Geni RNA		
Število genov tRNA	45	45
Število genov 5S rRNA	6	6
Število genov 5,8S, 18S in 28S rRNA	5	5

Za razliko od drugih parazitov iz debla Apicomplexa kryptosporidiji ne vsebujejo mitohondrijskega genoma (Rider in Zhu, 2010). Prav tako pri njih ni prisotnih plastidov (Zhu in sod., 2000).

2.5 EPIDEMIOLOGIJA KRIPTOSPORIDIOZE PRI LJUDEH

Okužbe s kriptosporidijami predstavljajo pomemben javnozdravstveni problem po vsem svetu. Kažejo se v obliki močnih drisk, ki največkrat prizadenejo otroke in osebe z oslabljeno imunostjo (Mak, 2004; Chen in sod., 2002). V razvitih državah najpogosteje obolevajo otroci, stari 1-4 leta, v državah v razvoju pa otroci do drugega leta starosti (Casemore in sod., 1997). Obolenvajo tudi odrasli, zlasti turisti, osebje v vrtcih, begunci in homoseksualci (Marolt-Gomišček in Radšel-Medvešček, 2002).

Okužba je običajno fekalno-oralna. Človek se z infektivnimi oocistami okuži ob zaužitju kontaminirane vode in hrane, pri rekreacijskih aktivnostih v kontaminirani vodi, od okuženega človeka s tesnim kontaktom (npr. bolnišnične okužbe) in od okuženih domačih ali divjih živali (ogrožene so predvsem osebe, ki imajo stik z živalmi) (Koch in sod., 1985).

Praživali iz rodu *Cryptosporidium* najdemo v zemlji, vodi, hrani in na površinah, ki so kontaminirane z iztrebki okuženih živali ali ljudi. Imajo značilnosti, zaradi katerih lahko povzročijo obsežno kontaminacijo okolja. S tem je njihovo širjenje med gostitelji močno olajšano. Te značilnosti so:

- širok spekter gostiteljev, vključno s človekom,
- nizek infektivni odmerek (10-30 oocist),
- izredno veliko število oocist (10^8 - 10^9), ki jih pri enem iztrebljanju izločijo okuženi,
- izločanje oocist tudi do 50 dni po prenehanju driske,
- majhna velikost oocist in njihova odpornost proti neugodnim vplivom okolja,
- odpornost oocist proti razkužilom, ki jih običajno uporabljajo v vodni industriji (Putignani in Menichella, 2010).

Večino okužb pri ljudeh povzročita vrsti *C. hominis* in *C. parvum*, vendar je prevalenca okužbe z eno ali drugo vrsto različna v različnih delih sveta (Raccourt, 2007). Vrsta *C. hominis* pogosteje povzroča okužbe ljudi v Severni in Južni Ameriki, Avstraliji in Afriki, vrsta *C. parvum* pa v Evropi (Caccio, 2005). Poleg omenjenih vrst lahko ljudi okužijo tudi *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. suis* in *C. muris* ter genotipi jelenv, opic, konjev in skunkov (Xiao in sod., 2004; Robinson in sod., 2008). V državah v razvoju je prevalenca okužb s kriptosporidijami višja kot v razvitem svetu. Tam se pogosteje pojavljajo tudi okužbe z vrstami *C. canis*, *C. felis* in *C. meleagridis* (Mak, 2004).

Kriptosporidioza se pojavlja sporadično in epidemično. Čeprav epidemije predstavljajo le 10 % vseh primerov kriptosporidioze, je še zmeraj malo podatkov o vrstah, ki povzročajo sporadične primere (Dietz in sod., 2000). Okužbe so najpogosteje v toplih in vlažnih obdobjih leta, pri nas pozno poleti in zgodaj jeseni, ko lahko obilica padavin povzroči onesnaženje pitne vode s površinsko (Dillingham in sod., 2002; Stantič-Pavlinič in Logar,

1999; Logar, 2010). Največ je hidričnih epidemij in epidemij, povzročenih s hrano, pojavljajo pa se tudi epidemije v vrtcih, v bolnišnicah, domovih za ostarele in na kmetijah.

Izmed vseh epidemij kryptosporidioze, opisanih med leti 1998 in 2008, je bilo kar 56,3 % hidričnih (Putignani in Menichella, 2010). Tovrstnih epidemij je največ v ZDA, Kanadi, Avstraliji in Evropi. Otroci in odrasli se okužijo s kontaminiranimi površinskimi, rekreativnimi ali pitnimi vodami (Karanis in sod., 2007; Smith in sod., 2007). Kar 90 % tovrstnih epidemij se zgodi zaradi rekreativnih voda (v bazenih, v zdraviliščih, rekreativnih parkih), preostalih 10 % pa zaradi kontaminiranih naravnih voda (Karanis in sod., 2007).

Pogoste so epidemije kryptosporidioze zaradi kontaminirane hrane. Po analizi Putignanija in Menichella (2010) je bilo izmed vseh epidemij kryptosporidioze, opisanih med leti 1998 in 2008, kar 21,1 % povzročenih z okuženo hrano. Najpogosteje so v ZDA, Kanadi, Avstraliji in Severni Evropi. Izvor okužb je običajno uživanje solatne zelenjave in sadja, opranega s kontaminirano vodo, ter surovih obrokov. Epidemije lahko sproži tudi uporaba kontaminirane vode za pripravo ledu, zamrznjene hrane ali izdelkov, ki zahtevajo minimalno toplotno obdelavo.

Kryptosporidioza je ena izmed vodilnih oportunističnih okužb pri bolnikih z AIDS-om. Prevalenca kryptosporidioze pri teh bolnikih z drisko je v razvitih državah 3-16 %, odvisno od preiskovane populacije, stopnje imunosupresije in prejemanja antiretrovirusne terapije. Okužba je najpogosteja pri homoseksualcih. V državah v razvoju, kjer je terapija HAART težko dostopna, je stopnja umrljivosti pri bolnikih z AIDS-om zaradi okužb s kryptosporidijami zelo visoka, kar pomembno prispeva k svetovnemu bremenu sporadičnih primerov kryptosporidioze (Rotterdam in Tsang, 1994; Weber in sod., 1999).

Okužbe s kryptosporidijami so v primerjavi z razvitim državami pogosteje v državah v razvoju, kjer sta podhranjenost otrok in prevalenca okužbe s HIV najvišji na svetu. Kryptosporidioza se na teh območjih neobvladljivo širi tudi med odraslimi osebami z normalno imunostjo zaradi slabe higiene, neustreznega odstranjevanja odpadnih voda in uporabe površinskih voda kot glavnega vira pitne vode (Putignani in Menichella, 2010).

V Sloveniji je bilo po podatkih Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije med leti 1996 in 2010 prijavljenih 555 primerov okužbe s kryptosporidijami. Število okužb je z leti močno upadlo in po letu 2002 ne presega 10 primerov na leto. Leta 2000 so poročali o kontaktni epidemiji kryptosporidioze v vrtcu. Na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani so s pomočjo molekularnih metod proučili vrste oz. genotipe kryptosporidijev iz blata 37 slovenskih bolnikov s kryptosporidiozo. Ugotovili so, da večino okužb ljudi v Sloveniji povzroči zoonotska vrsta *C. parvum* (89 %), kar kaže na to, da so pri nas poglaviti vir okužbe človeka okužene živali, predvsem govedo in drobnica. Ugotovili so tudi okužbe z antroponotsko vrsto *C. hominis* in primer okužbe z jelenjim genotipom kryptosporidijev (Šoba, 2009).

2.6 PATOGENEZA IN KLINIČNA SLIKA

Kryptosporidioza se običajno kaže z obilno vodeno drisko. V tekočih iztrebkih je lahko sluz, redkeje tudi kri ali levkociti (Arrowood, 1997). Pogosto in obsežno iztrebljanje lahko vodi do dehidracije in izgube telesne teže (Fayer in sod., 1997). Drisko običajno spremljajo bolečine in krči v trebuhu, rahlo povišana telesna temperatura ($< 39^{\circ}\text{C}$), slabost in bljuvanje. Včasih se pojavljajo tudi glavobol, oslabelost, izčrpanost, bolečine v mišicah in pomanjkanje teka (Fayer in sod., 1986). Inkubacijska doba kryptosporidioze je 1-2 tedna (Leav in sod., 2003).

Resnost in trajanje bolezni sta odvisna od posameznikovega imunskega stanja. Pri osebah z normalno imunostjo traja driska 9-15 dni, redkeje več tednov. Okužba, ki lahko poteka tudi brez bolezenskih znakov, navadno preneha sama od sebe, brez specifičnega zdravljenja (Logar, 1999; Logar, 2010; Chen in sod., 2002). Pri bolnikih z oslabljeno imunostjo, predvsem pri bolnikih z AIDS-om, pa se driska ponavlja več mesecev, kar lahko vodi do dehidracije, podhranjenosti, malabsorpcije, hiranja in celo smrti (Rotterdam in Tsang, 1994). Okužba se lahko pri omenjenih bolnikih širi tudi v izvenčrevesne predele in povzroči vnetje dihalnih poti, jeter, trebušne slinavke, žolčnika, žolčevoda, očesne veznice in sklepov (Fayer in sod., 1997; Montero in sod., 2001). V državah v razvoju so okužbe s kryptosporidijii izjemno pogoste pri majhnih otrocih. Posledica teh okužb sta lahko zaostanek v rasti in počasnejši kognitivni razvoj (Berkman in sod., 2002).

Kryptosporidioza lahko prizadene vse dele gostiteljevega prebavnega trakta, najpogostejša tarča pa je končni del tankega črevesa in slepo črevo (Scaglia in sod., 1994). Pri kronični okužbi se lahko zaradi vnetja zmanjša absorpcijska površina črevesnih resic, kripte se podaljšajo in v lamini proprii se pojavijo vnetni infiltrati. Zaradi tega se spremeni prepustnost črevesa. Zmanjša se absorpcija tekočin, elektrolitov in hranil, kar imenujemo sindrom malabsorpcije (Chen in sod., 2002). Pri bolnikih z AIDS-om je pogosta tudi malabsorpcija žolčnih kislin in vitamina B12 (Bjarnason in sod., 1996). Kryptosporidiji spodbujajo apoptozo sosednjih, neokuženih epitelijskih celic in hkrati inhibirajo apoptozo okuženih celic. Na ta način si podaljšujejo preživetje znotraj gostitelja (Chen in sod., 2001).

2.7 IMUNSKI ODZIV

Imunski odgovor na okužbo s kryptosporidijii je slabo poznan. Vedenje o njem večinoma temelji na raziskavah, izvedenih na celičnih kulturah *in vitro*. Pri imunskemu odzivu sodelujejo tako komponente prirojenega kot tudi pridobljenega imunskega odziva.

2.7.1 Prirojen imunski odziv

Toll-u podobni receptorji (ang. TLR – Toll-like receptor) so skupina ohranjenih molekul, pomembnih pri vzpostavitev odpornosti proti širokemu spektru patogenih organizmov, ker prepoznavajo specifične molekulske motive patogenov (ang. PAMP – pathogen-associated molecular pattern). Večina TLR-jev signalizira preko adapterskega proteina MyD88, ki je vključen v spodbujanje različnih poti naravnega imunskega odziva. Signalna pot, ki poteka preko MyD88, sproži aktivacijo transkripcjskega faktorja NF- κ B, nastanek vnetnih citokinov in tako začetek gostiteljevega imunskega odziva. Raziskave kažejo, da vrsta *C. parvum* spodbuja kopičenje TLR2 in TLR4 na mestu okužbe (Borad in Ward, 2010).

Protimikrobni peptidi (ang. AMP – antimicrobial peptide) so efektorji prirojenega imunskega odziva v črevesni sluznici. Izločajo jih epitelijalne celice ljudi. Znano je, da pride na začetku okužbe epitelijalnih celic z vrsto *C. parvum* do znižanja koncentracije β -defenzinov (ang. HBD – human beta-defensin), ki so podvrsta AMP. Na ta način si parazit verjetno olajša preživetje.

Lektin, ki veže manan (ang. MBL – mannose-binding lectin) je visoko ohranjena sestavina prirojenega imunskega odziva. Veže ostanke specifičnih ogljikovodikov različnih patogenih organizmov, med drugim tudi kriptosporidijev. Z vezavo aktivira lektinsko pot aktivacije komplementnega sistema in tako spodbuja opsonizacijo in fagocitozo. Posledica aktivacije komplementnega sistema je tudi nastanek kompleksa, ki napade membrano parazita.

Kemokini so skupina majhnih proteinovskih molekul, ki jih proizvajajo epitelijalne celice. Spodbujajo kemotaksno vnetnih celic in aktivacijo levkocitov. Ob okužbi epitelijalnih celic z vrsto *C. parvum* se poviša izražanje interlevkina 8 (IL-8) (Borad in Ward, 2010).

Citokini so proteini, ki uravnavajo prirojen in pridobljen imunski odziv. Ključni citokin pri obeh oblikah imunskega odziva je interferon gama (IFN- γ), ki prepreči vdor parazita v celico z aktivacijo signalizacijske poti JAK/STAT ali s spremembjo koncentracije ionov Fe $^{2+}$ znotraj celice gostitelja. Skupaj z IFN- γ se ob okužbi s kriptosporidijami pojavlja tudi interlevkin 4 (IL-4). Velik pomen pri imunskemu odzivu ima tudi IL-15, ki spodbuja aktivnost naravnih celic ubijalk, da uničijo s kriptosporidijami okužene celice. IFN- γ je torej ključen pri posredovanju spominskega T-celičnega imunskega odziva ob ponovni okužbi, IL-15 pa pri aktivaciji zgodnjega imunskega odziva. Dejavnik tumorske nekroze α (TNF- α), ki sodeluje pri novačenju vnetnih celic na sluznico črevesa, in IL-1 β spodbujata nastajanje prostaglandinov. IL-10 preprečuje sintezo vnetnih citokinov in s tem vnetni in imunski odgovor gostitelja. Skupaj s transformirajočim rastnim faktorjem beta (TGF- β), ki omejuje vnetje in omogoča popravljanje zaradi okužbe poškodovanih epitelijalnih celic, sta tako morda ključna dejavnika pri obnavljanju epitelia po kriptosporidiozi (Pantenburg in sod., 2008; Borad in Ward, 2010).

Prostaglandini so lipidne molekule, ki zmanjšujejo izražanje vnetnih citokinov. Spodbujajo nastajanje β -defenzinov in mucina, ki ovira pripenjanje kriptosporidijev na sluznico črevesa. K patogenezi driske prispevajo s spremenjanjem absorpcije ionov Cl^- in izločanjem tekočine iz celic. Pri okužbi črevesnega epitelija s *C. parvum* se aktivira izražanje prostaglandin H-sintaze 2 ter poveča sinteza prostaglandina E2 in prostaglandina F2- α .

Substanca P je nevropeptid v prebavnem traktu, ki spodbuja nastajanje vnetnih citokinov. Sproža izločanje ionov Cl^- in je tako pomemben dejavnik pri driski (Pantenburg in sod., 2008; Borad in Ward, 2010).

2.7.2 Pridobljen imunski odziv

Povečana dovzetnost bolnikov z oslabljenim imunskim odzivom za okužbe s kriptosporidiji in premostitev kriptosporidioze po izboljšanju imunskega stanja kažeta na ključno vlogo celic CD4+ pri zaščiti pred kriptosporidiozo. Bolniki z manj kot 50 celicami T CD4+ v mililitru krvi imajo pogosteje fulminantno obliko bolezni, medtem ko imajo osebe s 180 ali več celicami T CD4+ v mililitru krvi blažjo obliko bolezni, ki izzveni sama. Imunski odgovor je v veliki meri uravnan z IFN- γ in poteče s pomočjo molekul MHC II, ki predstavijo antigene kriptosporidijev na površini antigen predstavitevnih celic. Antigene prepoznačajo celice T pomagalke (CD4+) in sproži se specifičen T-celični odziv. Vloga citotoksičnih limfocitov T (CD8+) še ni razjasnjena.

Vloga humoralnega imunskega odziva pri okužbi s kriptosporidiji še ni dognana. Ob okužbi s kriptosporidiji se tvorijo specifična serumska protitelesa IgG, IgM in IgA ter sekretorna protitelesa IgA. Sekretorna protitelesa IgA so prisotna v blatu odraslih še več kot 6 tednov po okužbi. Serumska protitelesa so običajno usmerjena proti topnim ali z membrano povezanim proteinom sporozoitov. Rezultati številnih raziskav kažejo, da so posamezniki z že prisotnimi, za kriptosporidije specifičnimi protitelesi delno zaščiteni in imajo blažje simptome pri ponovni okužbi s kriptosporidiji (Pantenburg in sod., 2008; Borad in Ward, 2010).

2.8 ZDRAVLJENJE KRIPTOSPORIDIOZE

Pri osebah z normalno imunostjo simptomi kriptosporidioze običajno sami od sebe ponehajo v manj kot dveh tednih, zato zdravljenje ni potrebno. V primeru močne vodene driske je zdravljenje simptomatsko. Potrebno je nadomestiti tekočino in elektrolite, v primeru močne malabsorpcije pa tudi hranila. Pri bolnikih s pomanjkljivo imunostjo se bolezensko stanje izboljša le, če se njihov imunski sistem obnovi (po prenehanju jemanja

raznih imunosupresivnih sredstev, antiretrovirusna terapija pri bolnikih z AIDS-om). S strani FDA je nitazoksanid edini odobren kemoterapeutik za zdravljenje kryptosporidioze, a le pri otrocih in odraslih z normalno imunostjo (Logar, 1999; Logar, 2010; Rossignol, 2010). Sicer k izboljšanju bolezenskega stanja pripomorejo tudi azitromicin, paromomicin, sinefungin, roksitromicin, vendar noben kemoterapeutik okužbe ne zatre v celoti (Blagburn in Soave, 1997; Rossignol, 2010). Različnost razvojnih stopenj parazita in edinstvena lokacija parazita v gostitelju otežuje razvoj zdravila, ki bi bilo uspešno pri zdravljenju kryptosporidioze.

Številne raziskave so usmerjene v razvoj cepiv proti kryptosporidiozi, saj je lahko cepivo najzanesljivejši in najcenejši način za zagotovitev splošnega nadzora nad okužbami s kryptosporidijami. Za namene aktivne in pasivne imunizacije preizkušajo različne površinske glikoproteine oocist in sporozoitov, ki sodelujejo pri okužbi epitelijskih celic gostitelja (TRAP-C1, CSL, proteine površine oocist in sporozoitov) (Burton in sod., 2010; Yu in sod., 2010; Liu in sod., 2010; Jenkins, 2004). Raziskovalci proučujejo tudi uspešnost DNA cepiv. Obstajajo dokazi, da DNA cepivo, ki sproži izražanje površinskih beljakovin *C. parvum*, izzove specifični celični in protitelesni odgovor na okužbo s *C. parvum* (Hong-Xuan, 2005; Benitez in sod., 2009). Kljub številnim raziskavam pa danes popolni nadzor nad boleznijo še ni mogoč. Potrebne so nadaljnje raziskave v smeri razvoja načinov pasivne imunizacije bolnikov s pomanjkljivo imunostjo in novorojencev ter aktivne imunizacije oseb z normalno imunostjo (Boulter-Bitzer, 2007).

2.9 PREPREČEVANJE KRIPTOSPORIDIOZE

Okužbe s kryptosporidijami preprečujemo s tem, da pazimo na čistočo in osebno higieno, predvsem po stiku z domačimi in divjimi živalmi, ki predstavljajo najpomembnejši rezervoar teh patogenov (Logar, 1999; Logar, 2010; Pozio, 2008). Potrebna je tudi previdnost pri pripravi hrane. Sadje in zelenjavu je potrebno dobro oprati v neoporečni vodi ter hrano ustrezno toplotno obdelati (Marolt-Gomišček in Radšel-Medvešček, 2002). Oociste uniči zamrzovanje in segrevanje pri temperaturi 72 °C 1 minuto oz. pri temperaturi 45 °C 10-20 minut (Steiner in sod., 1997).

Iz vode, ki je vzrok številnih epidemij kryptosporidioze, odstranimo oociste s filtriranjem preko filtrov z reverzno osmozo in filtrov premera 1 µm ali jih uničimo s prekuhanjem (vsaj 1 minuto). Oociste so odporne na številna dezinfekcijska sredstva, kot so klor ali monokloramin, uniči pa jih natrijev hipoklorit, 5 % amonijak in 10 % formalin (Korich in sod., 1990; Logar, 1999; Logar, 2010).

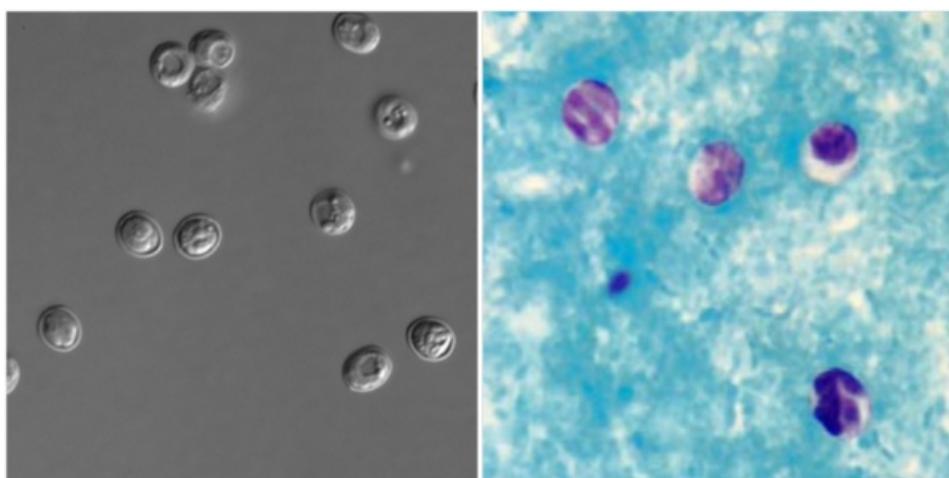
2.10 DIAGNOSTIKA KRIPTOSPORIDIOZE

2.10.1 Metode barvanja

Laboratorijska diagnostika kriptosporidioze je včasih temeljila na svetlobni ali elektronski mikroskopiji bioptičnega materiala črevesa, obarvanega z različnimi barvili (Lefkowitch in sod., 1984). Danes klasične metode dokazovanja oocist temeljijo predvsem na mikroskopskem pregledu obarvanih razmazov blata (O'Donoghue, 1995), saj so lažje izvedljive in zanesljivejše od črevesne biopsije (Logar, 1999; Logar, 2010).

Oociste v blatu lahko pred barvanjem skoncentriramo z naplavljanjem s cinkovim sulfatom ali z naplavno metodo po Sheatherju, lahko pa jih zgostimo s formalin-etyl acetatom, le da jih v tem primeru iščemo v usedlini in ne v naplavu (Logar, 1999; Logar 2010; Petry, 2000). V uporabi so različne tehnike barvanja – barvanje z dimetil sulfoksid-karbol fuksinom (Pohjola in sod., 1984), s safranin-metilenskim modrilm (Baxby in sod., 1984), z metodo po Kinyounu (Ma in Soave, 1983) in z nekoliko spremenjeno metodo po Ziehl-Neelsenu (Henriksen in Pohlenz, 1981). Oociste kriptosporidijev, velike 4-6 µm, se s temi tehnikami obarvajo rožnato ali rdeče in so tako dobro ločene od modrega ali zelenega ozadja. Te metode so učinkovite, a dolgotrajne in imajo nizko specifičnost in/ali občutljivost, predvsem pri vzorcih z manjšim številom oocist (Quílez in sod., 1996; Morgan in sod., 1998; Clark, 1999).

Poleg omenjenih so opisane tehnike negativnega barvanja, pri katerih se obarva ozadje razmaza, kriptosporidiji pa ne (Chichino in sod., 1991; Elliot in sod., 1999). Izvedba teh barvanj je precej dolgotrajna in zahteva izkušeno laboratorijsko osebje (Fayer in sod., 2000).



Slika 2: Prikaz neobarvanega in z nekoliko spremenjenim barvanjem po Ziehl-Neelsenu obarvanega preparata oocist kriptosporidijev (CDC, 2012a; CDC, 2012b)

2.10.2 Dokazovanje antigenov kriptosporidijev z imunodiagnostičnimi metodami

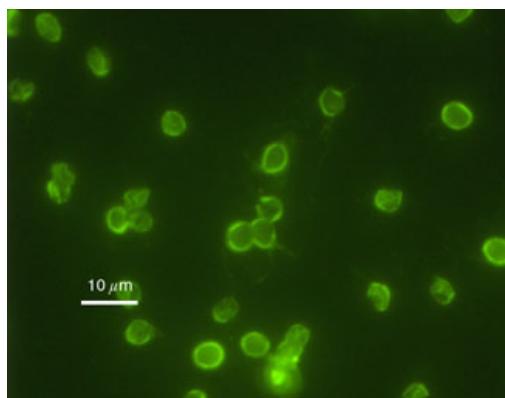
Prednosti imunodiagnostičnih metod pred metodami barvanja so predvsem v tem, da ne zahtevajo izkušenega laboratorijskega osebja, so bolj specifične in občutljivejše v primerjavi z metodami barvanja. Iz tega vidika so zanesljivejša izbira predvsem za laboratorije, kjer se redkeje srečujejo s primeri kriptosporidioze (Petry, 2000).

Od imunodiagnostičnih testov so največ v uporabi komercialno dostopni neposredni imunofluorescenčni testi in neposredni encimski imunski testi (Johnston in sod., 2003). Priročni so tudi imunokromatografski testi za dokazovanje antigenov kriptosporidijev, pri katerih vzorec potuje po membrani z vezanimi protitelesi, usmerjenimi proti antigenom kriptosporidijev, in se nanje veže. Prednost teh testov pred metodami barvanja in ostalimi omenjenimi imunodiagnostičnimi testi je njihova hitra izvedba. Alternativni metodi za dokazovanje kriptosporidijev sta lateksna aglutinacija in reverzna pasivna hemaglutinacija. Občutljivost lateksne aglutinacije je izredno visoka, in sicer 1 oocista na mililiter vzorca (Tee in sod., 1993). Občutljivost reverzne pasivne hemaglutinacije je 93,9 %, specifičnost pa 98,2 % (Farrington in sod., 1994).

2.10.2.1 Neposredni imunofluorescenčni testi

Neposredni imunofluorescenčni testi (DIF) temeljijo na specifični vezavi monoklonskih protiteles z antigeni, ki jih dokazujemo v vzorcu. Protiteesa so označena s fluorokromi, zato intenzivno fluorescirajo. Barva fluorescenčne svetlobe je odvisna od uporabljenega barvila. Najpogosteje uporabljeni barvili sta fluoresceinov izotiocianat (zelena fluorescencija) in rodaminov izotiocianat (rdeča fluorescencija) (Vozelj, 1996). Na preparatu, ki ga opazujemo s fluorescenčnim mikroskopom, so vidni antigeni z vezanimi protitelesi, ki fluorescirajo na temnem ozadju (Dragaš, 1998).

Neposredni imunofluorescenčni testi za ugotavljanje prisotnosti kriptosporidijev v kužnini so zaradi lažjega in hitrejšega odčitavanja rezultatov ter večje občutljivosti in specifičnosti zanesljivejši od barvanja (Kehl in sod., 1995; Zimmerman in Needham, 1995). Občutljivost komercialno dostopnih testov, ki temeljijo na neposredni imunofluorescenci, se giblje med 94,5 in 100 %, njihova specifičnost pa je 100 % (Petry, 2000).



Slika 3: Oociste *Cryptosporidium* spp. pod fluorescenčnim mikroskopom (EPA, 2012)

2.10.2.2 Neposredni encimski imunski testi

Neposredni encimski imunski testi (ELISA) so biokemijske metode, ki se uporabljajo za določevanje antigenov v vzorcu. Temeljijo na specifični interakciji antigen – protitelo. Poznamo različne izvedbe testov ELISA, a pri določevanju antigenov kryptosporidijev v blatu se običajno uporablja neposredni sendvič test ELISA. Test izvedemo na mikrotitrski ploščici, ki je prekrita s protitelesi, usmerjenimi proti antigenom kryptosporidijev. Na ta lovilna protitelesa se vežejo antigeni kryptosporidijev iz preiskovanega vzorca. Temu sledi dodatek z encimi (običajno hrenovo peroksidazo) označenih protiteles, usmerjenih proti antigenom kryptosporidijev. Intenziteto barvne reakcije, ki poteče po dodatku substrata, določamo spektrofotometrično. Glede na intenziteto signala pozitivne in negativne kontrole vzorec opredelimo kot reaktivni ali nereaktivni (Petry, 2000).

Občutljivost komercialno dostopnih testov ELISA za določanje antigenov kryptosporidijev v blatu je primerljiva z občutljivostjo DIF, medtem ko je njihova specifičnost nižja (90,3-100 %). Glavna prednost testov ELISA je enostavna razlaga rezultatov (Petry, 2000). Testi ELISA omogočajo tudi sočasno testiranje večjega števila vzorcev in objektivno določitev rezultatov s spektrofotometrom, medtem ko je pri mikroskopiji določitev bolj subjektivna. Slaba stran teh testov je, da ne omogočajo ločevanja lažno pozitivnih rezultatov od resnično pozitivnih, kar pa je značilno za metode barvanja in DIF (Johnston in sod., 2003).

2.10.3 Serološke metode

Serološke metode pri diagnostiki kryptosporidioze nimajo večjega pomena. Uporabljajo jih predvsem za epidemiološke raziskave. Za določanje specifičnih protiteles proti kryptosporidiju se uporablja zlasti testi ELISA (Hill in sod., 1990). Razviti sta tudi

metodi Western blot in dot blot, vendar zaenkrat komercialnih testov za splošno uporabo, ki bi temeljili na teh dveh metodah, še ni na voljo (Shayan in sod., 2008).

S serološkimi testi dokazujemo v serumu ljudi prisotnost protiteles IgM in IgG, usmerjenih proti antigenom kriptosporidijev. Na podlagi le-teh lahko ločimo osebe z domnevno aktivno ali nedavno okužbo (IgM in IgG) in osebe s preteklo okužbo (le IgG) (Ungar in sod., 1989). Serološke preiskave potekajo predvsem z dvema skupina antigenov – skupino od 15 do 17 kDa in skupino 27 kDa velikih antigenov. Serološki odgovor na ti dve skupini antigenov je specifičen za okužbe s kriptosporidijii in doseže vrh 4-6 tednov po okužbi (Moss in sod., 1998; Frost in sod., 2000; Muller in sod., 2001). Koncentracija protiteles proti 15-17 kDa velikemu antigenu upade 4-6 mesecev po okužbi, medtem ko koncentracija protiteles proti 27 kDa velikemu antigenu ostane povišana 6-12 mesecev (Muller in sod., 2001).

2.10.4 Molekularno biološke metode

Uporaba molekularno bioloških metod, predvsem verižne reakcije s polimerazo (PCR), je znatno izboljšala razumevanje epidemiologije, taksonomije in biologije kriptosporidijev, ključno vlogo pa imajo te metode tudi v diagnostiki kriptosporidioze (Godiwala in sod., 2006).

Metoda PCR je visoko občutljiva in specifična. Glavna prednost PCR pred ostalimi načini diagnostike kriptosporidioze je zmožnost ločevanja med vrstami in genotipi kriptosporidijev, kar omogoča epidemiološko spremljanje in posledično preprečevanje širjenja te bolezni (Casemore in sod., 1985, Pedraza-Diaz in sod., 2000).

Kljub omenjenim prednostim se PCR redko uporablja v rutinski diagnostiki kriptosporidioze. Predvsem zaradi visoke cene je njena uporaba omejena na raziskovalne in referenčne diagnostične laboratorije (Xiao, 2010). Vpeljavo PCR v vsakodnevno laboratorijsko diagnostiko kriptosporidioze ovirajo tudi dokaj dolgotrajne metode osamitve parazitske DNA iz vzorcev blata in prisotnost inhibitorjev v takšnih vzorcih, čeprav so v zadnjih letih metode osamitve že precej izboljšali in poenostavili (Verweij in sod., 2001; ten Hove in sod., 2007).

2.10.4.1 Teoretične osnove verižne reakcije s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda, s katero lahko v kratkem času *in vitro* pomnožimo določen odsek DNA v velikem številu kopij (Poljak in sod., 1994). Temelji na ponavljanju temperaturnih ciklov. Vsak cikel obsega denaturacijo dvoverižne DNA,

pripenjanje para začetnih oligonukleotidov in izgradnjo komplementarne DNA na območju med njima, za kar se najpogosteje uporablja temperaturno odporna *Taq* DNA-polimeraza. Za uspešno pomnoževanje je potrebna reakcijska mešanica, ki poleg tarčne DNA vsebuje termostabilno DNA-polimerazo, deoksinukleotid trifosfate (dGTP, dATP, dCTP, dUTP), ione Mg^{2+} , reakcijski pufer in par oligonukleotidnih začetnikov (Herzog-Velikonja in Gruden, 2008).

Število PCR-pridelkov tekom reakcije pomnoževanja eksponentno narašča. Eksponentni fazi reakcije sledi plato, ko pride do zasičenja reakcije in se število PCR-pridelkov ne povečuje več (Innis in Gelfand, 1990). Dokazovanje PCR-pridelkov običajno temelji na uporabi gelske elektroforeze (Valasek in Repa, 2005).

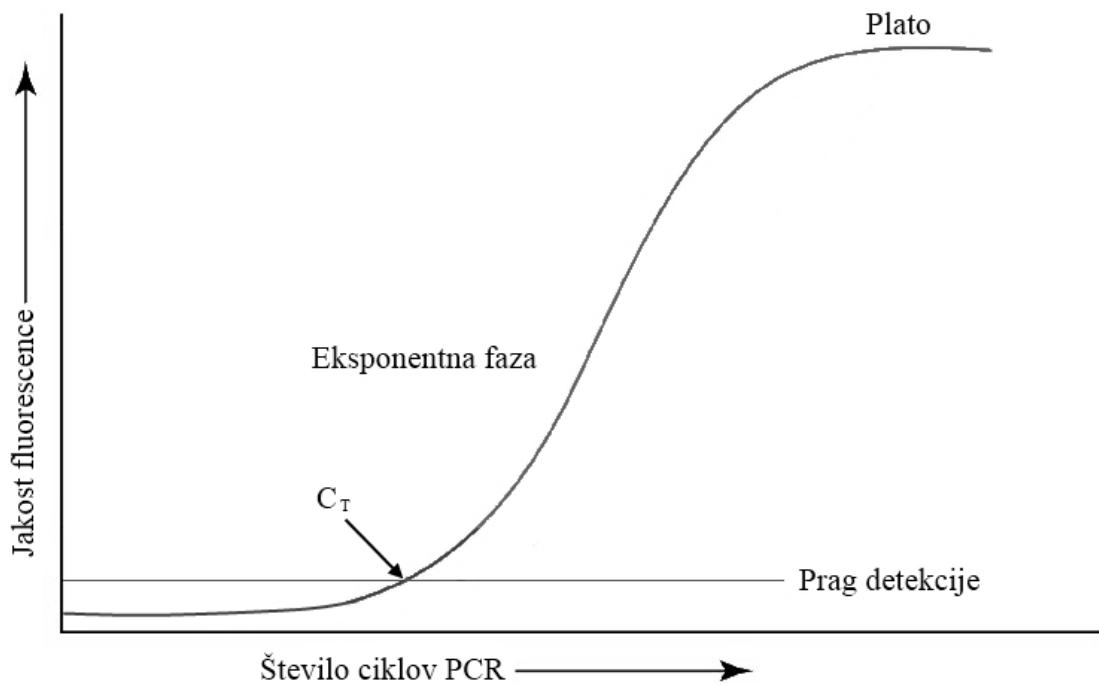
2.10.4.2 Teoretične osnove PCR v realnem času

PCR v realnem času je izboljšana različica klasične PCR, ki omogoča že tekom reakcije same sledenje pomnoževanja DNA v zaprtem sistemu, kar znatno zmanjša možnost pojava kontaminacije. Metoda je izredno občutljiva in hitra ter olajša kvantifikacijo. Pomanjkljivost metode so visoki začetni stroški in nezmožnost določevanja velikosti PCR-pridelkov. Za le-to je ob koncu reakcije vendarle potrebno odpreti sistem, v katerem je reakcija potekla (Mackay, 2004). Z razvojem multiple PCR v realnem času, s katero lahko hkrati pomnožujemo več različnih tarčnih odsekov DNA, so se znižali stroški in skrajšal čas dela (Verweij in sod., 2004).

Tekom PCR v realnem času dokazujemo PCR-pridelke s fluorescenčnimi barvili, ki se nespecifično vgradijo v nastajajoče dvoverižno DNA, ali s fluorescenčnimi barvili označenimi začetnimi oligonukleotidi ali sondami, ki so komplementarni delu tarčnega zaporedja med obema začetnima oligonukleotidoma. Najpogosteje se uporabljo oligonukleotidne sonde, označene s fluoroforom, med njimi hibridizacijske in TaqMan sonde. Hibridizacijska in TaqMan sonda imata podoben način delovanja. Obe se vežeta s specifičnim delom tarčnega zaporedja in sta na enem koncu označeni s fluoroforom (donor svetlobne energije), na drugem koncu pa s sprejemnikom energije (dušilec). Kadar sta fluorofor in dušilec v neposredni bližini, je svetloba fluorofora utišana. Za hibridizacijsko sondu je značilno, da je sestavljena iz dveh fizično ločenih delov, ki se na tarčno zaporedje vežeta eden za drugim. Vsak del hibridizacijske sonde vsebuje enega od označevalcev. Sonda TaqMan je označena s fluoroforom na 5' koncu in dušilcem na 3' koncu. Ko sta fluorofor in dušilec blizu skupaj, fluorofor prejeto svetlobno energijo oddaja v obliki fluorescence, to pa sprejme dušilec in jo odda v obliki toplote. Fluorescence torej ne zaznamo. Vezano sondo med reakcijo podaljševanja verige tarčnega odseka DNA doseže *Taq* DNA-polimeraza in jo s svojo 5' proti 3' eksonukleazno aktivnostjo razcepi ter s tem loči fluorofor od dušilca. Dušilec ne more več utišati svetlobe fluorofora, zato fluorescenco

zaznamo. Intenziteta fluorescenčnega signala je sorazmerna količini razgrajene sonde, ta pa količini tarčne DNA v vzorcu (Mackay, 2004).

Večanje količine PCR-pridelka in s tem intenzitete fluorescenčnega signala spremljamo z računalniškim programom, ki izrisuje sigmoidno krivuljo. Cikel, v katerem zaznamo pomnoževanje tarčnega zaporedja, imenujemo C_T (ang. cycle threshold). Dosežen je, ko je presežena fluorescensa ozadja. Nastajanje PCR-pridelka merimo v eksponentni ali linearni fazi, ko je jakost fluorescence sorazmerna količini izhodiščnega materiala. Vrednost C_T je obratno sorazmerna količini tarčne DNA v vzorcu. Torej, nižja kot je začetna količina tarčne DNA v vzorcu, višja bo vrednost C_T (Mackay, 2004; Valasek in Repa, 2005).



Slika 4: Prikaz krivulje pomnoževanja DNA tekom PCR

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci

V diplomsko delo smo vključili vzorce blata bolnikov, obolelih za gastroenteritisom, ki so jih v preiskavo na patogene parazite prejeli v Laboratorij za parazitologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Vzorce smo zbirali redno od 5. junija 2010 do 25. novembra 2010. V tem času smo zbrali 131 vzorcev blata bolnikov iz različnih delov Slovenije in jih do obdelave hranili pri temperaturi +4 °C. Podatki o bolnikih so zbrani v Prilogi A.

Poleg omenjenih smo v raziskavo vključili dodatnih 21 vzorcev blata, v katerih so v Laboratoriju za parazitologijo že predhodno ugotovili prisotnost oocist kriptosporidijev. Iz teh vzorcev blata so v Laboratoriju za parazitologijo osamili DNA in jo do obdelave hranili pri temperaturi -20 °C.

3.1.2 Materiali in reagenti za neposredni imunofluorescenčni test Merifluor® *Cryptosporidium/Giardia* (Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, Ohio, ZDA)

- detekcijski reagent – s fluorescenčnim barvilom FITC označena monoklonska protitelesa proti antigenom stene oocist kriptosporidijev in cist giardij
- pozitivna kontrola – v formalinu konzerviran pripravek blata, ki vsebuje oociste kriptosporidijev in ciste giardij
- negativna kontrola – v formalinu konzerviran pripravek blata, ki ne vsebuje oocist kriptosporidijev ali cist giardij
- namestitveno sredstvo – mešanica glicerolnega pufra s formalinom, sredstva proti izsuševanju in 0,05 % natrijevega azida
- kontrastno barvilo – raztopina eriokrom črnega
- 20-krat koncentriran pufer za spiranje
- predmetna stekelca s tremi krožnimi polji
- plastična zanka ali eza

3.1.3 Materiali in reagenti za osamitev DNA iz vzorcev blata s komercialnim kompletom reagentov QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hamburg, Nemčija)

- pufer za lizo ASL
- pufer za lizo AL
- pufer za spiranje AW1
- pufer za spiranje AW2
- elucijski pufer AE
- encim proteinaza K
- tabletke InhibitEX
- epruvetke z membrano
- zbiralne epruvetke

3.1.4 Materiali in reagenti za PCR v realnem času za ugotavljanje prisotnosti DNA kryptosporidijev

- sterilna voda brez nukleazne aktivnosti (Qiagen, Hamburg, Nemčija)
- reakcijska mešanica Platinum® Quantitative PCR SuperMix – UDG with ROX (Invitrogen, Kalifornija, ZDA)
- oligonukleotidi za pomnoževanje dela gena za 18S rRNA kryptosporidijev (TIB Molbiol, Berlin, Nemčija), (Jothikumar in sod., 2008)
 - pozitivno usmerjen začetni oligonukleotid JVAF:
5'-ATGACGGGTAACGGGAAAT-3'
 - negativno usmerjen začetni oligonukleotid JVAR:
5'-CCAATTACAAAACCAAAAAGTCC-3'
 - sonda JVAP18S: 5'-YAK-CGCGCCTGCTGCCTCCTTAGATG-BHQ2-3'
- oligonukleotidi, specifični za vrsto *C. parvum* (TIB Molbiol, Berlin, Nemčija), (Jothikumar in sod., 2008)
 - pozitivno usmerjen začetni oligonukleotid JVAGF:
5'-ACTTTTGTTGTTACGCCG-3'
 - negativno usmerjen začetni oligonukleotid JVAGR:
5'-AATGTGGTAGTTGCGGTTGAA-3'
 - sonda JVAGP2: 5'-6FAM-ATTATCTCTCGTAGCGGCG-BHQ1-3'
- pozitivna kontrola (DNA, osamljena iz vzorca blata, v katerem so v Laboratoriju za parazitologijo predhodno potrdili prisotnost oocist vrste *C. parvum*)
- negativna kontrola (sterilna voda brez nukleazne aktivnosti)

3.1.5 Materiali in reagenti za PCR v realnem času za ugotavljanje prisotnosti DNA interne kontrole

- sterilna voda brez nukleazne aktivnosti (Qiagen, Hamburg, Nemčija)
- reakcijska mešanica Platinum® Quantitative PCR SuperMix – UDG with ROX (Invitrogen, Kalifornija, ZDA)
- oligonukleotidi (TIB Molbiol, Berlin, Nemčija):
 - pozitivno usmerjen začetni oligonukleotid:
5'-CTGATTTTCTTCGCGAGTTT-3'
 - negativno usmerjen začetni oligonukleotid:
3'-TCAAGTAACAACCGCGAAAAAG-5'
 - sonda: 5'-VIC-AGACCTTCGGTACTTCGTCCACAAACACAA-BHQ1-3' (Metabion, Martinsried, Nemčija)
- pozitivna kontrola (DNA interne kontrole)
- negativna kontrola (sterilna voda brez nukleazne aktivnosti)

3.1.6 Materiali in reagenti za analizo pridelkov PCR z agarozno gelsko elektroforezo

- agaraza v prahu (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA)
- pufer TAE
- etidijev bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA)
- nanašalni pufer (MBI Fermentas, Hanover, Maryland, ZDA)
- velikostni standard lestvice 50 bp (Roche, Basel, Švica)
- steklena čaša
- kalup z elektroforeznimi glavnički
- elektroforezna kadička

3.1.7 Laboratorijska oprema

- fluorescenčni mikroskop s filtrom 450 do 490 nm (Nikon ECLIPSE E600, Nikon, Tokyo, Japonska)
- aparat StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA)
- vibracijsko mešalo (Fischer Scientific Top Mix FB15024, Fischer Scientific, Nepean Ontario, Kanada)
- namizna centrifuga (Eppendorf Mini Spin, Centrifuge S424, Centrifuge 5430R, Eppendorf, Hamburg, Nemčija)

- brezprašna komora za varno in sterilno delo (Iskra PIO, LFV 9, Iskra, Šentjernej, Slovenija)
- plinski gorilnik (Fireboy Plus, Integra Bioscience, Chur, Švica)
- avtomatske pipete (območje pipetiranja: 0,2-0,5 µl, 0,5-10µl, 10-100 µl, 50-200 µl, 100-1000 µl, 1000-5000 µl, Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- toplotni stresalnik za segrevanje do 95 °C in do 70 °C
- ultravijolični presvetljevalnik (Gel Doc, Biocompare, ZDA)
- laboratorijska tehnica
- napajalnik za elektroforezo
- mikrovalovna pečica
- vlažna komora
- ledeni blok
- plastično stojalo za epruvete
- škatla za shranjevanje preparatov
- zbiralniki za odpadke

3.1.8 Potrošni material

- sterilne plastične epruvetke (0,2 ml, 1,5 ml in 2 ml)
- sterilni nastavki s filtri za avtomatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- Pasteurjeve pipete
- steklene palčke
- krovna stekelca
- destilirana voda
- fiziološka raztopina
- etanol (96-100 %)
- staničevina
- zaščitne rokavice

3.2 METODE

3.2.1 Neposredni imunofluorescenčni test Merifluor® *Cryptosporidium/Giardia*

Razmaze vzorcev blata bolnikov, obolelih za gastroenteritom, smo pregledali na prisotnost oocist kriptosporidijev s komercialno dostopnim testom za neposredno imunofluorescenco Merifluor® *Cryptosporidium/Giardia*. Pri izvajanju testa smo sledili navodilom proizvajalca.

Vzorce blata smo najprej resuspendirali v fiziološki raztopini. Na eno izmed treh polj predmetnega stekelca, priloženega v testnem kompletu reagentov, smo nanesli kapljico resuspendiranega blata, na preostali dve polji pa po kapljico pozitivne in negativne kontrole. Kapljice smo nežno razmazali po celotnih poljih. Razmaze smo posušili na zraku in jih fiksirali z dvakratnim potegom nad plamenom gorilnika. Na fiksirane razmaze smo nanesli kapljico detekcijskega reagenta in nato še kapljico kontrastnega barvila ter rahlo premešali s plastično zanko. Sledila je polurna inkubacija v zatemnjeni vlažni komori pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo nevezana monoklonska protitelesa sprali s pufrom za spiranje in razmaze delno posušili na zraku. Nato smo nanje nanesli kapljico namestitvenega sredstva in jih pokrili s krovnim stekelcem.

Tako pripravljene preparate smo pregledali pod 400-kratno povečavo fluorescenčnega mikroskopa s filtrom 450 do 490 nm. Iskali smo 4-6 µm velike, okrogle ali ovalne oociste kriptosporidijev, ki na temnem ozadju zeleno fluorescirajo. Rezultat smo ocenili kot pozitiven, če smo v preparatu opazili vsaj eno oocisto.

3.2.2 Osamitev DNA iz vzorcev blata

Postopek osamitve DNA smo izvajali v komori za sterilno delo. Pol ure pred pričetkom dela smo v komori za sterilno delo prižgali UV luč, da smo si zagotovili sterilne pogoje dela.

Za osamitev DNA iz vzorcev blata smo uporabili komercialni komplet reagentov QIAamp® DNA Stool Mini Kit. Pri izvedbi smo sledili navodilom proizvajalca.

Pred pričetkom osamitve DNA smo tistim vzorcem, kjer je bilo blato formirano, dodali fiziološko raztopino in jih dobro premešali s stekleno palčko.

V 2 ml sterilne epruvetke z navojem smo odpipetirali 200-300 µl vzorca blata in mu dodali 1,4 ml pufra ASL. Mešanico smo dobro premešali na mešalu in inkubirali 10 min na toplotnem stresalniku pri 95 °C. Visoka temperatura je povzročila razgradnjo izredno odpornih oocist kriptosporidijev. Po inkubaciji smo vzorec ponovno premešali na mešalu in ga centrifugirali 1 min pri 14.000 obratih/min. Po centrifugiranju smo 1,2 ml

supernatanta prenesli v novo 2 ml sterilno epruvetko, usedlino pa zavrgli. Supernatantu smo dodali tabletko InhibitEx in mešali na mešalu, dokler se tabletka ni popolnoma raztopila. Tabletka InhibitEx veže sestavine iz blata, ki bi lahko motile oziroma zavirale postopek osamitve in kasneje tudi pomnoževanje DNA. Ko je bila tabletka popolnoma raztopljena, smo vzorec inkubirali na sobni temperaturi 1 min in ga nato centrifugirali dvakrat po 3 min pri 14.000 obratih/min, da smo dosegli čim boljšo odstranitev tabletke z vezanimi motečimi snovmi iz vzorca. Usedlino smo obakrat zavrgli.

Po drugem centrifugiranju smo 200 µl supernatanta prenesli v 1,5 ml sterilno epruvetko, v katero smo predhodno odmerili 15 µl proteinaze K. Tej mešanici smo dodali še 200 µl pufra za lizo AL, premešali na mešalu in inkubirali 10 min pri 70 °C. Pri teh pogojih je prišlo do razgradnje beljakovin s proteinazo K.

Po inkubaciji smo vzorcu dodali 200 µl hladnega 96-100 % etanola, ki je izval precipitacijo DNA, in dobro premešali. Celoten lizat smo prenesli v epruvetko z membrano, vstavljeni v 2 ml zbiralno epruvetko in centrifugirali 1 min pri 14.000 obratih/min. V tem času se je precipitirana DNA vezala na delce silicijevega dioksida, ki so vezani na membrani, ostale snovi pa so se sprale v zbiralno epruvetko.

Po centrifugiranju smo izpirek zavrgli. Epruvetko z membrano smo prenesli v novo zbiralno epruvetko in na membrano nanesli 500 µl pufra za spiranje AW1. Sledilo je ponovno centrifugiranje 1 min pri 14.000 obratih/min in prenos epruvetke z membrano v novo zbiralno epruvetko. V nadaljevanju smo na membrano nanesli pufer za spiranje AW2 in centrifugirali 3 min pri 14.000 obratih/min. Po centrifugiranju smo zbiralno epruvetko zamenjali z novo in ponovno centrifugirali 1 min pri 14.000 obratih/min. S spiranjem z različnima pufromi smo zagotovili, da so se z membrane sprale vse moteče snovi.

Po spiranju smo epruvetko z membrano prenesli v novo 1,5 ml sterilno epruvetko in na membrano nanesli 200 µl elucijskega pufra AE. Po 1 min inkubaciji na sobni temperaturi in 1 min centrifugiranju pri 14.000 obratih/min se je DNA eluirala z membrane. Vzorce osamljene DNA smo shranili do nadaljnje obdelave pri -20 °C.

3.2.3 PCR v realnem času

3.2.3.1 Optimizacija PCR v realnem času za pomnoževanje DNA kryptosporidijev

V diplomskem delu smo optimizirali multiplo PCR v realnem času, specifično za rod *Cryptosporidium* in vrsto *C. parvum*. Pogoje pomnoževanja DNA smo povzeli po članku Jothikumar in sod. (2008) in jih optimizirali za aparaturo StepOne™ Real-time PCR System.

Pri PCR smo uporabljali komercialno dostopno reakcijsko mešanico Platinum® Quantitative PCR SuperMix – UDG with ROX, ki vsebuje:

- Platinum® *Taq* DNA polimerazo
- Tris-HCl, KCl, 6 mM MgCl₂
- 400 µM dGTP, dATP in dCTP ter 800 µM dUTP
- uracil DNA glikozilazo (UDG)
- 1 µM ROX fluorescenčno barvilo
- stabilizatorje

Platinum® *Taq* DNA polimeraza je rekombinantna *Taq* DNA polimeraza, ki katalizira sintezo DNA iz deoksiribonukleotidnih enot. Zaradi inhibitorja (protitela), ki je vezan nanjo, je pri sobni temperaturi v neaktivni obliki. Njeno polimerazno aktivnost sproži šele visoka temperatura, pri kateri DNA tekom PCR denaturira.

Encim UDG pred začetkom pomnoževanja DNA razgradi vse dvovijačne DNA, ki imajo v svoji strukturi namesto timina uracil. S tem prepreči prenos PCR-pridelkov med različnimi reakcijami. Aktiven je pri temperaturah nižjih od 55 °C. S prvo denaturacijo DNA tekom PCR se njegova aktivnost uniči, zato ne more razgraditi novonastalih PCR-pridelkov, ki vsebujejo uracil.

Fluorescenčno barvilo ROX normalizira fluorescenčni signal aparata in nam s tem omogoči vrednotenje in primerjavo rezultatov PCR.

Reakcijski mešanici smo dodali par začetnih oligonukleotidov JVAF in JVAR, s katerima smo pomnoževali 159 bp dolg del gena za malo ribosomske podenote (18S rRNA) kryptosporidijev. Omenjen par začetnih oligonukleotidov omogoča pomnoževanje dela gena za 18S rRNA devetih vrst kryptosporidijev (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. canis*, *C. felis*, *C. muris*, *C. andersoni*, *C. baileyi*, *C. serpentis*, *C. wrairi*) in vrsti *C. parvum* podobnega genotipa iz lemurjev. Spremljanje nastalih produktov tekom PCR v realnem času nam je omogočala sonda JVAP18S. Na 5' koncu je bila označena s fluoroforom YAK, na 3' koncu pa je imela pripet nefluorescenčni dušilec BHQ-2.

Za ugotavljanje prisotnosti DNA *C. parvum* smo v reakcijsko mešanico dodali začetna oligonukleotida JVAGF in JVAGR, s katerima smo pomnoževali 72 bp dolgo polimorfno regijo gena *C. parvum* z neopredeljeno vlogo. Ta par začetnih oligonukleotidov omogoča tudi pomnoževanje DNA vrste *C. wrairi*, za katero pa vemo, da ne povzroča okužb ljudi. Nastajanje produktov smo spremljali s sondijo JVAGP2, ki je bila na 5' koncu označena s fluoroforom 6-FAM, na 3' koncu pa je imela pripet nefluorescenčni dušilec BHQ-1.

Pri optimizaciji PCR v realnem času smo pripravljali reakcijske mešanice z različnimi koncentracijami začetnih oligonukleotidov in sond, prilagajali pa smo tudi temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov.

Vsako reakcijo pomnoževanja smo izvedli z naslednjimi razredčinami DNA na *C. parvum* pozitivnega vzorca: 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵. Vsako razredčino smo pomnoževali v dveh ponovitvah, kot je priporočeno.

3.2.3.1.1 Vpliv koncentracije začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA kryptosporidijev

Za ugotavljanje vpliva koncentracije začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA kryptosporidijev smo si pripravili reakcijske mešanice, ki so se razlikovale le v koncentracijah začetnih oligonukleotidov (200 nM, 250 nM, 300 nM, 500 nM):

- 10 µl Platinum® Quantitative PCR SuperMix – UDG with ROX
- začetni oligonukleotidi JVAF (10 µM), JVAG (10 µM), JVAGF (10 µM), JVAGR (10 µM), katerih volumen v reakcijski mešanici je bil odvisen od njihove končne koncentracije: 0,4 µl, 0,5 µl, 0,6 µl, 1 µl
- 0,2 µl sonde JVAP18S (10 µM) in 0,2 µl sonde JVAGP2 (10 µM)
- ddH₂O do skupnega volumna 15 µl

Te 15 µl mešanice smo odpipetirali v sterilne 0,2 ml epruvetke in vsaki dodali 5 µl ustrezne razredčine DNA pozitivnega vzorca v dveh ponovitvah ali 5 µl negativne kontrole – sterilna voda brez nukleazne aktivnosti.

Tako pripravljene vzorce smo prenesli v aparaturo StepOne™ Real-time PCR System in izvedli reakcijo PCR v realnem času pod naslednjimi temperaturnimi pogoji (Jothikumar in sod., 2008):

- 50 °C 2 minuti (aktivacija UDG)
- 95 °C 2 minuti (aktivacija DNA polimeraze)
- 45 ciklov zanke:
 - 94 °C 10 sekund (denaturacija DNA)
 - 55 °C 30 sekund (pripenjanje začetnih oligonukleotidov)
 - 72 °C 20 sekund (podaljševanje DNA)

Po končani reakciji smo analizirali vpliv različnih koncentracij začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA kryptosporidijev. Iz rezultatov pomnoževanja neredčene in ustrezno redčene DNA pozitivnega vzorca smo izrisali standardne krivulje. Učinkovitost reakcije E smo izračunali iz vrednosti naklona linearne regresijske premice po enačbi (Rutledge in sod., 2003):

$$E = 10^{(-1/k)} - 1 \quad \dots (1)$$

Iz linearne regresijske premice smo izračunali tudi koeficient variacije R², ki kaže stopnjo ujemanja med regresijsko premico in posameznimi, dejanskimi vrednostmi C_T. Vrednost 1,00 pomeni popolno ujemanje med regresijsko premico in posameznimi vrednostmi C_T.

3.2.3.1.2 Vpliv koncentracije sond na uspešnost pomnoževanja DNA kriptosporidijev

Za ugotavljanje vpliva koncentracije sond na uspešnost pomnoževanja DNA kriptosporidijev smo si pripravili reakcijske mešanice, ki so se razlikovale le v koncentracijah sond (50 nM, 100 nM, 150 nM, 250 nM):

- 10 µl Platinum® Quantitative PCR SuperMix – UDG with ROX
- 0,4 µl vsakega izmed začetnih oligonukleotidov JVAF (10 µM), JVAG (10 µM), JVAGF (10 µM), JVAGR (10 µM)
- sondi JVAP18S (10 µM) in JVAGP2 (10 µM), katerih volumen v reakcijski mešanici je bil odvisen od njune končne koncentracije: 0,1 µl, 0,2 µl, 0,3 µl, 0,5 µl
- ddH₂O do skupnega volumna 15 µl

Te 15 µl mešanice smo odpipetirali v sterilne 0,2 ml epruvetke in vsaki dodali 5 µl ustrezne razredčine DNA pozitivnega vzorca v dveh ponovitvah ali 5 µl negativne kontrole – sterilna voda brez nukleazne aktivnosti.

PCR smo izvedli pod enakimi temperaturnimi pogoji, kot smo jih uporabili pri ugotavljanju vpliva koncentracije začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA kriptosporidijev. Na enak način kot je opisan v točki 3.2.3.1.1, smo analizirali vpliv koncentracije sond na učinkovitost pomnoževanja DNA kriptosporidijev. Na podlagi dobljenih rezultatov smo izrisali standardne krivulje in izračunali učinkovitost reakcije.

3.2.3.1.3 Vpliv temperature pripenjanja začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA kriptosporidijev

Da bi ugotovili, kolikšna je uspešnost reakcije v odvisnosti od temperature pripenjanja začetnih oligonukleotidov, smo v reakciji PCR preizkusili pet različnih temperatur pripenjanja: 52 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C in 58 °C. Za vsako od temperatur pripenjanja začetnih oligonukleotidov smo pripravili reakcijske mešanice v enaki sestavi:

- 10 µl Platinum® Quantitative PCR SuperMix – UDG with ROX
- 0,4 µl vsakega izmed začetnih oligonukleotidov JVAF (10 µM), JVAG (10 µM), JVAGF (10 µM), JVAGR (10 µM),
- 0,5 µl sonde JVAP18S (10 µM) in 0,5 µl sonde JVAGP2 (10 µM)
- ddH₂O do skupnega volumna 15 µl

Te 15 µl mešanice smo odpipetirali v sterilne 0,2 ml epruvetke in vsaki dodali 5 µl ustrezne razredčine DNA pozitivnega vzorca v dveh ponovitvah ali 5 µl negativne kontrole – sterilna voda brez nukleazne aktivnosti.

Reakcijo smo izvedli pod temperaturnimi pogoji, opisanimi v točki 3.2.3.1.1, pri čemer smo spremajali temperaturo pripenjanja začetnih oligonukleotidov. Po končani reakciji smo analizirali vpliv temperature pripenjanja začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA kryptosporidijev. Izrisali smo standardne krivulje in izračunali učinkovitost reakcije, kot je opisano v točki 3.2.3.1.1.

3.2.3.2 Ugotavljanje DNA kryptosporidijev v kliničnih vzorcih

Po končani optimizaciji smo s PCR v realnem času na prisotnost DNA kryptosporidijev testirali zbrane klinične vzorce, ki smo jim predhodno osamili DNA.

Pripravili smo reakcijske mešanice v naslednji sestavi:

- 10 µl Platinum® Quantitative PCR SuperMix – UDG with ROX
- 0,4 µl vsakega izmed začetnih oligonukleotidov JVAF (10 µM), JVAG (10 µM), JVAGF (10 µM), JVAGR (10 µM),
- 0,5 µl sonde JVAP18S (10 µM) in 0,5 µl sonde JVAGP2 (10 µM)
- 2,4 µl ddH₂O

Te 15 µl mešanice smo odpipetirali v sterilne 0,2 ml epruvetke in v vsako dodali 5 µl DNA iz vzorca ali 5 µl negativne (sterilna voda brez nukleazne aktivnosti) ali pozitivne kontrole (DNA iz vzorca blata, v katerem je bila predhodno potrjena prisotnost vrste *C. parvum*).

Reakcijo smo izvedli pod sledečimi temperaturnimi pogoji:

- 50 °C 2 minuti
- 95 °C 2 minuti
- 45 ciklov zanke:
 - 94 °C 10 sekund
 - 55 °C 30 sekund
 - 72 °C 20 sekund

Po končani reakciji smo z uporabo programa StepOne™ SoftWare v2.0 odčitali in analizirali rezultate pomnoževanja.

3.2.3.3 Preverjanje uspešnosti pomnoževanja z interno kontrolo

Interne kontrole smo uporabili za preverjanje uspešnosti pomnoževanja DNA. Uspešno pomnoževanje interne kontrole nam je služilo kot zagotovilo, da je bila odstranitev inhibitorjev tekom postopka osamitve DNA iz kliničnih vzorcev uspešna.

Pripravili smo reakcijske mešanice v naslednji sestavi:

- 10 µl reakcijskega pufra
- 0,3 µl vsakega izmed začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje interne kontrole (10 µM)
- 0,3 µl sonde (10 µM)
- 3,1 µl vode brez nukleazne aktivnosti

Te 14 µl mešanice smo odpipetirali v sterilne 0,2 ml epruvetke in jim dodali po 5 µl DNA, osamljene iz kliničnega vzorca, in 1 µl DNA interne kontrole. Vključili smo tudi "pozitivno kontrolo", pri kateri smo namesto DNA iz vzorca blata dodali 5 µl vode brez nukleazne aktivnosti.

Pomnoževanje interne kontrole smo izvedli pod enakimi temperaturnimi pogoji kot pri reakcijah, kjer smo ugotavljali DNA kryptosporidijev v kliničnih vzorcih.

Če se je interna kontrola v reakcijskih mešanicah z dodano DNA iz kliničnega vzorca pomnožila več kot tri cikle kasneje kot v "pozitivni kontroli" (5 µl vode in 1 µl DNA interne kontrole) ali se ni pomnožila, smo predvidevali, da so v vzorcu osamljene DNA prisotni inhibitorji. Tak vzorec osamljene DNA smo 10-krat redčili in s tako redčenim vzorcem ponovili reakcijo pomnoževanja DNA kryptosporidijev in reakcijo pomnoževanja interne kontrole.

3.2.3.4 Analiza pridelkov PCR z agarozno gelsko elektroforezo

Ustreznost pridelkov PCR smo ugotavljali z vodoravno elektroforezo v 2 % agaroznem gelu, ki smo ga pripravili po standardnem postopku. Dokazovali smo pridelke v velikosti 72 bp in 159 bp.

V stekleno čašo smo natehtali 1 g agaroze v prahu in dodali 50 ml 1x pufra TAE (0,04 M Tris-HCl, 0,02 M Na-acetat, 0,02 M NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,3). Raztopino smo premešali in jo v mikrovalovni pečici segreli do vrelišča, da se je agarosa popolnoma raztopila. Nato smo raztopino delno ohladili (~60 °C) in ji dodali 4,5 µl etidijevega bromida. Dokončno smo raztopino ohladili v kalupu z elektoforeznim glavnikičkom. Strjen gel smo položili v elektroforezno kadičko in ga prelili z pufrom TAE. V vdolbinice gela smo nanašali mešanico, pripravljeno iz 10 µl pridelka PCR in 2 µl nanašalnega pufra. Velikost pridelkov PCR smo primerjali z velikostnim standardom lestvice 50 bp, ki vsebuje delce DNA velikosti 50, 100, ..., 750 in 2642 bp. Gelska elektroforeza je potekala pri sobni temperaturi 45 do 60 min in napetosti 75 V. Po končani elektroforezi smo gel pregledali pod svetlobo UV.

Specifičnost namnoženega pridelka PCR je določala njegova velikost glede na velikost pozitivne kontrole in velikostnega standarda.

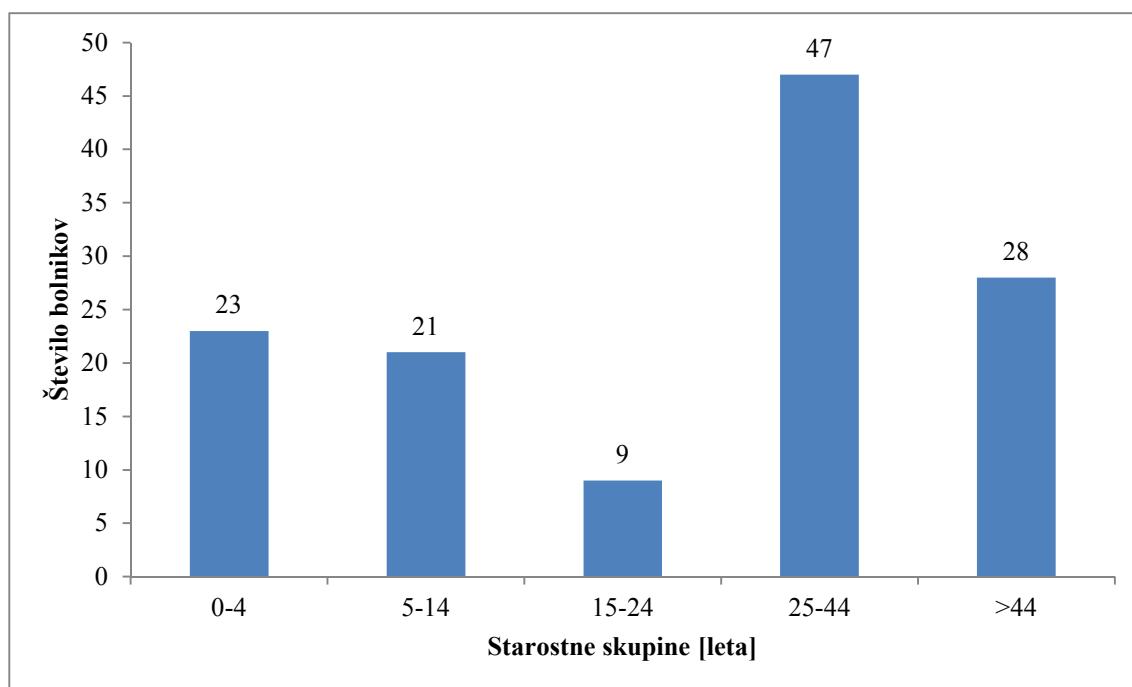
3.2.3.5 Kontrola kontaminacije

V izogib kontaminaciji vzorcev in prostora smo upoštevali stroge previdnostne ukrepe. Delali smo v skladu s pravili in zapisanimi postopki Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo. Posamezne faze dela smo izvajali v ločenih prostorih. Reakcijske mešanice smo pripravljali v komori za sterilno delo. Pipete in potrošni material smo uporabljali le za posamezno fazo dela in jih nismo prenašali v druge prostore. Reagente za PCR v realnem času smo shranjevali v majhnih količinah. Pred in po delu smo delovne površine pobrisali z razkužilom in sredstvom za odstranjevanje DNA.

4 REZULTATI

4.1 ZNAČILNOSTI TESTIRANIH VZORCEV

V raziskavo smo vključili vzorce blata 131 bolnikov, obolelih za gastroenteritisom, med katerimi je bilo 56 (42,75 %) žensk in 75 (57,25 %) moških. Zajeli smo bolnike starosti od 1 do 95 let. Povprečna starost bolnikov je bila 30,6 leta, pri čemer za tri bolnike podatka o starosti nismo imeli. Na Sliki 5 je prikazano število bolnikov z gastroenteritisom, vključenih v raziskavo, v posameznih starostnih skupinah. Največ bolnikov (47; 36,7 %) je bilo starih med 25 in 44 let. Najmanj (9; 7,0 %) je bilo bolnikov v starostni skupini od 15 do 24 let. Triindvajset (18,0 %) bolnikov je bilo starih do 4 leta, 21 (16,4 %) bolnikov od 5 do 14 let in 28 (21,9 %) bolnikov starejših od 44 let.



Slika 5: Starostna razporeditev bolnikov z gastroenteritisom, vključenih v raziskavo

4.2 REZULTATI NEPOSREDNEGA IMUNOFLUORESCENČNEGA TESTA MERIFLUOR® *Cryptosporidium/Giardia*

Razmaze 131 zbranih vzorcev blata bolnikov, obolelih za gastroenteritisom, smo pregledali na prisotnost oocist kriptosporidijev s komercialno dostopnim testom Merifluor® *Cryptosporidium/Giardia*. Prisotnost oocist kriptosporidijev smo ugotovili pri 3 (2,29 %) vzorcih blata, ostalih 128 vzorcev pa je bilo negativnih.

4.3 REZULTATI OPTIMIZACIJE PCR V REALNEM ČASU ZA POMNOŽEVANJE DNA KRIPTOSPORIDIJEV

Pri optimizaciji PCR v realnem času smo uporabili šest razredčin DNA na *C. parvum* močno pozitivnega vzorca (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}), ki smo jih z istim protokolom reakcije testirali v dveh ponovitvah.

Optimizirali smo multiplo PCR v realnem času za sočasno pomnoževanje dela gena za 18S rRNA kriptosporidijev in pomnoževanje polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum*. Določili smo pogoje, ki so bili za sočasno pomnoževanje obeh zaporedij najbolj optimalni. Določili smo jih na podlagi podatkov o učinkovitosti reakcije E in koeficientu variacije R^2 . Učinkovitost reakcije mora biti pri kvalitativni PCR med 90 in 100 %. Koeficient variacije krivulje mora biti večji od 0,98.

4.3.1 Rezultati ugotavljanja vpliva koncentracije začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA kriptosporidijev

Rezultati PCR v realnem času pri različnih koncentracijah začetnih oligonukleotidov so prikazani v Preglednici 2 ter na Sliki 6 in Sliki 7. Učinkovitost reakcije pomnoževanja dela gena za 18S rRNA kriptosporidijev je variirala med 93,32 % in 99,59 %, učinkovitost reakcije pomnoževanja polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum* pa med 83,31 % in 98,21 %.

Preglednica 2: Učinkovitost reakcije (E), koeficient variacije (R^2) in cikel praga detekcije (C_T) pri različnih koncentracijah začetnih oligonukleotidov.

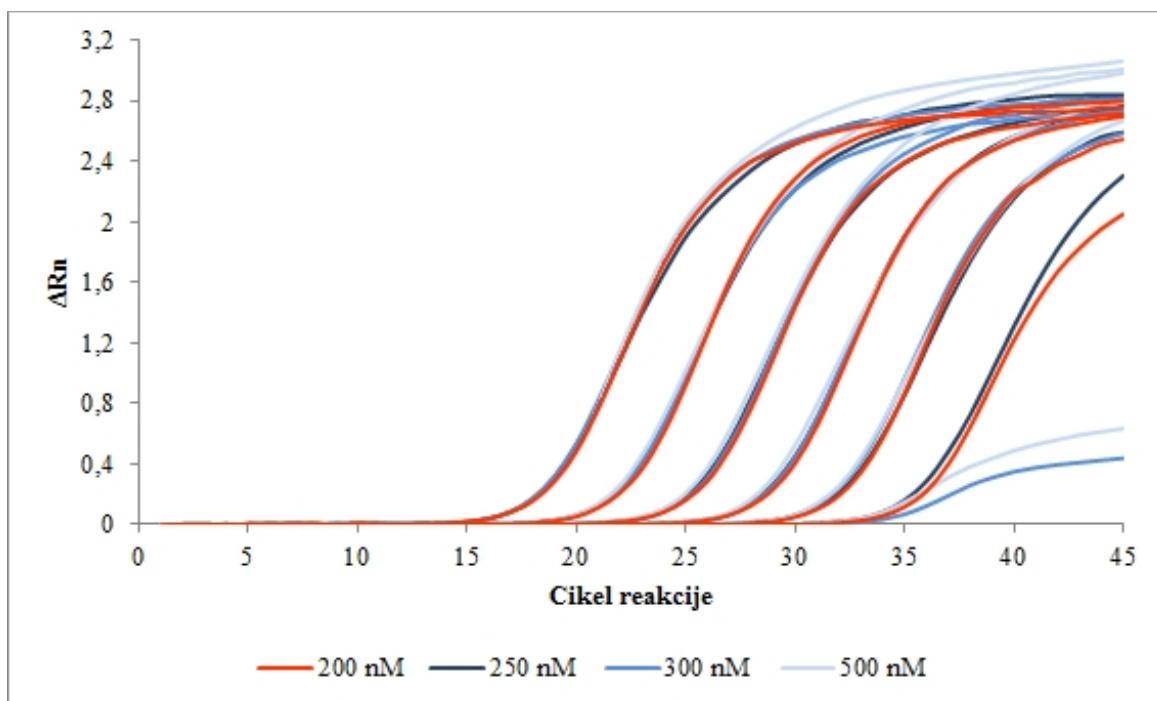
Tarčna DNA	Koncentracija začetnih oligonukleotidov v reakcijski mešanici [nM]	Koeficient variacije R^2	Učinkovitost reakcije E [%]	Cikel praga detekcije (C_T) neredčenega pozitivnega vzorca
<i>Cryptosporidium</i> spp. ^a	200	0,999	96,73	17,38
<i>C. parvum</i> ^b		0,999	98,21	18,09
<i>Cryptosporidium</i> spp.	250	1,000	96,99	17,39
<i>C. parvum</i>		0,999	94,07	18,15
<i>Cryptosporidium</i> spp.	300	0,996	93,32	17,34
<i>C. parvum</i>		0,950	83,31	17,84
<i>Cryptosporidium</i> spp.	500	0,999	99,59	17,69
<i>C. parvum</i>		0,961	87,81	18,11

^a*Cryptosporidium* spp. – del gena za 18S rRNA kriptosporidijev

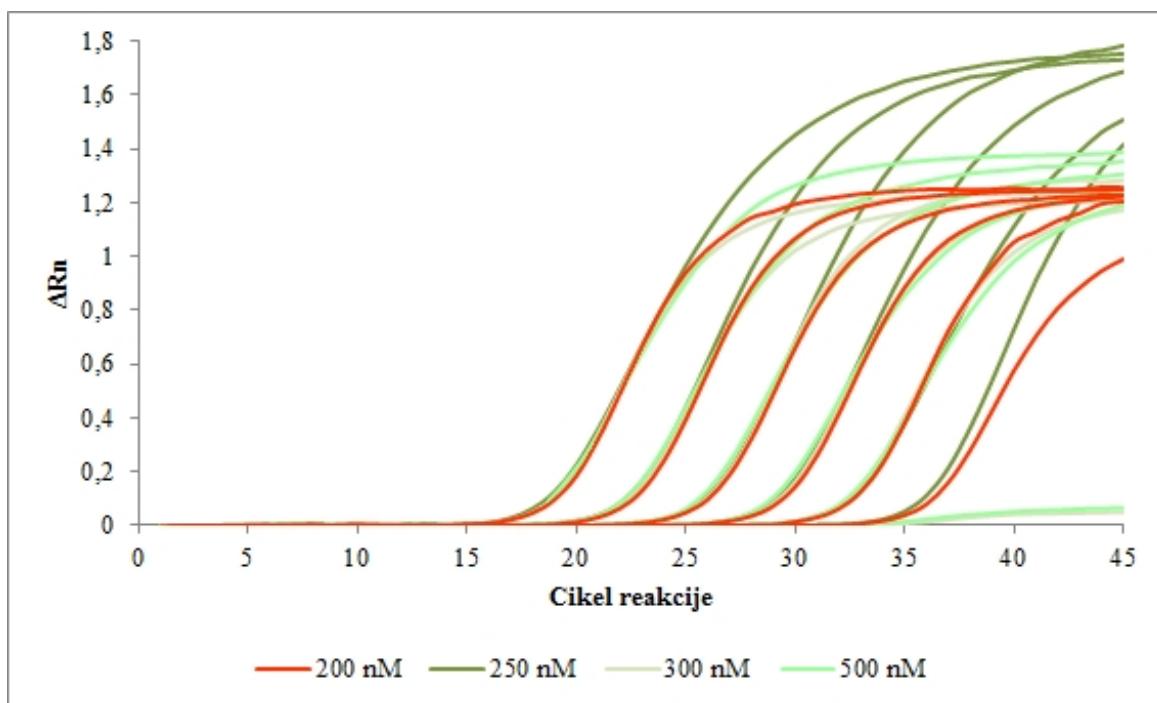
^b*C. parvum* – polimorfna regija gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum*

Na podlagi dobljenih rezultatov smo kot najprimernejšo koncentracijo začetnih oligonukleotidov izbrali 200 nM koncentracijo. Pri tej koncentraciji sta bili učinkovitost pomnoževanja dela gena za 18S rRNA kriptosporidijev (96,73 %) in učinkovitost pomnoževanja polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum* (98,21 %) v zahtevanih mejah in hkrati v kombinaciji najbolj optimalni. Koeficient variacije R^2 pri izbrani koncentraciji začetnih oligonukleotidov je prav tako ustrezal postavljeni meji in je tako za pomnoževanje dela gena za 18S rRNA kriptosporidijev kot tudi za pomnoževanje polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum* znašal 0,999.

Pri ugotavljanju vpliva koncentracije začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA kriptosporidijev smo ocenili, da je pri 200 nM koncentraciji začetnih oligonukleotidov najvišja vrednost za doseganje stabilnosti signala pomnoževanja dela gena za 18S rRNA kriptosporidijev C_T 35, za pomnoževanje polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum* pa C_T 37.

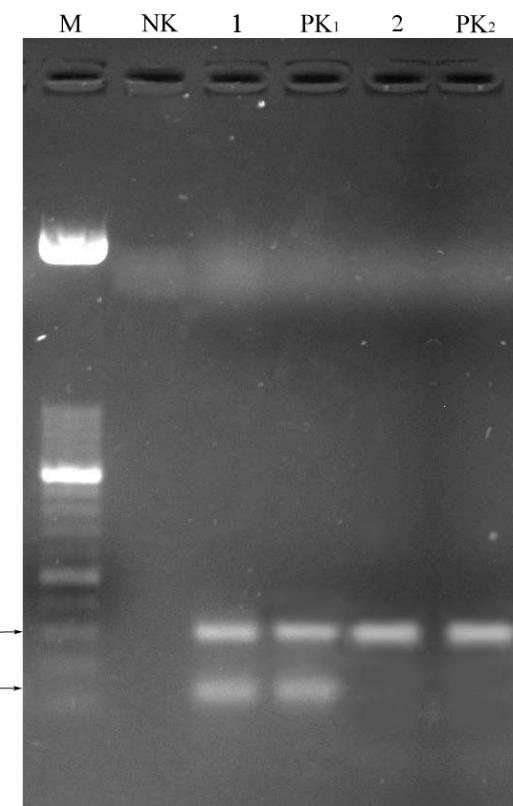


Slika 6: Grafični prikaz pomnoževanja dela gena za 18S rRNA kryptosporidijev različnih redčitev DNA pozitivnega vzorca pri različnih koncentracijah začetnih oligonukleotidov (ΔR_n je jakost fluorescenčnega signala).



Slika 7: Grafični prikaz pomnoževanja polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum* pozitivnega vzorca pri različnih koncentracijah začetnih oligonukleotidov (ΔR_n je jakost fluorescenčnega signala)

Specifičnost PCR-pridelkov pri optimizaciji PCR v realnem času smo potrdili z agarozno gelsko elektroforezo (Slika 8).



Slika 8: Pridelki PCR v realnem času, preverjeni z agarozno gelsko elektroforezo. M – velikostni standard lestvice 50 bp, NK – negativna kontrola pomnoževanja, 1 – pridelek PCR v realnem času vrste *C. parvum* (159 bp dolg odsek gena za 18S rRNA *Cryptosporidium* spp. in 72 bp dolga polimorfna regija gena z neopredeljeno vlogo *C. parvum*), PK₁ – pozitivna kontrola pomnoževanja DNA *C. parvum*, 2 – pridelek PCR v realnem času vrste iz rodu *Cryptosporidium*, ki ni *C. parvum*, (159 bp dolg odsek gena za 18S rRNA *Cryptosporidium* spp.), PK₂ – pozitivna kontrola pomnoževanja DNA vrste iz rodu *Cryptosporidium*, ki ni *C. parvum*

4.3.2 Rezultati ugotavljanja vpliva koncentracije sond na uspešnost pomnoževanja DNA kriptosporidijev

Rezultati PCR v realnem času pri različnih koncentracijah sond so prikazani v Preglednici 3 ter na Sliki 9 in Sliki 10. Učinkovitost reakcije pomnoževanja dela gena za 18S rRNA kriptosporidijev je variirala med 95,35 % in 99,15 %, učinkovitost reakcije pomnoževanja polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum* pa med 94,07 % in 100,03 %.

Preglednica 3: Učinkovitost reakcije (E), koeficient variacije (R^2) in cikel praga detekcije (C_T) pri različnih koncentracijah sond.

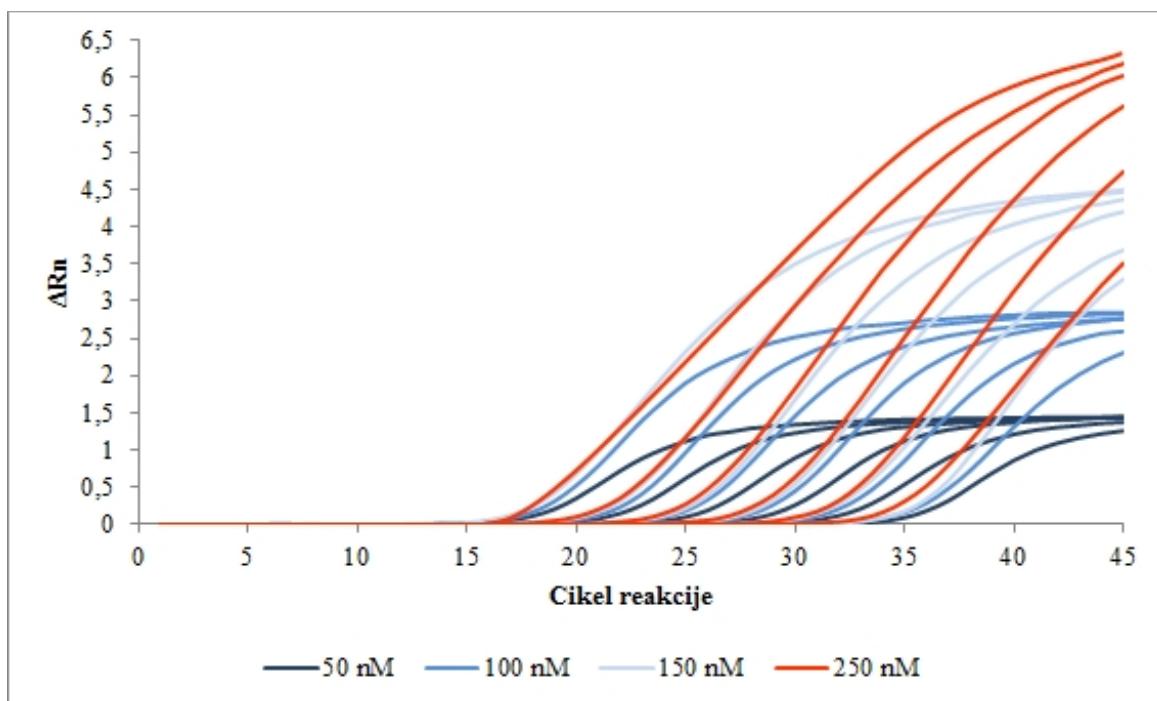
Tarčna DNA	Koncentracija sond v reakcijski mešanici [nM]	Koeficient variacije R^2	Učinkovitost reakcije E [%]	Cikel praga detekcije (C_T) neredčenega pozitivnega vzorca
<i>Cryptosporidium</i> spp. ^a	50	0,999	95,45	17,93
<i>C. parvum</i> ^b		0,999	95,79	18,38
<i>Cryptosporidium</i> spp.	100	1,000	96,99	17,39
<i>C. parvum</i>		0,999	94,07	18,15
<i>Cryptosporidium</i> spp.	150	1,000	95,35	17,30
<i>C. parvum</i>		0,999	96,41	18,30
<i>Cryptosporidium</i> spp.	250	1,000	99,15	17,17
<i>C. parvum</i>		0,997	100,03	18,20

^a*Cryptosporidium* spp. – del gena za 18S rRNA kriptosporidijev

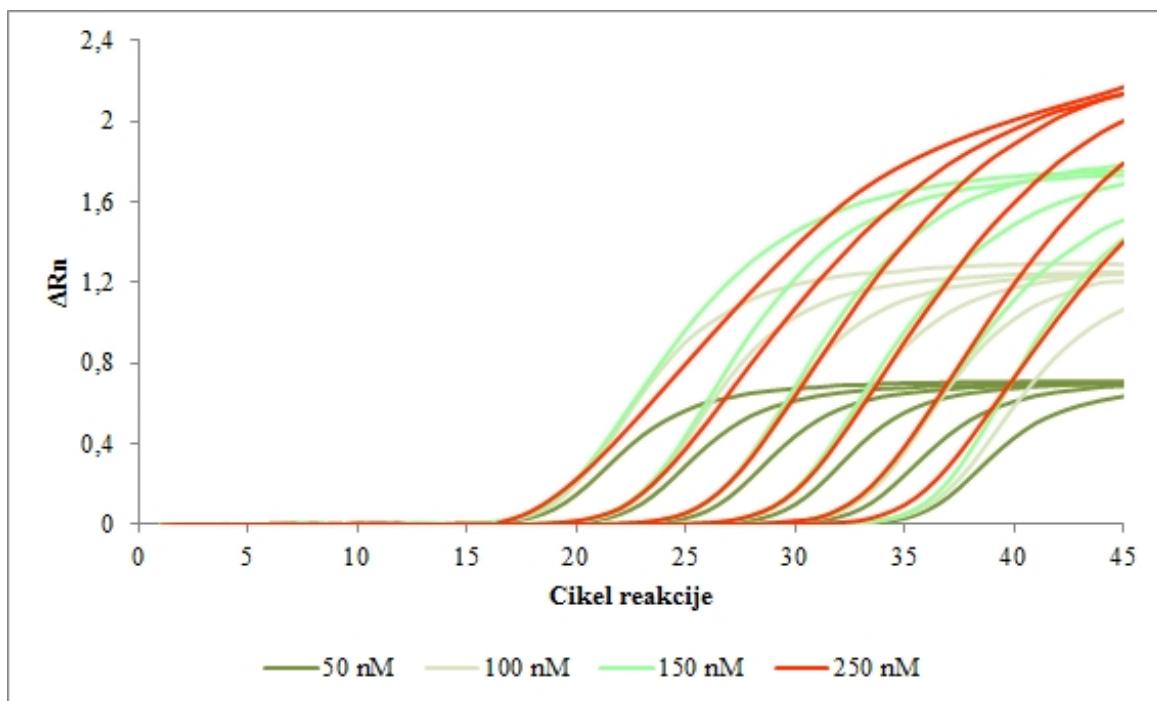
^b*C. parvum* – polimorfna regija gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum*

Po primerjavi dobljenih rezultatov smo kot najprimernejšo koncentracijo sond izbrali 250 nM koncentracijo. Pri tej koncentraciji je bila učinkovitost pomnoževanja dela gena za 18S rRNA kriptosporidijev 99,15 %, učinkovitost pomnoževanja polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum* pa 100,03 %. V primerjavi z ostalimi koncentracijami sond sta bili učinkovitosti pomnoževanja DNA pri 250 nM koncentraciji sond v kombinaciji najvišji. Pri izbrani koncentraciji sond je bila najvišja tudi intenziteta fluorescenčnega signala. Koeficiente variacije R^2 sta znašala 1,000 za pomnoževanje dela gena za 18S rRNA kriptosporidijev in 0,997 za pomnoževanje polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum*.

Pri ugotavljanju vpliva koncentracije sonde na pomnoževanje dela gena za 18S rRNA kriptosporidijev smo ocenili C_T 35 kot najvišjo vrednost C_T , pri kateri je signal še stabilen, pri pomnoževanju polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum* pa je bila ta vrednost C_T 37.



Slika 9: Grafični prikaz pomnoževanja dela gena za 18S rRNA kryptosporidijev različnih redčitev DNA pozitivnega vzorca pri različnih koncentracijah sonde (ΔRn je jakost fluorescenčnega signala).



Slika 10: Grafični prikaz pomnoževanja polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum* različnih redčitev DNA pozitivnega vzorca pri različnih koncentracijah sonde (ΔRn je jakost fluorescenčnega signala).

4.3.3 Rezultati ugotavljanja vpliva temperature pripenjanja začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja DNA kriptosporidijev

Rezultati PCR v realnem času pri različnih temperaturah pripenjanja začetnih oligonukleotidov so prikazani v Preglednici 4 ter na Sliki 11 in Sliki 12. Učinkovitost reakcije pomnoževanja dela gena za 18S rRNA kriptosporidijev je variirala med 90,74 % in 96,99 %, učinkovitost pomnoževanja polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum* pa med 86,82 % in 98,35 %.

Preglednica 4: Učinkovitost reakcije (E), koeficient variacije (R^2) in cikel praga detekcije (C_T) pri različnih temperaturah pripenjanja začetnih oligonukleotidov.

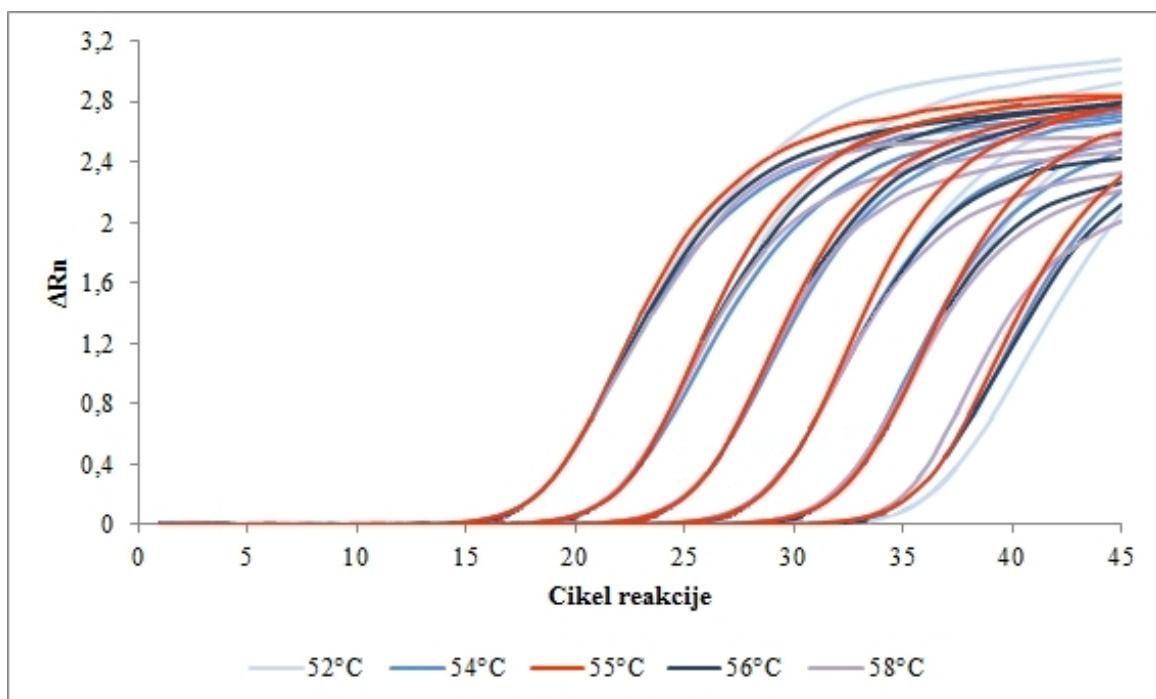
Tarčna DNA	Temperatura pripenjanja začetnih oligonukleotidov [°C]	Koeficient variacije R^2	Učinkovitost reakcije E [%]	Cikel praga detekcije (C_T) neredčenega pozitivnega vzorca
<i>Cryptosporidium</i> spp. ^a	52	0,998	90,74	17,66
<i>C. parvum</i> ^b		0,993	86,82	18,28
<i>Cryptosporidium</i> spp.	54	1,000	94,55	17,44
<i>C. parvum</i>		0,999	94,71	17,97
<i>Cryptosporidium</i> spp.	55	1,000	96,99	17,39
<i>C. parvum</i>		0,999	94,07	18,15
<i>Cryptosporidium</i> spp.	56	0,998	93,23	17,26
<i>C. parvum</i>		0,995	91,31	17,85
<i>Cryptosporidium</i> spp.	58	0,999	95,62	17,63
<i>C. parvum</i>		0,999	98,35	18,29

^a*Cryptosporidium* spp. – del gena za 18S rRNA kriptosporidijev

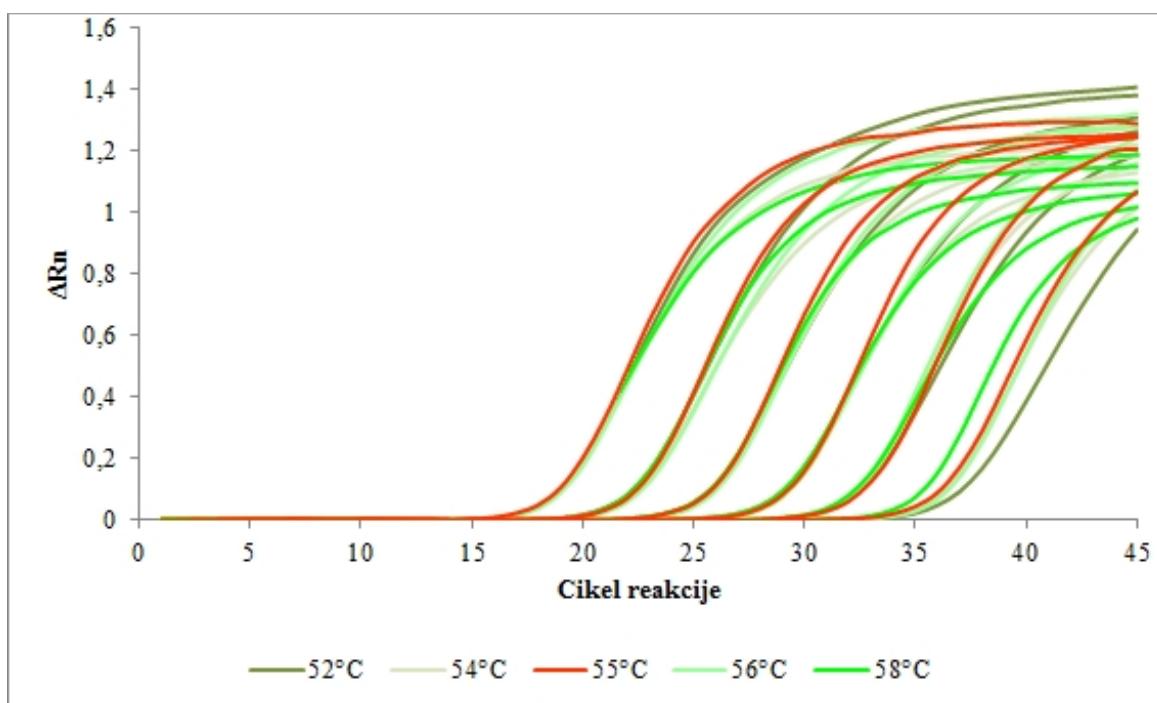
^b*C. parvum* – polimorfna regija gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum*

Na podlagi dobljenih rezultatov smo kot najprimernejšo temperaturo pripenjanja začetnih oligonukleotidov izbrali temperaturo 55 °C. Pri izbrani temperaturi je bila učinkovitost pomnoževanja dela gena za 18S rRNA kriptosporidijev 96,99 %, učinkovitost pomnoževanja polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum* pa 94,07 %. Za to temperaturo smo se odločili kljub temu, da je bila učinkovitost pomnoževanja polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum* nekoliko višja (98,35 %) pri temperaturi 58 °C, saj je bila intenziteta fluorescenčnega signala pomnoževanja tako dela gena za 18S rRNA kriptosporidijev kot tudi polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum* višja pri temperaturi 55 °C. Pri izbrani temperaturi sta koeficiente variacije R^2 znašala 1,000 za pomnoževanje DNA dela gena za 18S rRNA kriptosporidijev in 0,999 za pomnoževanje polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum*.

Pri ugotavljanju vpliva temperature pripenjanja začetnih oligonukleotidov na pomnoževanje dela gena za 18S rRNA kriptosporidijev smo ocenili C_T 35 kot najvišjo vrednost C_T , pri kateri je signal še stabilen, pri pomnoževanju polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum* pa je bila ta vrednost C_T 37.



Slika 11: Grafični prikaz pomnoževanja dela gena za 18S rRNA kriptosporidijev različnih redčitev DNA pozitivnega vzorca pri različnih temperaturah pripenjanja začetnih oligonukleotidov (ΔRn je jakost fluorescenčnega signala).



Slika 12: Grafični prikaz pomnoževanja polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum* različnih redčitev DNA pozitivnega vzorca pri različnih temperaturah pripenjanja začetnih oligonukleotidov (ΔRn je jakost fluorescenčnega signala).

4.3.4 Rezultati preverjanja uspešnosti pomnoževanja DNA kryptosporidijev z optimiziranim protokolom

Po tem, ko smo določili optimalne pogoje pomnoževanja DNA kryptosporidijev s PCR v realnem času, smo z optimiziranim protokolom preverili uspešnost pomnoževanja DNA kryptosporidijev v 21 vzorcih, pri katerih je bila vnaprej potrjena prisotnost DNA različnih vrst kryptosporidijev (*C. parvum*, *C. hominis*, *C. bovis*, genotip jelenov).

V vseh vzorcih, v katerih je bila predhodno ugotovljena prisotnost vrste *C. parvum*, smo njeni DNA z optimiziranim protokolom PCR uspešno pomnožili. V teh vzorcih se je pomnožil tako 159 bp dolg del gena za 18S rRNA kryptosporidijev kot tudi 72 bp dolga polimorfna regija gena z neopredeljeno vlogo *C. parvum*. V vzorcih, kjer je bila predhodno ugotovljena prisotnost vrste *C. hominis* in jelenjega genotipa kryptosporidijev, se je z optimiziranim protokolom pomnožil le 159 bp dolg del gena za 18S rRNA kryptosporidijev. V vzorcu, ki je vseboval vrsto *C. bovis*, se DNA z optimiziranim protokolom PCR ni pomnožila. Uporabljeni začetni oligonukleotidi namreč ne naregajo na DNA omenjene vrste, kar navajajo tudi avtorji raziskave (Jothikumar in sod., 2008), po kateri smo povzeli PCR v realnem času. Po podatkih iz literature vrsta *C. bovis* ne okuži ljudi, zato nezmožnost pomnoževanja njene DNA s PCR v realnem času za ugotavljanje kryptosporidijev v vzorcih blata ljudi ne predstavlja težave.

4.4 UGOTAVLJANJE DNA KRIPTOSPORIDIJEV V KLINIČNIH VZORCIH

Z optimiziranim protokolom PCR v realnem času smo testirali vseh 131 vzorcev blata, iz katerih smo predhodno osamili DNA. Rezultati testiranja vzorcev z DIF in z optimizirano PCR v realnem času ter lastnosti vseh vzorcev so zbrani v Prilogi A.

V vseh 131 vzorcih osamljene DNA smo preverili tudi prisotnost inhibitorjev, ki bi lahko zavirali pomnoževanje DNA kriptosporidijskih organizmov tekom PCR v realnem času. V ta namen smo v reakcijske mešanice za pomnoževanje interne kontrole dodali tako DNA, osamljeno iz kliničnih vzorcev, kot tudi interno kontrola. Nato smo ugotavljali, v katerem ciklu se je interna kontrola začela pomnoževati v primerjavi s "pozitivno kontrolo". Pri enem (0,76 %) od 131 vzorcev pomnožitev interne kontrole ni bila uspešna, zato smo vzorec 10-krat redčili in ponovili tako reakcijo pomnoževanja DNA kriptosporidijskih organizmov kot tudi reakcijo pomnoževanja interne kontrole. Po redčenju vzorca se je interna kontrola pomnožila v skladu s postavljenimi kriteriji.

Preglednica 5: Vzorci, pozitivni po testiranju z DIF in z optimizirano PCR v realnem času, ter njihove lastnosti.

Zaporedna številka pacienta	Spol	Starost [leta]	Paraziti v blatu	Rezultat DIF (<i>Crypto. spp.</i>)	PCR v realnem času		
					Rezultat	C_T (<i>Crypto. spp.</i>)	C_T (<i>C. parvum</i>)
1	M ^a	64	<i>C. parvum</i>	P ^b	P	25,7	26,3
2	M	38	<i>Cryptosporidium</i> spp., <i>G. intestinalis</i>	N ^c	P	35,0	/
3	M	26	<i>C. parvum</i> , <i>G. intestinalis</i>	P	P	22,9	23,5
4	M	7	<i>C. parvum</i>	P	P	25,0	25,5

^aM – moški spol

^bP – pozitiven rezultat

^cN – negativen rezultat

V Preglednici 5 so prikazani vzorci, v katerih smo prisotnost kriptosporidijskih organizmov ugotovili z DIF in/ali s PCR v realnem času, ter njihove lastnosti. Od skupno 131 vzorcev so bili 4 (3,05 %) pozitivni po testiranju s PCR v realnem času, ostalih 127 (96,95 %) pa je bilo negativnih.

Vsi pozitivni vzorci so pripadali bolnikom moškega spola. Odstotek okuženih moških je tako znašal 5,33 % (4/75). Povprečna starost bolnikov je bila 33,8 let. Pri treh pozitivnih bolnikih smo s PCR v realnem času ugotovili okužbo z vrsto *C. parvum*, pri enem pa

okužbo z vrsto kriptosporidijev, ki ni bila *C. parvum*. Pri dveh bolnikih so bili kriptosporidiji edini parazitski povzročitelji gastroenteritisa, pri dveh pa je šlo za sočasno okužbo s praživaljo *Giardia intestinalis*. Povprečni cikel praga detekcije C_T pri pomnoževanju dela gena za 18S rRNA kriptosporidijev v omenjenih vzorcih je bil 27,4, pri pomnoževanju polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum* pa 25,1.

4.5 PRIMERJAVA DIF IN PCR V REALNEM ČASU

Po primerjavi rezultatov ugotavljanja prisotnosti kriptosporidijev z DIF in s PCR v realnem času smo ugotovili, da so se rezultati omenjenih testov ujemali pri treh (75,0 %) vzorcih, pri enem (25,0 %) pa ne. S PCR v realnem času je bil ta vzorec pozitiven, medtem ko z DIF oocist kriptosporidijev v tem vzorcu nismo ugotovili.

Preglednica 6: Rezultati vzorcev blata, testiranih z DIF in s PCR v realnem času.

TEST		DIF		Skupaj
		+	-	
PCR v realnem času	+	3	1	4
	-	0	127	127
Skupaj		3	128	131

Na podlagi rezultatov PCR v realnem času smo izračunali specifičnost in občutljivost DIF po naslednjih formulah (Gordis, 2004):

$$\text{Specifičnost (\%)} = \frac{\text{resnično negativni vzorci}}{\text{resnično negativni vzorci} + \text{lažno pozitivni vzorci}} \times 100\% \quad \dots (2)$$

$$\text{Občutljivost (\%)} = \frac{\text{resnično pozitivni vzorci}}{\text{resnično pozitivni vzorci} + \text{lažno negativni vzorci}} \times 100\% \quad \dots (3)$$

Od 4 vzorcev, pri katerih smo s PCR v realnem času ugotovili prisotnost DNA kriptosporidijev, smo z neposrednim imunofluorescenčnim testom Merifluor® *Cryptosporidium/Giardia* pravilno ugotovili prisotnost oocist kriptosporidijev v 3 vzorcih blata. Pri enem vzorcu oocist kriptosporidijev nismo ugotovili. Iz tega lahko zaključimo, da je bila občutljivost DIF 75,0 %.

Pri nobenem izmed 127 vzorcev, pri katerih s PCR v realnem času nismo ugotovili prisotnosti DNA kriptosporidijev, tudi oocist z DIF nismo ugotovili. Specifičnost DIF je bila torej 100 %.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Praživali iz rodu *Cryptosporidium* povzročajo kryptosporidiozo, ki predstavlja velik zdravstveni problem povsod po svetu. Bolezen se kaže v akutni ali kronični driski in najpogosteje prizadene majhne otroke ter osebe z oslabljeno imunostjo (Mak, 2004; Chen in sod., 2002). Kryptosporidiji so zaradi svojih specifičnih lastnosti, ki jim lajšajo širjenje med gostitelji, pomembni povzročitelji obsežnih epidemij, predvsem hidričnih (Putignani in Menichella, 2010). Pri osebah z normalno imunostjo kryptosporidioza običajno izzveni sama od sebe, bolnike z oslabljeno imunostjo pa lahko življenjsko ogrozi (Chen in sod., 2002; Mak, 2004). Uspešnega zdravila za zdravljenje kryptosporidioze zaenkrat še ni, zato sta preprečevanje okužbe ter hitra in učinkovita diagnostika zelo pomembna (Petry, 2000).

Rutinska diagnostika kryptosporidioze večinoma temelji na svetlobni in fluorescenčni mikroskopiji. Diagnostična moč teh metod pogosto zavisi od izkušenj laboratorijskega osebja. Razvoj molekularno bioloških metod, predvsem PCR in njenih različic, predstavlja pomemben napredok pri proučevanju kryptosporidijev in kryptosporidioze. Molekularno biološke metode so namreč visoko občutljive in specifične. Njihova prednost je tudi zmožnost ločevanja med vrstami in genotipi kryptosporidijev, kar omogoča epidemiološko spremeljanje okužb (Casemore in sod., 1985; Predraza-Diaz in sod., 2000). Uvedba molekularno bioloških metod v vsakodnevno diagnostiko kryptosporidioze bi pomembno prispevala k nadzoru nad okužbami in s tem k preprečevanju njihovega širjenja.

5.1.1 Optimizacija PCR v realnem času za pomnoževanje DNA kryptosporidijev

V diplomskem delu smo optimizirali multiplo PCR v realnem času za sočasno pomnoževanje dela gena za 18S rRNA kryptosporidijev in pomnoževanje polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum*. Gre torej za rod *Cryptosporidium* in vrsto *C. parvum* specifično multiplo PCR v realnem času. Pogoje pomnoževanja in sestavo reakcijske mešanice smo povzeli po članku avtorjev Jothikumar in sod. (2008) in jih optimizirali za aparaturo StepOneTM Real-time PCR System.

Pri optimizaciji smo spremenjali koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond ter temperaturo pripenjanja začetnih oligonukleotidov. S pomočjo računalniškega programa StepOneTM Software v2.0 smo iz rezultatov pomnoževanja DNA izrisali standardne krivulje in iz podatka o naklonu linearne regresijske premice izračunali učinkovitost reakcije pomnoževanja DNA kryptosporidijev E (%). Na podlagi podatkov o učinkovitosti in koeficientu variacij R^2 smo določili pogoje, ki so bili za sočasno pomnoževanje obeh zaporedij najbolj optimalni.

Pri ugotavljanju najugodnejše končne koncentracije začetnih oligonukleotidov smo preizkusili naslednje koncentracije le-teh: 200 nM, 250 nM, 300 nM in 500 nM. Za optimalno smo določili 200 nM koncentracijo. Ta koncentracija začetnih oligonukleotidov je bila nižja od tiste (250 nM), ki so jo uporabili Jothikumar in sod. (2008). Pri 200 nM koncentraciji sta bili učinkovitost pomnoževanja dela gena za 18S rRNA kriptosporidijev (96,73 %) in učinkovitost pomnoževanja polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo *C. parvum* (98,21 %) na aparaturi StepOneTM Real-time PCR System namreč v kombinaciji najvišji in hkrati v zahtevanih mejah.

Pri ugotavljanju najustreznejše končne koncentracije sond smo preizkusili 50 nM, 100 nM, 150 nM in 250 nM koncentracijo. Kot optimalno smo določili 250 nM koncentracijo, torej višjo (100 nM) kot so jo uporabili Jothikumar in sod. (2008). V primerjavi z učinkovitostmi reakcije ob ostalih koncentracijah sond sta bili učinkovitosti pomnoževanja dela gena za 18S rRNA kriptosporidijev (99,15 %) in polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo *C. parvum* (100,03 %) na aparaturi StepOneTM Real-time PCR System pri 250 nM koncentraciji v kombinaciji najvišji. Pri 250 nM koncentraciji sond je bila pri pomnoževanju obeh zaporedij najvišja tudi intenziteta fluorescenčnega signala.

Pri ugotavljanju optimalne temperature pripenjanja začetnih oligonukleotidov smo preizkusili pet različnih temperatur (52 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 58 °C). Kot optimalno smo določili temperaturo 55 °C, enako kot so uporabili Jothikumar in sod. (2008). Pri tej temperaturi je bila učinkovitost pomnoževanja dela gena za 18S rRNA kriptosporidijev 96,99 %, učinkovitost pomnoževanja polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo *C. parvum* pa 94,07 %. Za to temperaturo smo se odločili kljub temu, da je bila učinkovitost pomnoževanja polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo *C. parvum* nekoliko višja (98,35 %) pri temperaturi 58 °C, saj je bila intenziteta fluorescenčnega signala pomnoževanja dela gena za 18S rRNA kriptosporidijev in tudi pomnoževanja polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum* višja pri temperaturi 55 °C. Pri temperaturi 55 °C je koeficient variacije za pomnoževanje dela gena za 18S rRNA kriptosporidijev znašal 1,000 in je bil torej višji kot pri temperaturi 58 °C (0,999). Koeficient variacije za pomnoževanje polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo *C. parvum* je pri temperaturi 55 °C tako kot pri temperaturi 58 °C znašal 0,999.

Specifičnost PCR-pridelkov multiple PCR v realnem času smo pri optimizaciji preverjali z agarozno gelsko elektroforezo. Specifičnost PCR-pridelkov je določevala njihova velikost, 159 bp za pomnožke dela gena za 18S rRNA kriptosporidijev in 72 bp za pomnožke regije gena z neopredeljeno vlogo *C. parvum*.

Uspešnost pomnoževanja DNA kriptosporidijev z optimiziranim protokolom smo preverili na 21 vzorcih osamljene DNA, za katere smo vedeli, da je v njih prisotna DNA kriptosporidijev. Vzorci so vsebovali DNA *C. parvum* ali *C. hominis* ali *C. bovis* ali genotipa kriptosporidijev jelenov. V vseh vzorcih smo DNA kriptosporidijev z

optimiziranim protokolom uspešno pomnožili, razen v vzorcu, ki je vseboval DNA vrste *C. bovis*. DNA te vrste se z optimiziranim protokolom ni pomnožila, saj uporabljeni začetni oligonukleotidi pomnoževanja DNA omenjene vrste ne omogočajo (Jothikumar in sod., 2008).

5.1.2 Ugotavljanje prisotnosti kriptosporidijev v kliničnih vzorcih

Z DIF in optimiziranim protokolom multiple PCR v realnem času smo testirali 131 vzorcev blata bolnikov z gastroenteritisom, ki smo jih zbrali v času od 5. junija 2010 do 25. novembra 2010. Med njimi je 56 (42,75 %) vzorcev pripadalo ženskam in 75 (57,25 %) moškim. Povprečna starost bolnikov, vključenih v raziskavo, je bila 30,6 leta.

Najprej smo razmaze zbranih vzorcev blata bolnikov pregledali na prisotnost oocist kriptosporidijev s komercialno dostopnim testom Merifluor® *Cryptosporidium/Giardia*. Prisotnost oocist kriptosporidijev smo ugotovili v 3/131 (2,29 %) vzorcih blata.

Iz vseh 131 vzorcev blata smo nato osamili DNA. Za osamitev smo uporabili komercialni komplet reagentov QIAamp® DNA Stool Mini Kit. Glede na rezultate PCR v realnem času bi metodo osamitve lahko ocenili kot primerno, vendar precej zamudno, zato bi bilo potrebno nadaljnje raziskave usmeriti v razvoj hitrejšega ali celo avtomatiziranega načina osamitve DNA iz blata.

Vzorce osamljene DNA kriptosporidijev smo testirali z optimizirano multiplo PCR v realnem času. Pozitivnost vzorcev smo v naši raziskavi vrednotili s sigmoidno krivuljo in C_T , ki ju izpisuje računalniški program. S PCR v realnem času smo ugotovili 4/131 (3,05 %) pozitivne vzorce, torej vzorce, pri katerih se je DNA kriptosporidijev uspešno pomnožila. Vsi pozitivni vzorci so pripadali bolnikom moškega spola. Odstotek okuženih moških je tako znašal 5,33 % (4/75). Bolniki so bili stari 7, 26, 38 in 64 let. Povprečna starost bolnikov je torej znašala 33,8 let. V raziskavah, opravljenih drugod po svetu, ugotavlja, da je kriptosporidioza pogostejša pri otrocih, mlajših od pet let (Verweij in sod., 2004; Casemore in sod., 1997; Huang in White, 2006). Tega z našo raziskavo ne moremo ne potrditi ne ovreči, saj smo imeli prenizko število pozitivnih vzorcev in najbrž premajhno število vzorcev nasploh, da bi lahko prišli do signifikantnih zaključkov. Pri treh od štirih pozitivnih bolnikov smo s PCR v realnem času ugotovili okužbo z vrsto *C. parvum*, pri enem pa okužbo z vrsto kriptosporidijev, ki ni bila *C. parvum*. V svoji raziskavi tudi Šoba (2009) navaja, da pri ljudeh v Sloveniji kriptosporidiozo najpogosteje povzroča vrsta *C. parvum*, kar pomeni, da so poglavitni vir okužb ljudi pri nas okužene živali. Pri dveh od štirih bolnikov so bili kriptosporidiji edini parazitski povzročitelji gastroenteritisa, pri dveh pa je šlo za sočasno okužbo s praživaljo *Giardia intestinalis*.

Pri vseh treh vzorcih, v katerih smo ugotovili prisotnost DNA vrste *C. parvum*, je bil C_T pomnoževanja dela gena za 18S rRNA kryptosporidijev za približno pol cikla nižji kot C_T pomnoževanja polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum*. Povprečni C_T pomnoževanja dela gena za 18S rRNA kryptosporidijev je znašal 24,5, povprečni C_T pomnoževanja polimorfne regije gena z neopredeljeno vlogo vrste *C. parvum* pa 25,1. Tudi avtorji drugih podobnih raziskav poročajo o primerljivih vrednostih C_T (ten Hove in sod., 2007; Verweij in sod., 2004). V vzorcu, v katerem smo ugotovili prisotnost vrste kryptosporidijev, ki ni bila *C. parvum*, je bil C_T pomnoževanja dela gena za 18S rRNA kryptosporidijev precej višji, in sicer je znašal 35,0.

Po primerjavi C_T pomnoževanja dela gena za 18S rRNA kryptosporidijev smo v skladu s pričakovanji ugotovili, da je bil C_T (35,0) vzorca, ki je bil pozitiven le s PCR v realnem času, znatno višji od povprečnega C_T (24,5) vzorcev, ki so bili pozitivni tako s PCR v realnem času kot z DIF. V vzorcu, ki je bil pozitiven le po testiranju s PCR v realnem času, je bilo najverjetnejše toliko manj oocist kryptosporidijev, da jih z DIF nismo mogli zaznati. Omenjen vzorec je bil pozitiven tudi na pražival *G. intestinalis*, zato obstaja možnost, da smo zaradi nizkega števila oocist kryptosporidijev le-te z DIF, s katerim sočasno ugotavljamo ciste giardij in oociste kryptosporidijev, spregledali. Če upoštevamo C_T pomnoževanja DNA *G. intestinalis*, ki je za omenjen vzorec znašal 30,5, lahko sklepamo, da kryptosporidiji niso bili nujno (glavni) vzrok gastroenteritisa pri tem bolniku. Prisotnost DNA kryptosporidijev v omenjenem vzorcu smo potrdili tudi s klasično vgnezdeno PCR (rezultati niso prikazani) in agarozno gelsko elektroforezo, tako da prisotnost kryptosporidijev v vzorcu ni dvomljiva.

5.1.3 Primerjava DIF in PCR v realnem času

Po primerjavi rezultatov ugotavljanja prisotnosti kryptosporidijev z DIF in PCR v realnem času smo ugotovili, da so se rezultati omenjenih testov ujemali pri 130 od 131 (99,2 %) vzorcev, pri enem (0,8 %) pa ne. Verižna reakcija s polimerazo v realnem času je pri tem vzorcu dala pozitiven rezultat, medtem ko pri tem vzorcu z DIF oocist kryptosporidijev nismo zaznali.

Na podlagi rezultatov PCR v realnem času smo izračunali specifičnost in občutljivost DIF. Podobno kot v raziskavah nekaterih drugih avtorjev smo pri računanju privzeli 100 % občutljivost in specifičnost PCR v realnem času.

Pri izračunu specifičnosti DIF smo kot resnično negativne upoštevali vzorce, pri katerih s PCR v realnem času nismo ugotovili prisotnosti DNA kryptosporidijev. Teh vzorcev je bilo 127. Pri nobenem izmed 127 vzorcev z DIF nismo ugotovili prisotnosti oocist, tako da je bila specifičnost DIF 100 %. 100 % specifičnost testa navaja tudi proizvajalec Meridian Bioscience Inc. Z neposrednim imunofluorescenčnim testom bi torej pri hipotetično 100

osebah, obolelih za kriptosporidiozo, pravilno diagnosticirali okužbo v vseh primerih. Naše ugotovitve se skladajo tudi z drugimi raziskavami, ki poročajo o 100 % specifičnosti DIF (Chalmers in sod., 2011).

Občutljivost DIF smo izračunali tako, da smo kot resnično pozitivne upoštevali vzorce, pri katerih smo s PCR v realnem času ugotovili prisotnost DNA kriptosporidijev. Takšni vzorci so bili štirje. Ker smo z DIF pravilno ugotovili prisotnost oocist kriptosporidijev pri 3 vzorcih, lahko povemo, da je bila občutljivost DIF v naši raziskavi 75,0 %. To pomeni, da bi z neposrednim imunofluorescenčnim testom pri hipotetično 100 obolelih za kriptosporidiozo pravilno diagnosticirali okužbo v 75 primerih. V 25 primerih bi bili rezultati lažno negativni. Po navedbah proizvajalca neposrednega imunofluorescenčnega testa Meridian Bioscience Inc je njegova občutljivost 95-100 %. Prav tako tudi Chalmers in sod. (2011) poročajo o precej višji (97,4 %) občutljivosti DIF, kot smo jo ugotovili v naši raziskavi. Občutna razlika med ugotovitvami naše raziskave v primerjavi z navedbami proizvajalca in drugimi raziskavami je verjetno posledica tega, da smo z našo raziskavo zajeli le manjše število na kriptosporidije pozitivnih bolnikov, prav tako pa bi morali za bolj zanesljive rezultate v raziskavo vključiti večje število vzorcev. V naši raziskavi zato že razlike v rezultatih posameznega vzorca močno vplivajo na izračun občutljivosti testa.

Tekom PCR lahko na pomnoževanje tarčne DNA močno vpliva prisotnost inhibitorjev reakcije v vzorcu. V vzorcih blata je takšnih inhibitorjev izredno veliko. Pri osamitvi DNA iz vzorcev je zato ključnega pomena njihova odstranitev. V naši raziskavi smo ugotovljali prisotnost inhibitorjev PCR z uporabo interne kontrole. Izmed 131 vzorcev smo inhibicijo ugotovili pri enem vzorcu (0,76 %). Ta vzorec smo 10-krat redčili in ponovili tako reakcijo pomnoževanja interne kontrole kot tudi reakcijo pomnoževanja DNA kriptosporidijev. Po redčenju se je interna kontrola pomnožila, DNA kriptosporidijev pa ne, zato smo vzorec obravnavali kot negativen na kriptosporidije. Sočasno z našo raziskavo je potekala tudi raziskava, v kateri so v istih vzorcih blata ugotovljali prisotnost DNA *G. intestinalis* (Lebar, 2012). Omenjen vzorec se je v tej raziskavi izkazal za pozitivnega na *G. intestinalis* šele po 10-kratnem redčenju. Vključitev interne kontrole za ugotavljanje prisotnosti inhibitorjev PCR je torej smiselna, saj bi v nasprotnem primeru ostal ta vzorec lažno negativen.

Poleg interne kontrole smo v reakciji pomnoževanja DNA kriptosporidijev vključili tudi pozitivno in negativno kontrolo pomnoževanja. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili pozitiven vzorec DNA vrste *C. parvum*. Služila nam je za preverjanje pravilne priprave reakcijske mešanice in poteka PCR v realnem času. V vseh zagonih reakcij se je pozitivna kontrola uspešno pomnožila. Negativna kontrola, kjer smo DNA nadomestili s sterilno vodo brez nukleazne aktivnosti, je ostala pri vseh zagonih negativna, iz česar lahko sklepamo, da pri pripravi reakcijske mešanice ni prišlo do kontaminacije.

Z našo raziskavo smo pokazali, da je multipla PCR v realnem času občutljivejša v primerjavi z DIF. O višji občutljivosti verižne reakcije s polimerazo poročajo tudi avtorji raziskav drugod po svetu (ten Hove in sod., 2009; Amar in sod., 2007; Jothikumar in sod., 2008; Chalmers in sod., 2011). Multipla PCR v realnem času je tudi visoko specifična in zaradi možnosti sočasnega ugotavljanja več vrst kriptosporidijev ali celo več različnih organizmov predstavlja izjemno hitro in hkrati natančno diagnostično orodje. Zelo uporabna je naprimer visoko specifična in občutljiva multipla PCR v realnem času, ki so jo razvili Verweij in sod. (2004). Omogoča namreč sočasno ugotavljanje treh parazitskih praživali, ki so najpogostešji povzročitelji driske – *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* in *Cryptosporidium parvum*. S to raziskavo so avtorji pokazali, da ni razlik v specifičnosti in občutljivosti, če pomnožujemo tarčno DNA v ločenih reakcijah PCR ali z multiplo PCR.

Prednost visoke občutljivosti PCR v realnem času za ugotavljanje okužb s kriptosporidiji pa je včasih vprašljiva. Visoka občutljivost diagnostičnih testov je vsekakor dobrodošla v primeru imunsko oslabljenih bolnikov, ki jih kriptosporidioza lahko življenjsko ogrozi. Pri osebah z normalno imunostjo pa ni vedno smiselno ugotavljati nizko pozitivnih vzorcev. Visoko občutljive metode nam sicer omogočajo odkrivanje prenašalcev okužb, vendar nas po drugi strani lahko pozitiven rezultat zavede. Zgodi se namreč lahko, da kriptosporidiji niso povzročitelji gastroenteritisa, pa zaradi pozitivnega rezultata visoko občutljivega testa ostalih možnih povzročiteljev bolezni ne ugotavljamo. Rezultate testiranj je zato vedno potrebno interpretirati razumno in ob upoštevanju klinične slike bolnika.

Klasične metode ugotavljanja okužb s kriptosporidiji bodo kljub nižji občutljivosti zaradi nizke cene ter enostavne izvedbe najverjetneje še precej časa prevladovale v rutinski diagnostiki kriptosporidioze. Uvajanje PCR v realnem času v rutinsko diagnostiko poleg visokih začetnih stroškov ovira tudi potreba po izurjenem laboratorijskem osebju ter standardizaciji in validaciji postopkov osamitve DNA in njenega pomnoževanja. Le na ta način lahko namreč primerjamo rezultate testiranj med različnimi laboratorijimi, kar je izrednega pomena pri uvedbi molekularno bioloških preiskav v vsakodnevno diagnostiko kriptosporidioze.

5.2 SKLEPI

- Optimizirali smo multiplo PCR v realnem času, specifično za rod *Cryptosporidium* in vrsto *C. parvum*, na aparaturi StepOne™ Real-time PCR System. Kot optimalne pogoje pomnoževanja DNA kriptosporidijev smo določili 200 nM koncentracijo začetnih oligonukleotidov, 250 nM koncentracijo sond in temperaturo pripenjanja začetnih oligonukleotidov 55 °C.
- Z optimiziranim protokolom multiple PCR v realnem času smo testirali 131 vzorcev blata bolnikov, obolelih za gastroenteritisom, in rezultate primerjali z rezultati neposrednega imunofluorescenčnega testa (DIF). Od skupno 131 vzorcev smo z DIF okužbo s kriptosporidijami ugotovili pri 3 (2,29 %) bolnikih, z multiplo PCR v realnem času pa pri 4 (3,05 %) bolnikih.
- Pri treh od štirih pozitivnih vzorcev blata smo z multiplo PCR v realnem času ugotovili prisotnost vrste *C. parvum*, pri enem vzorcu pa prisotnost vrste kriptosporidijev, ki ni bila *C. parvum*.
- C_T vzorca (35,0), ki je bil pozitiven le z multiplo PCR v realnem času, ne pa tudi z DIF, je bil višji od povprečnega C_T vzorcev (24,5), ki so bili pozitivni tako z multiplo PCR v realnem času kot tudi z DIF.
- Na podlagi rezultatov multiple PCR v realnem času smo izračunali specifičnost in občutljivost DIF. Specifičnost DIF je bila 100 %, občutljivost DIF pa 75 %.
- Z našo raziskavo smo ugotovili, da je multipla PCR v realnem času občutljivejša v primerjavi z DIF.
- Menimo, da je PCR v realnem času zaradi visoke specifičnosti in občutljivosti primerna predvsem za diagnostiko kriptosporidioze pri imunsko oslabljenih bolnikih z drisko in v primeru, ko poskušamo ugotoviti vir te okužbe.

6**VIRI**

- Abrahamsen M.S. 2001. *Cryptosporidium parvum* genome project. Comparative and Functional Genomics, 2: 19-21
- Abrahamsen M.S., Templeton T.J., Enomoto S., Abrahante J.E., Zhu G., Lancto C.A., Deng M., Liu C., Widmer G., Tzipori S., Buck G.A., Xu P., Bankier A.T., Dear P.H., Konfortov B.A., Spriggs H.F., Iyer L., Anantharaman V., Aravind L., Kapur V. 2004. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. Science, 304: 441-445
- Amar C.F.L., East C.L., Gray J., Iturriza-Gomara M., Maclure E.A., McLauchlin J. 2007. Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4627 faecal samples: re-examination of the english case-control infectious disease study (1993-1996). European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 26: 311-323
- Arrowood M.J. 1997. Diagnosis. V: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer R. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 43-64
- Barta J.R., Thompson A.R.C. 2006. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. Trends in Parasitology, 22: 463-468
- Baxby D., Blundell N., Hart C.A. 1984. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. Journal of Hygiene, 93: 317-323
- Benitez A.J., McNair N., Mead J.R. 2009. Oral immunization with attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium encoding *Cryptosporidium parvum* Cp23 and Cp40 antigens induces a specific immune response in mice. Clinical and Vaccine Immunology, 16: 1272-1278
- Berkman D.S., Lescano A.G., Gilman R.H., Lopez S.L., Black M.M. 2002. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. Lancet, 359, 9306: 564-571
- Bjarnason I., Sharpstone D.R., Francis N., Marker A., Taylor C., Barrett M., Macpherson A., Baldwin C., Menzies I.S., Crane R.C., Smith T., Pozniak A., Gazzard B.G. 1996. Intestinal inflammation, ileal structure and function in HIV. AIDS, 10: 1385-1391
- Blagburn B.L., Soave R. 1997. Prophylaxis and chemotherapy: Human and animal. V: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer R. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 111-128

Bonnin A., Dubremetz J.F., Camerlynck P. 1991. Characterization and immunolocalization of an oocyst wall antigen of *Cryptosporidium parvum* (Protozoa: Apicomplexa). *Parasitology*, 103, 2: 171-177

Bonnin A., Lapillonne A., Petrella T., Lopez J., Chaponnier C., Gabbiani G., Robine S., Dubremetz J.F. 1999. Immunodetection of the microvillous cytoskeleton molecules villin and ezrin in the parasitophorous vacuole wall of *Cryptosporidium parvum* (Protozoa: Apicomplexa). *European Journal of Cell Biology*, 78: 794-801

Borad A., Ward H. 2010. Human immune responses in cryptosporidiosis. *Future Microbiology*, 5: 507-519

Borowski H., Thompson R.C., Armstrong T., Clode P.L. 2010. Morphological characterization of *Cryptosporidium parvum* life-cycle stages in an *in vitro* model system. *Parasitology*, 20: 1-14

Bull S., Chalmers R., Sturdee A.P., Curry A., Kennaugh J. 1998. Cross-reaction of an anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody with sporocysts of *Monocystis* species. *Veterinary Parasitology*, 77: 195-197

Burton A.J., Nydam D.V., Jones G., Zambriski J.A., Linden T.C., Cox G., Davis R., Brown A., Bowman D.D. 2010. Antibody responses following administration of a *Cryptosporidium parvum* rCP15/60 vaccine to pregnant cattle. *Veterinary Parasitology*, 10: 176–181.

Caccio S.M. 2005. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parassitologia*, 47: 185-192

Carreno R.A., Martin D.S., Barta J.R. 1999. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research*, 85: 899-904

Casemore D.P., Armstrong M., Sands R.L. 1985. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Pathology*, 38: 1337-1341

Casemore D.P., Wright S.E., Coop R.L. 1997. Cryptosporidiosis – human and animal epidemiology. V: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer R. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 65-92

CDC. 2012a. Wet mount. Atlanta, CDC – Center for Disease Control and Prevention: 1 str.
<http://www.cdc.gov/> (april 2012)

CDC. 2012b. Modified acid-fast stain. Atlanta, CDC – Center for Disease Control and Prevention: 1 str.

<http://www.cdc.gov/> (april 2012)

Chalmers R.M., Campbell B.M., Crouch N., Charlett A., Davies A.P. 2011. Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven *Cryptosporidium* assays used in the UK. Journal of Medical Microbiology, 60: 1598-1604

Chen X.M., Keithly J.S., Paya C.V., LaRusso N.F. 2002. Cryptosporidiosis. New England Journal of Medicine, 346, 22: 1723-1731

Chen X.M., LaRusso N.F. 2000. Mechanisms of attachment and internalization of *Cryptosporidium parvum* to biliary and intestinal epithelial cells. Gastroenterology, 118: 368-379

Chen X.M., Levine S.A., Splinter P.L., Tietz P.S., Ganong A.L., Jobin C., Gores G.J., Paya C.V., LaRusso N.F. 2001. *Cryptosporidium parvum* activates nuclear factor κB in biliary epithelia preventing epithelial cell apoptosis. Gastroenterology, 120, 7: 1774-1783

Chen X.M., O'Hara S.P., Huang B.Q., Nelson J.B., Lin J.J.C., Zhu G., Ward H.D., LaRusso N.F. 2004. Apical organelle discharge by *Cryptosporidium parvum* is temperature, cytoskeleton, and intracellular calcium dependent and required for host cell invasion. Infection and Immunity, 72: 6806-6816

Chichino G., Bruno A., Cevini C., Atzori C., Gatti S., Scaglia M. 1991. New rapid staining methods of *Cryptosporidium* oocysts in stool. Journal of Protozoology, 38: 212-214

Clark D.P. 1999. New insights into human cryptosporidiosis. Clinical Microbiology Reviews, 12: 554-563

Coombs G.H. 1999. Biochemical peculiarities and drug targets in *Cryptosporidium parvum*: lessons from other coccidian parasites. Parasitology Today, 15: 333-338

Current W.L., Garcia L.S. 1991. Cryptosporidiosis. Clinical Microbiology Reviews, 4: 325-358

Current W.L., Reese N.C. 1986. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. Journal of Protozoology, 33: 98-108

Dietz V., Vugia D., Nelson R., Wicklund J., Nadle J., Gibbs-Mccombs K., Reddy S. 2000. Active, multisite, laboratory-based surveillance for *Cryptosporidium parvum*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 62, 3: 368-372

Dillingham R.A., Lima A.A., Guerrant R.L. 2002. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection*, 4: 1059-1066

Dragaš A.Z. 1998. Mikrobiologija z epidemiologijo, Ljubljana, DZS: 95 str.

DuPont H., Chappell C., Sterling C.R., Okhuysen P.C., Pose J.B., Jakobowski W. 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *New England Journal of Medicine*, 332: 855-859

Egyed Z., Sréter T., Széll Z., Varga I. 2003. Characterization of *Cryptosporidium* spp. – recent developments and future needs. *Veterinary Parasitology*, 111: 103-114

Elliot A., Morgan U.M., Thompson R.C. 1999. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. *Journal of General and Applied Microbiology*, 45: 139-142

Elliott D.A., Clark D.P. 2000. *Cryptosporidium parvum* induces host cell actin accumulation at the host-parasite interface. *Infection and Immunity*, 68: 2315-2322

EPA. 2012. Cryptosporidium image sequence 1. New York, EPA – Environmental Protection Agency: 1 str.

http://www.epa.gov/microbes/cpt_seq1.html (april, 2012)

Farrington M., Winters S., Walker C., Miller R., Rubenstein D. 1994. *Cryptosporidium* antigen detection in human feces by reverse passive hemagglutination assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 2755-2759

Fayer R. 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, 126: 37-56

Fayer R. 2008. General biology. V: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer R., Xiao L. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 1-43

Fayer R., Morgan U., Upton S. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 30, 12-13: 1305-1322

Fayer R., Speer C.A., Dubey J.P. 1997. The general biology of *Cryptosporidium*. V: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer R. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 1-41

Fayer R., Ungar B.L.P. 1986. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiological Reviews*, 50: 458-483

Feng H., Nie W., Sheoran A., Zhang Q., Tzipori S. 2006. Bile acids enhance invasiveness of *Cryptosporidium* spp. into cultured cells. *Infection and Immunity*, 74: 3342-3364

- Frost F.J., Muller T., Craun G.F., Frasier D., Thompson D., Notenboom R., Calderon R.L. 2000. Serological analysis of a cryptosporidiosis epidemic. International Journal of Epidemiology, 29: 376–379
- Galazka J., Striepen B., Ullman B. 2006. Adenosine kinase from *Cryptosporidium parvum*. Molecular and Biochemical Parasitology, 149: 223-230
- Godiwala N.T., Vandewalle A., Ward H.D., Leav B.A. 2006. Quantification of *in vitro* and *in vivo* *Cryptosporidium parvum* infection by using real-time PCR. Applied and Environmental Microbiology, 72, 6: 4484-4488
- Gordis L. 2004. Epidemiology. 3rd ed. Philadelphia, Elsevier Saunders: 323 str.
- Harris J.R., Adrian M., Petry F. 2004. Amylopectin: a major component of the residual body in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Parasitology, 128: 269-282
- Henriksen S.A., Pohlenz J.F.L. 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. Acta Veterinaria Scandinavica, 22: 594-596
- Herzog-Velikonja B., Gruden K. 2008. Praktikum iz molekularne biologije-teoretični del. Ljubljana, Scripta: 104 str.
- Hill B.D., Blewett D.A., Dawson A.M., Wright S.E. 1990. Analysis of the kinetics, isotype and specificity of serum and coproantibody in lambs infected with *Cryptosporidium parvum*. Research in Veterinary Science, 48: 76-81
- Hong-Xuan H., Lei C., Cheng-Min W., Kai Z., Yi T., Xi-Ming Q., Ming-Xing D. 2005. Expression of the recombinant fusion protein CP15–23 of *Cryptosporidium parvum* and its protective test. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 5: 1292–1296
- Huang B.Q., Chen X.M., LaRusso N.F. 2004. *Cryptosporidium parvum* attachment to and internalization by human biliary epithelia *in vitro*, a morphological study. Journal of Parasitology, 90: 212-221
- Huang D.B., White A.C. 2006. An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. Gastroenterology Clinics of North America, 35, 2: 291-314
- Innis M.A., Gelfand D.H. 1990. Optimization of PCR. V: PCR protocols: a guide to methods and applications. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (eds.). San Diego, Academic Press: 3-12
- Jenkins M.C. 2004. Present and future control of cryptosporidiosis in humans and animals. Expert Review of Vaccines, 3: 669–671

- Joe A., Verdon R., Tzipori S., Keusch G.T., Ward H.D. 1998. Attachment of *Cryptosporidium parvum* sporozoites to human intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 66: 3429-3432
- Johnston S.P., Ballard M.M., Beach M.J., Causer L., Wilkins P.P. 2003. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 2: 623-626
- Jothikumar N., da Silva A.J., Moura I., Qvarnstrom Y., Hill V.R. 2008. Detection and differentiation of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* by dual TaqMan assays. *Journal of Medical Microbiology*, 57: 1099-1105
- Karanis P., Aldeyebi H.M. 2011. Evolution of *Cryptosporidium* *in vitro* culture. *International Journal for Parasitology*, 41: 1231-1242
- Karanis P., Kourenti C., Smith H. 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *Journal of Water and Health*, 5, 1: 1-38
- Kehl K.S., Cicirello H., Havens P.L. 1995. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 416-418
- King B.J., Hoefel D., Lim S.P., Robinson B.S., Monis P.T. 2009. Flow cytometric assessment of distinct physiological stages within *Cryptosporidium parvum* sporozoites post-excystation. *Parasitology*, 136: 953-966
- Koch K.L., Phillips D.J., Aber R.C., Current W.L. 1985. Cryptosporidiosis in hospital personnel. Evidence for person-to-person transmission. *Annals of Internal Medicine*, 102: 593-596
- Korich D.G., Mead J.R., Madore M.S., Sinclair N.A., Sterling C.R. 1990. Effect of ozone, chlorine dioxide, chlorine and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 5: 1423-1428
- LaGier M.J., Zhu G., Keithly J.S. 2001. Characterization of a heavy metal ATPase from the apicomplexan *Cryptosporidium parvum*. *Gene*, 266: 25-34
- Laxer M.A., Timblin B.K., Patel R.J. 1991. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 45: 688-694
- Leander B.S., Clopton R.E., Keeling P.J. 2003. Phylogeny of gregarines (Apicomplexa) as inferred from small-subunit rDNA and beta-tubulin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 345-354

Leav B.A., Mackay M., Ward H.D. 2003. *Cryptosporidium* species: new insights and old challenges. Clinical Infectious Diseases, 36, 7: 903-908

Lebar P. 2012. Ugotavljanje okužb s parazitom *Giardia intestinalis* z verižno reakcijo s polimerazo. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 49 str.

Lefkowitch J.H., Krumholz S., Feng-Chen K.C., Griffin P., Despommier D., Brasitus T.A. 1984. Cryptosporidiosis of the human small intestine: a light and electron microscopic study. Human Pathology, 15: 746-752

Levine N.D. 1985. Phylum II Apicomplexa Levine 1970. V: An Illustrated Guide to the Protozoa. Lee J.J., Hunter S.H., Bovee E.C. (eds.). Lawrence, Allen Press: 322-374

Liu K., Zai D., Zhang D., Wei Q., Han G., Gao H., Huang B. 2010. Divalent Cp15–23 vaccine enhances immune responses and protection against *Cryptosporidium parvum* infection. Parasite Immunology, 32: 335–344

Logar J. 1999. Parazitologija v medicini. 1. izd. Ljubljana, DZS: 228 str.

Logar J. 2010. Parazitologija človeka. 1. izd. Radovljica, Didakta: 269 str.

Lumb R., Smith K., O'Donoghue P.J., Lancer J.A. 1988. Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells. Parasitology Research, 74: 531-536

Ma P., Soave R. 1983. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. Journal of Infectious Diseases, 147: 824-828

Mackay I.M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical Microbiology and Infection, 10: 190-212

Mac Kenzie W.R., Hoxie N.J., Proctor M.E., Gradus M.S., Blair K.A., Peterson D.E., Kazmierczak J.J., Addiss D.G., Fox K.R., Rose J.B., Davis J.P. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. New England Journal of Medicine, 331: 161-167

Mak J.W. 2004. Important zoonotic intestinal protozoan parasites in Asia. Tropical Biomedicine, 21: 39-50

Marolt-Gomišek M., Radšel-Medvešček A. 2002. Infekcijske bolezni. Ljubljana, Tangram: 632 str.

Matsabayashi M., Ando H., Kimata I., Nakagawa H., Furuya M., Tani H., Sasai K. 2010. Morphological changes and viability of *Cryptosporidium parvum* sporozoites after excystation in cell-free culture media. Parasitology, 137: 1861-1866

Meisel J.L., Perera D.G., Meligro B.S., Rubin M.D. 1976. Overwhelming wasting diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunodepressed patient. *Gastroenterology*, 70: 1156-1160

Mitschler R.R., Welti R., Upton S.J. 1994. A comparative study of lipid compositions of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa) and Madin-Darby bovine kidney cells. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 41, 1: 8-12

Montero J.A., Sinnott J.T., Holt D.A., Lloyd C. 2001. Biliary cryptosporidiosis: current concepts. *Infections in Medicine*, 18, 6: 312-316

Morgan-Ryan U.M., Fall A., Ward L.A., Hijjawi N., Sulaiman I., Fayer R., Thompson R.C., Olson M., Lal A., Xiao L. 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49: 433-440

Morgan U.M., Pallant L., Dwyer B.W., Forbes D.A., Rich G., Thompson R.C. 1998. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 995-998

Morgan U., Weber R., Xiao L., Sulaiman I., Thompson R.C., Ndiritu W., Lal A.A., Moore A., Deplazes P. 2000. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 1180-1183

Moss D.M., Chappel C.L., Okhuysen P.C., DuPont H.L., Arrowood M.J., Hightower A.W., Lammie P.J. 1998. The antibody response to 27-, 17- and 15-kDa *Cryptosporidium* antigens following experimental infection in humans. *Journal of Infectious Diseases*, 178: 827-833.

Muller T.B., Frost F.J., Craun G.F., Calderon R.L. 2001 Serological responses to *Cryptosporidium* infection. *Infection and Immunity*, 69, 3: 1974-1975

Nesterenko M.V., Woods K., Upton S.J. 1997. Effects of manganese salts on the AIDS-related pathogen, *Cryptosporidium parvum* *in vitro* and *in vivo*. *Biological Trace Element Research*, 56: 243-253

Nime R.A., Burek J.D., Page D.L., Holscher M.A., Yardley J.H. 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, 70: 592-598

O'Donoghue P.J. 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology*, 25: 139-195

Pantenburg B., Dann S.M., Wang H.C., Robinson P., Castellanos-Gonzalez A., Lewis D.E., White A.C. 2008. Intestinal immune response to human *Cryptosporidium* sp. infection. *Infection and Immunity*, 76: 23-29

Pedraza-Diaz S., Amar C., McLauchlin J. 2000. The identification and characterization of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. *FEMS Microbiology Letters*, 189: 189-194

Peng M.M., Xiao L., Freeman A.R., Arrowood M.J., Escalante A.A., Weltman A.C., Ong C.S., Mac Kenzie W.R., Lal A.A., Beard C.B. 1997. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerging Infectious Diseases*, 3: 567-573

Petry F. 2000. *Cryptosporidiosis and microsporidiosis*. Basel, Karger: 268 str.

Plutzer J., Karanis P. 2009. Genetic variation in *Cryptosporidium*. *Veterinary Parasitology*, 165: 187-199

Pohjola S., Jokipii L., Jokipii A.M. 1984. Dimethylsulphoxide-Ziehl-Neelsen staining technique for detection of cryptosporidial oocysts. *Veterinary Record*, 116: 442-443

Poljak M., Avšič-Županc T., Seme K. 1994. Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Medicinski razgledi*, 33: 379-400

Pozio E. 2008. Epidemiology and control prospects of foodborne parasitic zoonoses in the European Union. *Parassitologia*, 50, 1-2: 17-24

Putignani L., Menichella. 2010. Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2010, 1: 1-39

Quílez J., Sánchez-Aedo C., Clavel A., del Cacho E., López-Bernad F. 1996. Comparison of an acid-fast stain and a monoclonal antibody-based immunofluorescence reagent for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faecal specimens from cattle and pigs. *Veterinary Parasitology*, 67: 75-81

Racourt C.P. 2007. Worldwide human zoonotic cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium felis*. *Parasite*, 14: 15-20

Redeker D.W., Speer C.A., Blixt J.A. 1985. Ultrastructure of *Cryptosporidium parvum* oocysts and excysting sporozoites as revealed by high resolution scanning electron microscopy. *Journal of Protozoology*, 32, 4: 708-711

Rider S.D., Zhu G. 2010. *Cryptosporidium*: genomic and biochemical features. *Experimental Parasitology*, 124: 2-9

- Robinson G., Elwin K., Chalmers R.M. 2008. Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhea. Emerging Infectious Diseases, 14, 11: 1800-1802
- Rose J.B., Huffman D.E., Gennaccaro A. 2002. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. FEMS Microbiology Reviews, 26: 113-123
- Rose J.B., Slifko T.R. 1999. *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Cyclospora* and their impact on foods: a review. Journal of Food Protection, 62: 1059-1070
- Rossignol J.F. 2010. *Cryptosporidium* and *Giardia*: treatment options and prospects for new drugs. Experimental Parasitology, 124: 45-53
- Rotterdam H., Tsang P. 1994. Gastrointestinal disease in the immunocompromised patient. Human Pathology, 25, 11: 1123-1140
- Rutledge R.G., Cote C. 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. Nucleic Acid Research, 31, 16: e93, doi: 10.1093/nar/gng093: 6 str.
- Scaglia M., Gatti S., Bassi P., Viale P.L., Novati S., Ranieri S. 1994. Intestinal co-infection by *Cyclospora* sp. and *Cryptosporidium parvum*: first report in an AIDS patient. Parasite, 1, 4: 387-390
- Shayan P., Ebrahimzadeh E., Mokhber-Dezfouli M.R., Rahbari S. 2008. Recombinant *Cryptosporidium parvum* p23 as a target for the detection of *Cryptosporidium*-specific antibody in calf sera. Parasitology Research, 103, 5: 1207-1211
- Slavin D. 1955. *Cryptosporidium meleagridis* sp. nov. Journal of Comparative Pathology, 65: 262-266
- Smith H.V., Cacciò S.M., Cook N., Nichols R.A.B., Tait A. 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. Veterinary Parasitology, 149, 1-2: 29-40
- Stantič-Pavlinič M., Logar J. 1999. Epidemiološke in klinične značilnosti kriptosporidioze. Zdravniški vestnik, 68: 477-479
- Stein B., Stover L., Gillem A., Winters K., Leet J.H., Chauret C. 2006. The effect of lectins on *Cryptosporidium parvum* oocyst *in vitro* attachment to host cells. Journal of Parasitology, 92: 1-9
- Steiner T.S., Thielman N.M., Guerrant R.L. 1997. Protozoal agents: what are the dangers for the public water supply. Annual Review of Medicine, 48: 329-340
- Šoba B. 2009. Genetska pestrost izolatov kriptosporidijev vrste *Cryptosporidium parvum* v Sloveniji. Doktorsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 89 str.

- Tanriverdi S., Blain J.C., Deng B., Ferdig M.T., Widmer G. 2007. Genetic crosses in the apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum* define recombination parameters. *Molecular Microbiology*, 63: 1432-1439
- Tee G.H., Moody A.H., Hunt-Cooke A., Chiodini P.L. 1993. A novel assay for detecting soluble antigen of *Cryptosporidium parvum* using particle agglutination technology. *Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease*, 1: 49-52
- Templeton T.J., Enomoto S., Chen W.J., Huang C.G., Lancto C.A., Abrahamsen M.S., Zhu G. 2010. A genome-sequence survey for *Ascogregarina taiwanensis* supports evolutionary affiliation but metabolic diversity between a *Gregarine* and *Cryptosporidium*. *Molecular Biology and Evolution*, 27: 235-248
- ten Hove R.J., Schuurman T., Kooistra M., Möller L., Lieshout L., Verweij J.J. 2007. Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in the Netherlands by multiplex real-time PCR. *Clinical Microbiology and Infection*, 13: 1001-1007
- ten Hove R.J., van Esbroeck M., Vervoort T., van den Ende J., van Lieshout L., Verweij J.J. 2009. Molecular diagnostics of intestinal parasites in returning travellers. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 28: 1045-1053
- Tetley L., Brown S.M.A., McDonald V., Coombs G.H. 1998. Ultrastructural analysis of the sporozoite of *Cryptosporidium parvum*. *Microbiology*, 144: 3249-3255
- Thompson R.C., Olson M.E., Zhu G., Enomoto S., Abrahamsen M.S., Hijjawi N.S. 2005. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology*, 59: 77-157
- Tyzzer E.E. 1907. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 5: 12-13
- Tyzzer E.E. 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv Protist*, 26: 394-413
- Tzipori S. 1983. Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiological Reviews*, 47: 84-96
- Tzipori S., Ward H. 2002. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*, 4: 1047-1058
- Tzipori S., Widmer G. 2000. The biology of *Cryptosporidium*. V: Cryptosporidiosis and microsporidiosis. Petry F. (ed.). Basel, Karger: 1-32
- Umemiya R., Fukuda M., Fujisaki K., Matsui T. 2005. Electron microscopic observation of the invasion process of *Cryptosporidium parvum* in severe combined immunodeficiency mice. *Journal of Parasitology*, 91: 1034-1039

Ungar B.L.P., Mulligan M., Nutman T.B. 1989. Serologic evidence of *Cryptosporidium* infection in US volunteers before and during peace corps service in Africa. Archives of Internal Medicine, 149, 4: 894-897

Valasek M.A., Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. Advances in Physiology Education, 29: 151-159

Verweij J.J., Pit D.S.S., Van Lieshout L., Baeta S.M., Dery G.D., Gasser R.B., Polderman A.M. 2001. Determining the prevalence of *Oesophagostomum bifurcum* and *Necator americanus* infections using specific PCR amplification of DNA from faecal samples. Tropical Medicine and International Health, 6: 726-731

Verweij J.J., Blangé R.A., Templeton K., Schinkel J., Brienen E.A.T., van Rooyen M.A.A., van Lieshout L., Polderman A.M. 2004. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. Journal of Clinical Microbiology, 42, 3: 1220-1223

Vozelj M. 1996. Imunologija – enciklopedijski priročnik. Ljubljana, DZS: 136 str.

Weber R., Ledergerber B., Zbinden R., Altweig M., Pfyffer G.E., Spycher M.A., Briner J., Kaiser L., Opravil M., Meyenberger C., Flepp M. 1999. Enteric infections and diarrhea in human virus-infected persons: prospective community-based cohort study. Archives of Internal Medicine, 159, 13: 1473-1480

Wetzel D.M., Schmidt J., Kuhlenschmidt M.S., Dubey J.P., Sibley L.D. 2005. Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. Infection and Immunity, 73: 5379-5387

Xiao L. 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. Experimental Parasitology, 124: 80-89

Xiao L., Alderisio K., Limor J., Royer M., Lal A.A. 2000. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. Applied and Environmental Microbiology, 66: 5492-5498

Xiao L., Bern C., Limor J., Sulaiman I., Roberts J., Checkley W., Cabrera L., Gilman R.H., Lal A.A. 2001. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. Journal of Infectious Diseases, 183: 492-497

Xiao L., Fayer R., Ryan U., Upton S.J. 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. Clinical Microbiology Reviews, 17: 72-97

Xu P., Widmer G., Wang Y., Ozaki L.S., Alves J.M., Serrano M.G., Puiu D., Manque P., Akiyoshi D., Mackey A.J., Pearson W.R., Dear P.H., Bankier A.T., Peterson D.L.,

Abrahamsen M.S., Kapur V., Tzipori S., Buck G.A. 2004. The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature*, 431: 1107-1112

Yu Q., Li J., Zhang X., Gong P., Zhang G., Li S., Wang H. 2010. Induction of immune responses in mice by a DNA vaccine encoding *Cryptosporidium parvum* Cp12 and Cp21 and its effect against homologous oocyst challenge. *Veterinary Parasitology*, 172: 1–7

Zapata F., Perkins M.E., Riojas Y.A., Wu T.W., Le Blancq S.M. 2002. The *Cryptosporidium parvum* ABC protein family. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 120: 157-161

Zhu G. 2004. Current progress in the fatty acid metabolism in *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51: 381-388

Zhu G., Marchewka M.J., Keithly J.S. 2000. *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *Microbiology*, 146: 315-321

Zimmerman S.K., Needham C.A. 1995. Comparison of conventional stool concentration and preserved-smear methods with Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* Direct Immunofluorescence Assay and ProSpecT *Giardia* EZ Microplate Assay for detection of *Giardia lamblia*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 1942-1943

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Jerneju Logarju, univ. dipl. biol., da mi je omogočil izvedbo zanimive diplomske naloge in za hiter strokovni pregled le-te.

Hvala somentorici asist. dr. Barbari Šoba, univ. dipl. mikrobiol., za pomoč in vodenje skozi eksperimentalni del ter za ves trud, ki ga je vložila v nastajanje te diplomske naloge.

Recenzentu prof. dr. Alojzu Ihanu, dr. med., se zahvaljujem za strokovni pregled diplomskega dela.

Zahvala za vso pomoč in prijaznost pri laboratorijskem delu gre tudi Sabini in Jožetu iz Laboratorija za parazitologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Iskrena hvala mojim najbližnjim za vso podporo in pomoč v času študija.

Posebej se želim zahvaliti Mitju, ki mi je ves čas stal ob strani, me vzpodbujal in verjel vame tudi takrat, ko sem sama podvomila v svoje sposobnosti. Hvala tudi za pomoč pri oblikovanju diplomske naloge.

Hvala vsem!

PRILOGE

Priloga A: Rezultati testiranja in lastnosti zbranih vzorcev bolnikov, obolelih za gastroenteritisom

Zaporedna številka bolnika	Spol	Starost [leta]	Paraziti v blatu	Rezultat DIF (<i>Crypto.</i> spp.)	PCR v realnem času		
					Rezultat	C _T (<i>Crypto.</i> spp.)	C _T (<i>C. parvum</i>)
1	M ^a	64	<i>C. parvum</i>	P ^c	P	25,7	26,3
2	M	38	<i>Cryptosporidium</i> spp., <i>G. intestinalis</i>	N ^d	P	35,0	/
3	M	26	<i>C. parvum</i> , <i>G. intestinalis</i>	P	P	22,9	23,5
4	M	7	<i>C. parvum</i>	P	P	25,0	25,5
5	Ž ^b	45	N	N	N	/	/
6	Ž	42	N	N	N	/	/
7	Ž	43	N	N	N	/	/
8	M	18	N	N	N	/	/
9	Ž	10	N	N	N	/	/
10	M	7	N	N	N	/	/
11	M	65	N	N	N	/	/
12	M	13	N	N	N	/	/
13	M	1	N	N	N	/	/
14	Ž	40	N	N	N	/	/
15	Ž	34	<i>G. intestinalis</i>	N	N	/	/
16	M	13	N	N	N	/	/
17	M	7	N	N	N	/	/
18	M	9	N	N	N	/	/
19	Ž	13	N	N	N	/	/
20	M	2	N	N	N	/	/
21	Ž	57	N	N	N	/	/
22	M	6	N	N	N	/	/
23	Ž	27	N	N	N	/	/
24	M	15	N	N	N	/	/
25	Ž	44	N	N	N	/	/
26	M	11	N	N	N	/	/
27	Ž	7	N	N	N	/	/

Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga A: Rezultati testiranja in lastnosti zbranih vzorcev bolnikov, obolelih za gastroenteritisom

Zaporedna številka bolnika	Spol	Starost [leta]	Paraziti v blatu	Rezultat DIF (<i>Crypto.</i> spp.)	PCR v realnem času		
					Rezultat	C _T (<i>Crypto.</i> spp.)	C _T (<i>C. parvum</i>)
28	Ž	38	<i>Taenia</i> spp.	N	N	/	/
29	M	1	N	N	N	/	/
30	Ž	37	N	N	N	/	/
31	M	49	N	N	N	/	/
32	Ž	26	N	N	N	/	/
33	Ž	3	N	N	N	/	/
34	M	77	N	N	N	/	/
35	M	89	N	N	N	/	/
36	M	35	N	N	N	/	/
37	Ž	95	N	N	N	/	/
38	Ž	30	N	N	N	/	/
39	M	1	N	N	N	/	/
40	Ž	13	N	N	N	/	/
41	M	3	N	N	N	/	/
42	Ž	75	N	N	N	/	/
43	Ž	40	N	N	N	/	/
44	M	7	N	N	N	/	/
45	Ž	41	N	N	N	/	/
46	Ž	74	N	N	N	/	/
47	Ž	2	N	N	N	/	/
48	M	25	N	N	N	/	/
49	M	17	N	N	N	/	/
50	M	59	N	N	N	/	/
51	M	16	N	N	N	/	/
52	Ž	3	N	N	N	/	/
53	Ž	81	N	N	N	/	/
54	M	38	N	N	N	/	/
55	M	74	N	N	N	/	/
56	M	40	N	N	N	/	/

Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga A: Rezultati testiranja in lastnosti zbranih vzorcev bolnikov, obolelih za gastroenteritisom

Zaporedna številka bolnika	Spol	Starost [leta]	Paraziti v blatu	Rezultat DIF (<i>Crypto.</i> spp.)	PCR v realnem času		
					Rezultat	C _T (<i>Crypto.</i> spp.)	C _T (<i>C. parvum</i>)
57	Ž	34	N	N	N	/	/
58	M	40	N	N	N	/	/
59	M	62	N	N	N	/	/
60	M	72	N	N	N	/	/
61	Ž	68	N	N	N	/	/
62	Ž	84	N	N	N	/	/
63	Ž	42	N	N	N	/	/
64	M	38	N	N	N	/	/
65	Ž	37	N	N	N	/	/
66	M	50	<i>G. intestinalis</i>	N	N	/	/
67	Ž	32	N	N	N	/	/
68	M	8	N	N	N	/	/
69	M	30	N	N	N	/	/
70	M	29	N	N	N	/	/
71	Ž	1	N	N	N	/	/
72	M	2	N	N	N	/	/
73	Ž	29	<i>G. intestinalis</i>	N	N	/	/
74	M	34	N	N	N	/	/
75	Ž	36	N	N	N	/	/
76	M	62	N	N	N	/	/
77	Ž	39	N	N	N	/	/
78	M	1	N	N	N	/	/
79	M	5	N	N	N	/	/
80	M	2	N	N	N	/	/
81	Ž	17	N	N	N	/	/
82	Ž	74	N	N	N	/	/
83	M	8	N	N	N	/	/
84	M	57	N	N	N	/	/
85	M	37	N	N	N	/	/

Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga A: Rezultati testiranja in lastnosti zbranih vzorcev bolnikov, obolelih za gastroenteritisom

Zaporedna številka bolnika	Spol	Starost [leta]	Paraziti v blatu	Rezultat DIF (<i>Crypto.</i> spp.)	PCR v realnem času		
					Rezultat	C _T (<i>Crypto.</i> spp.)	C _T (<i>C. parvum</i>)
86	M	3	N	N	N	/	/
87	M	4	N	N	N	/	/
88	Ž	31	<i>G. intestinalis</i>	N	N	/	/
89	Ž	17	<i>Entamoeba coli</i>	N	N	/	/
90	M	64	<i>G. intestinalis</i>	N	N	/	/
91	M	27	<i>G. intestinalis</i>	N	N	/	/
92	Ž	30	N	N	N	/	/
93	M	3	N	N	N	/	/
94	Ž	86	N	N	N	/	/
95	Ž	82	N	N	N	/	/
96	M	18	N	N	N	/	/
97	Ž	58	N	N	N	/	/
98	M	25	N	N	N	/	/
99	Ž	4	N	N	N	/	/
100	Ž	55	N	N	N	/	/
101	M	1	N	N	N	/	/
102	Ž	43	N	N	N	/	/
103	M	2	N	N	N	/	/
104	Ž	1	N	N	N	/	/
105	M	14	N	N	N	/	/
106	Ž	1	N	N	N	/	/
107	M	37	<i>G. intestinalis</i>	N	N	/	/
108	M	30	<i>G. intestinalis</i>	N	N	/	/
109	M	30	<i>Blastocystis</i> spp.	N	N	/	/
110	M	3	N	N	N	/	/
111	Ž	29	<i>G. intestinalis</i>	N	N	/	/
112	M	35	<i>Entamoeba coli</i>	N	N	/	/
113	M	29	<i>G. intestinalis</i>	N	N	/	/
114	M	16	<i>Blastocystis</i> spp.	N	N	/	/

Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga A: Rezultati testiranja in lastnosti zbranih vzorcev bolnikov, obolelih za gastroenteritisom

Zaporedna številka bolnika	Spol	Starost [leta]	Paraziti v blatu	Rezultat DIF (<i>Crypto.</i> spp.)	PCR v realnem času		
					Rezultat	C _T (<i>Crypto.</i> spp.)	C _T (<i>C. parvum</i>)
115	M	18	<i>G. intestinalis</i>	N	N	/	/
116	M	2	N	N	N	/	/
117	Ž	25	<i>Entamoeba coli</i>	N	N	/	/
118	M	1	N	N	N	/	/
119	M	6	N	N	N	/	/
120	M	13	<i>Enterobius vermicularis</i>	N	N	/	/
121	Ž	44	N	N	N	/	/
122	M	10	<i>Entamoeba coli</i>	N	N	/	/
123	M	46	<i>Strongyloides</i> spp.	N	N	/	/
124	M	41	N	N	N	/	/
125	Ž	77	N	N	N	/	/
126	Ž	6	N	N	N	/	/
127	Ž	26	<i>G. intestinalis</i>	N	N	/	/
128	M	35	<i>G. intestinalis</i>	N	N	/	/
129	Ž	Ni podatka	<i>G. intestinalis</i>	N	N	/	/
130	M	Ni podatka	<i>G. intestinalis</i>	N	N	/	/
131	Ž	Ni podatka	N	N	N	/	/

^aM – moški spol

^bŽ – ženski spol

^cP – pozitiven rezultat

^dN – negativen rezultat