



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДЕН
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНА
КАТЕДРА „АНАТОМИЯ, ХИСТОЛОГИЯ, ЦИТОЛОГИЯ И
БИОЛОГИЯ“

ПЕТЯ ВАСИЛЕВА ДРАГОМИРОВА

**Криптоспоридиоза – диагностични, експериментални
и епидемиологични проучвания**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за присъждане
на образователна и научна степен**

„ДОКТОР“

**Докторска програма:
Медицинска биология**

**Научни ръководители:
Проф. Даниела Клисарова, д.б.
Доц. Нина Цветкова, д.б.**

**Плевен
2025 г.**

Дисертационният труд съдържа 199 стандартни страници е структуриран в следните раздели: Въведение, Литературен преглед, Цел и задачи, Материали и методи, Резултати и обсъждане, Заключение, Изводи, Приноси. Илюстриран е с 26 таблици, 59 фигури. Библиографският списък съдържа 397 литературни източника, от които 55 на кирилица и 342 на латиница.

Включените в дисертационния труд лабораторни анализи са извършени в:

- Катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология“, сектор „Биология“, факултет „Медицина“ при МУ-Плевен
- Национална референтна лаборатория „Диагностика на паразитите – местни и тропически“, ОПТМ на НЦПБ – София.

Във връзка с дисертационния труд са направени 3 пълнотекстови публикации и 4 научни съобщения на национални форуми.

Дисертационният труд е одобрен и насочен за публична защита от разширен Катедрен съвет на катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология“, факултет „Медицина“, при Медицински университет-Плевен, проведен на 29.11.2024 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 6 февруари 2025 г. от 13 часа в зала „Амброаз Паре“, на Медицински университет Плевен, съгласно правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет-Плевен и въз основа на Заповед на Ректора № 3762/17.12.2024 г. пред научно жури в състав:

Председател:

Проф. д-р Милена Димитрова Карчева, д.м.

Членове:

Проф. д-р Искра Георгиева Райнова, д.м.н.

Доц. д-р Борислава Георгиева Чакърва, д.м.

Доц. д-р Румен Ненков Харизанов, д.м.

Доц. д-р Зорница Веселинова Горчева, д.м.

Официални рецензенти:

Проф. д-р Искра Георгиева Райнова, д.м.н.

Доц. д-р Борислава Георгиева Чакърва, д.м.

Материалите по защитата са публикувани на сайта на МУ-Плевен:
<http://www.mu-pleven.bg/index.php/bg/>

Съдържание

I. Въведение	6
II. Цел и задачи	8
III. Материали и методи	9
1. Материал	9
2. Методи	14
IV. Резултати и обсъждане	15
1. Кратка характеристика на някои демографски и социално-икономически показатели на област Плевен.....	15
2. Резултати от морфологични изследвания за чревни протозои от род <i>Cryptosporidium</i>	16
3. Резултати от имунологични методи за чревни протозои от род <i>Cryptosporidium</i>	18
4. Резултати от молекулярно-биологични методи	20
4.1. Изолране на ДНК на <i>Cryptosporidium</i> spp. от фекални проби	20
4.2. PCR в реално време на базата на TaqMan технологията	21
4.3. Видова идентификация на <i>Cryptosporidium</i> spp. чрез рестрикционен ензимен анализ (restriction fragment length polymorphism, RFLP)	23
5. Резултати от влиянието на основните демографски показатели върху честотата на разпространение на криптоспоридиоза при изследваните лица	33
6. Резултати от изследваните животински проби	40
7. Резултати от анкетно проучване сред персонал от детски градини, ясли и клиники за информираността им относно ЧПИ и криптоспоридиоза	43
8. Картиране на разпространението на <i>Cryptosporidium</i> spp. инвазията сред хората и животните в Плевенска област по общини	43
V. Заключение	47
VI. Изводи	48
VII. Приноси	50
1. Приноси с оригинален характер	50
2. Приноси с приложен и потвърдителен характер.....	50
VIII. Публикации, участия в научни форуми и в научни проекти във връзка с дисертационния труд	51
IX. Приложения	52
1. Приложение 1	52

Използвани съкращения

На кирилица

БАБХ – Българска агенция по безопасност на храните

ДВ – Държавен вестник

ДКЦ – Диагностично консултативен център

ДНК – Дезоксирибонуклеинова киселина

ДНЗБ – Дирекция надзор на заразните болести

ЕИ – Екстензитет на инвазия

ЕС – Европейски съюз

ИП – Инкубационен период

ИХТ – Имунохроматографски тестове

ЛЗ – Лечебно заведение

МЗ – Министерство на здравеопазването

МБАЛ – Многопрофилна болница за активно лечение

НСИ – Национален статистически институт

НЦЗПБ – Национален център по заразни и паразитни болести

НЦОЗА – Национален център по обществено здраве и анализи

ОПЛ – Общо практикуващ лекар

ОДЗ/ДЗ – Организираните детски заведения / Детски заведения

ОПТМ – Отдел по паразитология и тропическа медицина

ОДБХ – Областна дирекция по безопасност на храните

РЗИ – Регионална здравна инспекция

РИФ – Реакция имунофлуоресценция

СЗО – Световна здравна организация

СМДЛ – Самостоятелна медико-диагностична лаборатория

СПИН – Синдром на придобита имунна недостатъчност

УМБАЛ – Университетска многопрофилна болница за активно лечение

ФМГ – Фотомикротография

ФНЛР – Фекална намазка с луголов разтвор

ФП – Фекални проби

ЧП – Чревни паразити

ЧПИ – Чревни паразитни инвазии

На латиница

CDC – Center for Disease Control and Prevention (Център за контрол и профилактика на заболяванията)

ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control (Европейски център за профилактика и контрол на заболяванията)

EFSA – European Food Safety Authority (Европейски орган по безопасност на храните)

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay (ензимно-свързан имуносорбентен анализ)

GIDEON – Global infectious Diseases and Epidemiology Network (Глобална мрежа за инфекциозни заболявания и епидемиология)

HIV – човешки имунодефицитен вирус, ретровирус, който причинява СПИН

ICZN – International Code for Zoological Nomenclature (Международен код за зоологична номенклатура)

INF γ – интерферон-гама

IgG – Имуноглобулин G

IgM – Имуноглобулин M

IgA – Имуноглобулин A

n = Абсолютен брой изследвани случаи

NK – natural killer cells

nPCR – nested Polymerase Chain Reaction

NTZ – Нитазоксанид

NTD – Neglected Tropical Diseases (Пренебрегвани тропически болести)

P – стойност ниво на значимост

PCR – Polymerase Chain Reaction (полимеразна верижна реакция)

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism (анализ на полиморфизма по дължината на рестрикционните фрагменти)

TD – Travel Disease – Болест на пътуващите (на пътешествениците)

WHO – World Health Organization (Световна здравна организация)

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Криптоспоридиозата е паразитна болест (зооантропонозна протозооза), протичаща предимно със засягане на храносмилателния тракт и с проява на диарийен синдром, чиято тежест варира от лека до тежка водниста диария, понякога със застрашаващ живота гастроентерит. По данни на Световната здравна организация повече от 58 милиона случаи на диария, открити годишно при деца, са свързани с инфекции от чревни протозои с високи нива на заболяемост и смъртност. В развитите страни диарията е най-честата причина за отсъствия от работа, докато в развиващия се свят това е водещата причина за смърт. В този сценарий, *Cryptosporidium* spp. е основната причина за заболявания с диарийен синдром в световен мащаб.

Заболяването се причинява от чревни кокцидии, апикомплексни протозои от род *Cryptosporidium*. Източници на заразата могат да бъдат както животни (над 170 вида бозайници, птици, влечуги, риби), така и човек (болен или паразитоносител). Те отделят с фекалиите си ооцисти, съдържащи инвазиоспособни спорозоити.

В много от развитите страни не съществуват системи за контрол на криптоспоридиозата. Проведени са сравнително малко проучвания, позволяващи преценка за нейното разпространение, което може да варира във времето. В тропическите страни и икономически изостаналите държави с лоша хигиена, където опаразитеността на хората е най-висока, криптоспоридиозата е пренебрегвана паразитоза. Това се дължи на липсата на ресурси за провеждане на изследвания на населението.

Върху разпространението на чревните паразитни инвазии влияят екологични, климатични, здравни, социално-икономически, трудови, битови и други фактори. Разпространението на криптоспоридиозата е свързано с увеличаване на миграционните процеси, развитието на туризма, природните бедствия (земетресения, наводнения, суша и липса на питейна вода), военни действия, наличието на природни резервоари на инфекцията, малката инвазионна доза и високата резистентност на причинителя към дезинфектантите и противопаразитните препарати. Замърсяването на градските отпадни води и утайки е фактор за развитие на ооцисти на *Cryptosporidium* spp.

Със здравна значимост са определените от СЗО четири основни и асоциирани със синдрома на придобитата имунна недостатъчност опортюнистични паразитози – криптоспоридиоза, циклоспориоза, цистоизоспориоза и токсоплазмоза. С изключение на токсоплазмозата останалите заболявания се диагностицират по-рядко, което е свързано с несъвършенството на диагностичната техника, необходимостта от специално

оцветяване на препарати, което не се извършва във всички лаборатории, а понякога и липса на професионални знания.

Резултатите от сероепидемиологичните изследвания свидетелстват, че вероятно криптоспоридиозата се среща значително по-често, отколкото се диагностицира. Паразитните заболявания, по-специално криптоспоридиоза и гиардиаза, са причина за голям брой случаи на стомашно-чревни инфекции в Европа, вкл. в България, но съществуват съмнения, че те не се диагностицират, съобщават и регистрират. Тежестта на клиничното протичане на тези заболявания остава недоизяснена. Има съобщени данни за София, Варна, Пловдив, Велико Търново, но до този момент няма регистрирани или публикувани случаи на заболявания от криптоспоридиоза сред хора от област Плевен.

При липсата на специфична профилактика, диагностиката е основа за успешния надзор и контрол над криптоспоридиозата. Криптоспоридиозата подлежи на задължително съобщаване и регистрация в Регионалните здравни инспекции с копие до Областните дирекции за безопасност на храните за всеки паразитологично потвърден случай.

Криптоспоридиозата е по-малко позната чревна протозооза за здравната мрежа (общопрактикуващи лекари и специалистите гастроентеролози, педиатри, инфекционисти и други), поради което липсва насоченост към заболяването. Не се назначават паразитологични изследвания на пациентите с диарийен синдром. Тя сериозно се подценява и от ръководителите на РЗИ, диагностично консултативните центрове и на Самостоятелните медико-диагностични лаборатории. Познанията за тази паразитоза не са достатъчни и сред специалистите по здравни грижи (медицински сестри акушерки, лекарски асистенти). По тази причина лицата с гастроентерити, завръщащи се от морски курорт или посещавали развлекателни плувни басейни, постъпват на болнично лечение в инфекциозните отделения обикновено с диагнозата “ентеровирусна инфекция”.

Всичко това налага да се засилят наблюденията и систематизират анализите свързани с епидемиологията, разпространението и диагностиката на криптоспоридиозата в България и по-конкретно сред населението в Плевенска област, което е една от основните цели на дисертационния труд. Значима корелация между целите, които поставя европейското здравеопазване през ХХI век и настоящия труд, е проучване на някои диагностични и епидемиологични особености на криптоспоридиозата сред най-уязвимите рискови групи от населението на регион Плевен.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Цел

Цел на настоящия дисертационния труд е да се проучат биологията, разпространението, диагностиката и епидемиологията на криптоспоридиозата сред рисковите контингенти от населението в Плевенска област и близки региони, както и сред животни чрез прилагане на съвременни диагностични методи.

2. Задачи

За постигане на научноизследователската цел са формулирани следните задачи:

2.1 Да се установи разпространението на криптоспоридиозата сред рисковите контингенти от населението на Плевен и региона по основните демографски показатели възраст, пол, населено място и етническа принадлежност чрез използване на морфологични, имунологични и молекулярно-биологични методи за диагностика на *Cryptosporidium* spp.

2.2 Да се характеризира разпространението на криптоспоридиозата сред животни по възрастова и видова принадлежност в Плевенска област.

2.3 Да се установи наличието на криптоспоридии чрез прилагане на полимеразна верижна реакция (PCR) и някои нейни разновидности.

2.4 Да се идентифицират получените изолати от човешки и животински произход до ниво вид/генотип чрез анализ на полиморфизма по дължината на рестрикционните фрагменти (RFLP).

2.5 Да се проучи нивото на информираност на персонала на детските ясли, градини и клиники към УМБАЛ от областта с помощта на анкета с цел да се подобри степента на профилактика на чревните паразитни инвазии (вкл. криптоспоридиозата).

2.6 Да се изработи карта на ареалите на разпространение на криптоспоридиоза в Плевенска област.

2.7 Да се изработи здравнообразователна брошура, която обобщава основни познания за криптоспоридиозата и полезни препоръки за превенция на заболяването.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

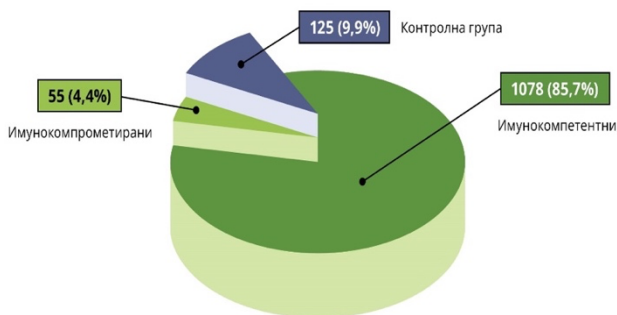
1. Материал

1.1 Дизайн на проучването

Проучването е проспективно и неинтервенционално по отношение на изследваните таргетни групи лица и животни.

1.2 Таргетни групи изследвани лица

Изследваните по клинични и/или епидемиологични показания 1258 лица са на възраст от 4 месеца до 70 години за 7-годишен период от 2016 до 2023 година. Те са разпределени в две групи: 1078 имунокомпетентни лица и 55 имунокомпроментирани с първичен или вторичен имунодефицит. Контролната група включва 125 клинично здрави деца и възрастни, без специфични симптоми за чревни паразитози (фигура 1).



Фигура 1. Разпределение на изследваните лица за периода 2016-2023г. в Плевенска област

1.2.1 Възрастова структура

Таблица 1. Разпределение на таргетните групи изследвани лица по пол, възраст и етническа принадлежност

Таргетна група, n=1133	Брой (%)
Деца - от 4 месеца до 18 г.	949 (75,43%)
момчета	486 (51,2%)
момичета	463 (48,8%)
от 0 до 2 г.	134 (10,65%)
момчета	74 (55,2%)

момчета	74 (55,2%)
български етнос	103 (76,9%)
турски етнос	3 (2,2%)
ромски етнос	28 (20,9%)
от 3 до 7 г.	751 (59,7%)
момчета	375 (49,9%)
момичета	376 (50,1%)
български етнос	525 (69,9%)
турски етнос	45 (6,0%)
ромски етнос	181 (24,1%)
от 8 до 18 г.	64 (5,1%)
момчета	37 (57,81%)
момичета	27 (42,19%)
български етнос	56 (87,5%)
турски етнос	1 (1,6%)
ромски етнос	7 (10,9%)
Възрастни - от 19 до 70 г.	309 (24,56%)
мъже	164 (53,1%)
жени	145 (46,9%)
български етнос	297 (96,1%)
турски етнос	9 (2,9%)
ромски етнос	3 (1%)

1.2.2 Контролна група

Таблица 2. Разпределение на контролната група изследвани лица по пол, възраст и етническа принадлежност

Контролна група, n=125	Брой (%)
Деца - от 4 месеца до 18 г.	91 (72,80%)
момчета	51 (56%)
момичета	40 (44%)
български етнос	61 (67,0%)
турски етнос	10 (11,0%)
ромски етнос	20 (22,0%)
Възрастни - от 19 до 70 г.	34 (27,2%)
мъже	13 (38,2%)
жени	21 (61,8%)
български етнос	27 (79,4%)
турски етнос	3 (8,8%)
ромски етнос	4 (11,8%)

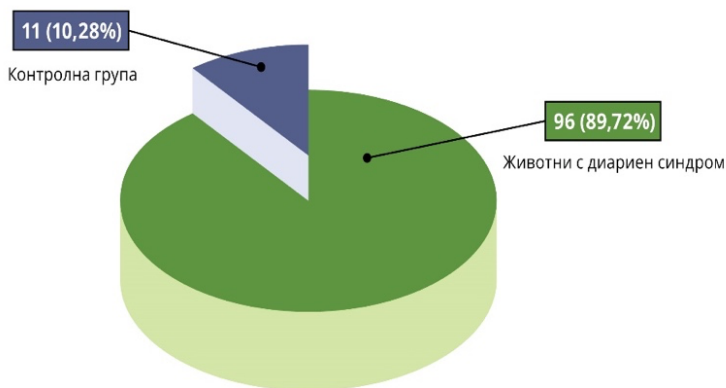
При работата с всички участници в проучването са спазени препоръките и указанията, заложи в „Ethical Issues in Patient Safety Research: Interpreting Existing Guidance“ на Световната здравна организация (СЗО). Всички

изследвани лица или техните родители са изразили информирано съгласие в писмена форма. Проучването е одобрено от Комисията по етика на научно-изследователската дейност при Медицински Университет-Плевен (КЕНИД – Изх. № 456/21.06.2017; КЕНИД – Изх. № 560/07.05.2019).

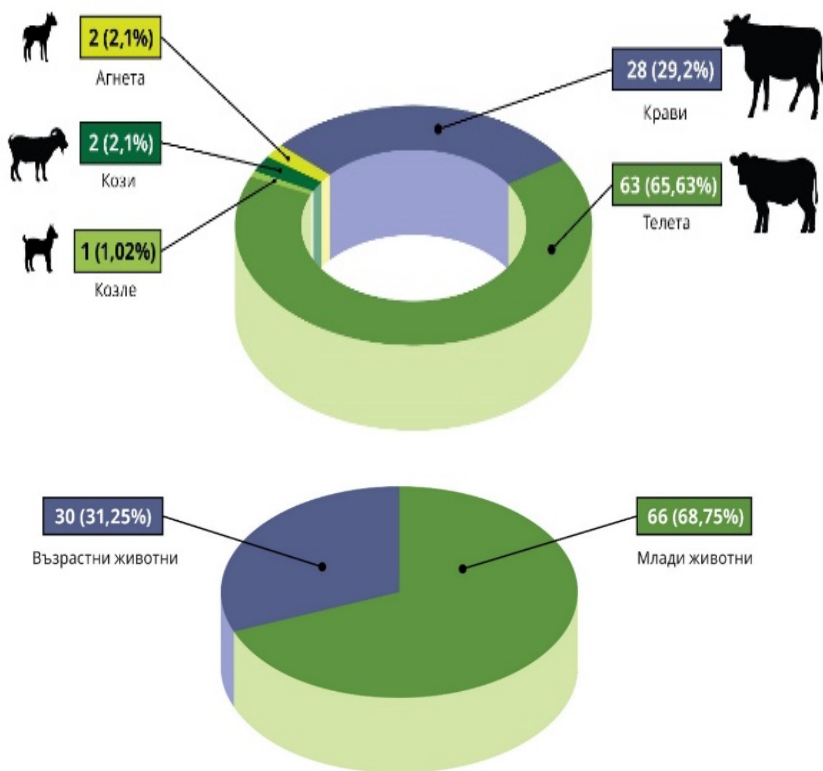
Пробовземането от организирани детски колективи е извършено съгласно изисквания по Наредба №5 /06.04.2006 на МЗ, за дигностиката, профилактиката и контрола на местните паразитози. Получено е и разрешение от Главния държавен санитарен инспектор за работа с фекални проби на деца от детски градини и ясли, подлежащи на профилактични прегледи от РЗИ – гр. Плевен, Дирекция „Надзор на Заразните болести”, отдел „Медицински изследвания”. (Разрешение от Главен държавен санитарен инспектор – Изх. № 21.00.177/ 03.04.2018).

1.2 Таргетни групи изследвани животни

Проучена е животинска популация по вид и възраст на животните в периода 2016 – 2023 г. Изследвани са общо 107 проби от различни видове стопански животни (крави, кози, овце). Деветдесет и шест проби са на животни с диарийен синдром. В контролна група са включени 11 проби от животни без симптоматика, характерна за чревни паразитни инвазии (ЧПИ) (фигура 2 и фигура 3).



Фигура 2. Разпределение на изследваните животни през 2016-2023г. в Плевенска област

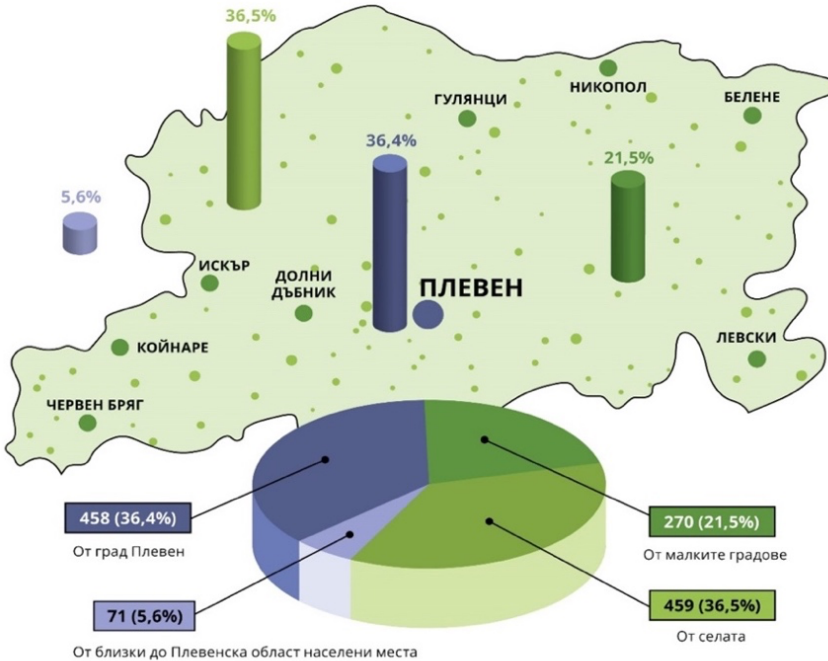


Фигура 3. *Разпределение на изследваните проби според вида и възрастта на животното*

1.3. Териториален обхват и географски критерий за включване

Настоящото проучване е проведено в градове и села от Плевенска област и някои близки до нея населени места. Изследваните от гр. Плевен са 458 (36,4% от общия брой), от по-малките градове на област Плевен са 270 (21,5%) и от селата са 459 (36,5%). Град Плевен е административен център на цялата област и в него има голям брой лечебни заведения, а университетските болници са две (УМБАЛ „Георги Странски“ и УМБАЛ „Света Марина – Плевен“). Пациенти от близки до Плевенска област населени места се лекуват в клиниките на университетските болници. В нашето проучване има такива, но те са малък процент от общия брой изследвани лица – 71 (5,6%) (фигура 4).

Плевен и Плевенска област



Фигура 4. *Разпределение на пробите по населени места на територията на Плевенска област.*

1.4. Изследван материал

За постигане на научно-изследователските задачи в настоящата разработка е изследван биологичен материал – фекални проби. На всички лица и животни с /или без клинична симптоматика за чревни паразитни инвазии са изследвани фекални проби в диференциално-диагностичен план чрез морфодиагностични, имунологични и молекулярно-биологични методи за чревни протозои. Фекалните проби са съхранявани на -80°C до извършване на анализите във фризер (PHCbi Ultra-Low Temperature Freezer MDF-U55V-PE).

1.5 Място на научното изследване

Лабораторните анализи са извършени в сектор „Биология“, катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология“, факултет Медицина при МУ-Плевен и в Национална референтна лаборатория „Диагностика на паразитите – местни и тропически“, ОПТМ на НЦПБ – София.

2. Методи

За осъществяване на задачите на настоящото проучване са извършени общо 1258 изследвания за *Cryptosporidium* spp. чрез прилагане на следните методи:

2.1 Морфологични изследвания

2.2 Имунологични методи за откриване на копроантигени в човешки и животински проби

2.2.1 Имунохроматографски метод

2.2.2 Ензимносвързан имуносорбентен анализ (ELISA)

2.3 Молекулярно-биологични методи

2.3.1 Изоліране на ДНК на *Cryptosporidium* spp. от фекални проби на хора и животни

2.3.1.1 Изоліране на ДНК с търговски кит *GeneAll[®] Exgene[™] Stool DNA kit* (GeneAll Biotechnology, Seoul, South Korea)

2.3.1.2 Изоліране на ДНК с търговски кит *PureLink[®] Genomic DNA Kit*, (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)

2.3.1.3 Изоліране на ДНК с хелатен агент *Chelex[®] 100* (Bio-Rad Laboratories, California, USA)

2.3.2 Оценка на качеството на изоліраната ДНК

2.3.3 Съхранение на ДНК

2.3.4 Полимеразна верижна реакция (Polymerase Chain Reaction, PCR), използвани праймери и условия на амплификация.

2.3.4.1 Гнездова (nested) PCR (nPCR) на участък от гена за 18S рРНК на *Cryptosporidium* spp.

2.3.4.2 Nested PCR на участък от гена за COWP (nCOWP-PCR) на *Cryptosporidium* spp.

2.3.4.3 Полимеразна верижна реакция в реално време (real time Polymerase Chain Reaction, real time PCR) за доказване на *Cryptosporidium* spp.

2.3.5 Детекция на амплификационните продукти – агарозна гел електрофореза

2.3.6 Пречистване на PCR продукти

2.3.7 Видова идентификация на *Cryptosporidium* spp. чрез рестрикционен ензимен анализ (restriction fragment length polymorphism, RFLP)

2.4 Епидемиологични методи

2.5 Социологически методи

2.5.1 Документален метод

2.5.2 Анкетно проучване

2.6 Статистически методи

2.7 Графичен анализ

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Кратка характеристика на някои демографски и социално-икономически показатели на област Плевен

1.1 Демографски показатели

Плевенска област е първата по брой на население (226 120 души) в Северозападен район и деветата по площ област – 3,9% от територията на страната (фигура 5 и фигура 5а). Общият брой жители на областта представлява 3,5% от цялото население на България, включваща 11 общини, 14 града и 109 села. Областен център е град Плевен, който е с население 92 101 жители. Съотношението между мъже и жени в Плевенска област е 48,28% към 51,72%, като преобладават жените.



Фигура 5. Разположение на Плевенска област в рамките на Северозападен район (Източник НЦТР, 2013 г.)



Фигура 5а. Карта на териториалното разпределение на област Плевен

1.2 Етническа структура

Етническият състав на община Плевен е 89,7% българи; 2,3% роми; 1,6% турци и 0,5% други етноси.

В Плевенска област преобладава българският етнос, представен от 200 197 жители или 88,5% от лицата, посочили своята етническа принадлежност. На второ място е ромската етническа група 6999 (3,1%) и на трето – турската – 5367 (2,4%). Останалите етнически групи са слабо представени.

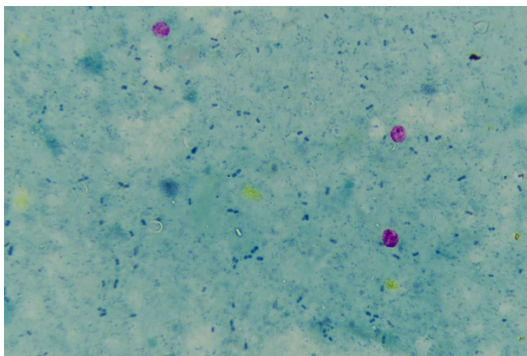
1.3 Социално-икономическа характеристика и инфраструктура

Област Плевен е център на Северозападния икономически район и има важни функции за цялостното икономическо и социално развитие на района. Брутният вътрешен продукт (БВП) в област Плевен представлява 30,8% от БВП на Североизпаден район и 2,06% от националния БВП. Запазва се диференциацията в социално-икономическото развитие на гр. Плевен и останалите общини в региона. Водещо място в икономиката на област Плевен имат общини Плевен, Белене, Червен бряг и Левски.

Броят на детските заведения на територията на област Плевен е 115, като от тях 76 са детски градини, а броят на детските ясли е 41. Социалните домове за възрастни и деца в региона са 8, като функционират и 3 хосписа.

2. Резултати от морфологични изследвания за чревни протозои от род *Cryptosporidium*

От проведената морфодиагностика за *Cryptosporidium* spp. по модифициран метод на Ziehl–Neelsen (метод на Kinyoun), в 75 от изследваните фекални проби от хора са открити ооцисти и в 41 от животинските (фигура 6).

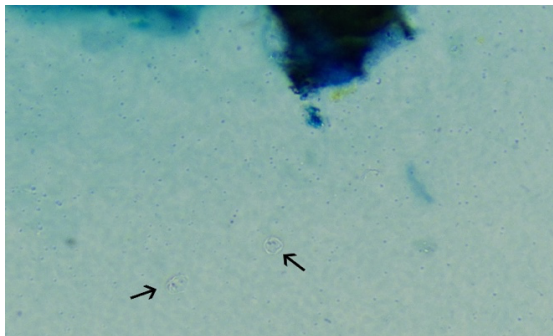


Фигура 6. Микрофотография на ооцисти на *Cryptosporidium* spp., 1000X (автор П. Драгомирова)

На синьо-зелен фон се виждат оцветени в червен или розов цвят ооцисти – кръгли или овални тела с размери 5-6 μm , с често гранулирана цитоплазма,

съдържаща интрацистни телца, които са оцветени в тъмносив или тъмнокафяв до черен цвят.

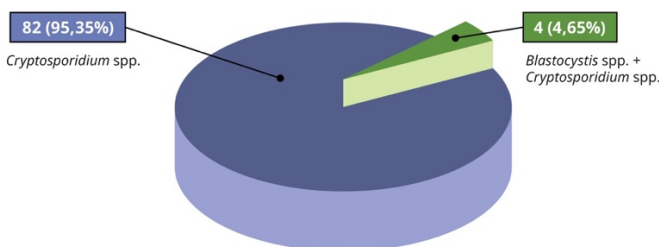
При безсимптомните носители се микроскопират и невитални ооцисти, които не поемат от карболфуксина („ghost cells“). В нашето проучване липсата на позитивиране на някои от човешките проби при последващия PCR най-вероятно се дължи на наличието на тези „празни“ ооцисти (фигура 7).



Фигура 7. Микрофотография на „празни“ ооцисти на *Cryptosporidium* spp., 1000X (автор П. Драгомирова)

В групата на имунокомпетентните лица, позитивни за криптоспоридиоза бе установена и полипаразитемия. В 4 (4,65%) проби освен *Cryptosporidium* spp. е установен и *Blastocystis* spp.(фигура 8).

- при 2 деца, безсимптомни носители на *Blastocystis* spp. с находка от по-малко от 5 паразитни форми на зрително поле.
- при 1 дете, носител на *Blastocystis* spp. с повече от 5 паразитни форми на зрително поле.
- 1 възрастен, цистоотделител на *Blastocystis* spp. с повече от 5 паразитни форми на зрително поле.



Фигура 8. Наличие на полиинвазия при позитивните за криптоспоридиоза случаи при хора

3. Резултати от имунологични методи за чревни протозои от род *Cryptosporidium*

3.1 Качествена копроантигенна *in vitro* идентификация на *Cryptosporidium* spp. (RIDA Quick *Cryptosporidium* N1203) във фекални проби от хора

От проведените имунохроматографски тестове (ИХТ) за идентификация на *Cryptosporidium* spp. антиген позитивни са 79 проби от изследваните лица, а негативни са 1054 (фигура 9).



Фигура 9. Снимка на имунохроматографски тестове на фекална проба от хора с негативен (една синя черта) и позитивен (една синя и една червена черта) резултат (автор П. Драгомирова)

ИХТ са лесни за изпълнение, резултатът се получава в рамките на 10 минути, не изискват специфично оборудване и обучен персонал, което позволява бърза диагностика на терен (лечебни заведения, детски градини, животновъдни ферми и др.). ИХТ се оказват, финансово по-неизгодни в сравнение с ELISA.

3.2 Качествена копроантигенна идентификация на *Cryptosporidium* spp. (BIO K 387 BioX Diagnostics) във фекални проби от животни

При проведените ИХТ за идентификация на *Cryptosporidium* spp. позитивни са 37 проби от изследвани животни, а негативни – 59 (фигура 10).



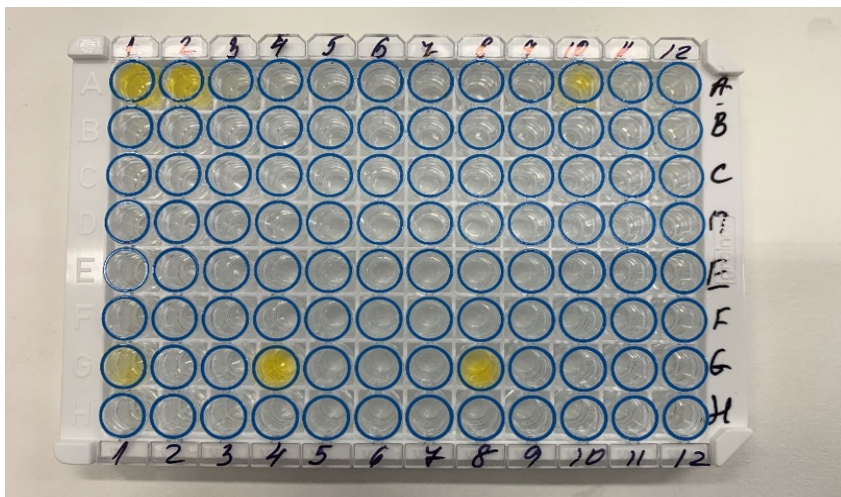
Фигура 10. Снимка на имунохроматографски тестове на фекална проба от животни с позитивен (една синя и една червена черта) и негативен (синя черта) резултат (автор П. Драгомирова)

3.3 Резултати от ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) - *Ridascreen Cryptosporidium* (C1201)

В сравнение с ИХТ (бързи и често използвани за диагностика на криптоспоридиоза, но със слаба чувствителност и висок процент фалшиво положителни резултати, ELISA е бърз и евтин метод, който улеснява диагностиката. Като недостатъци на този метод някои автори посочват вариации в чувствителността и специфичността, както и липсата на специфични знания и умения.

В настоящото проучване ELISA се наложи като един от основните имунодиагностични методи за детекцията на *Cryptosporidium* spp. ооцисти поради възможността за едновременно изследване на голям брой проби, повисоката си чувствителност и достъпност. Пробите не подлежат на допълнително концентриране, отчитането на резултата със спектрофотометър елиминира субективизма при микроскопското изследване, а получените резултати са надеждни. Възможно е да се открие *Cryptosporidium* spp. копроантиген в границата от 10^3 - 10^4 ооцисти / ml.

От изследваните чрез ELISA фекални проби от хора, 84 са позитивни, а 1049 са негативни. От изследваните животински проби позитивни са 40, а негативни са 56 (фигура 11).



Фигура 11. Снимка на микротитърна плака на копроантигенна ELISA (автор П. Драгомирова)

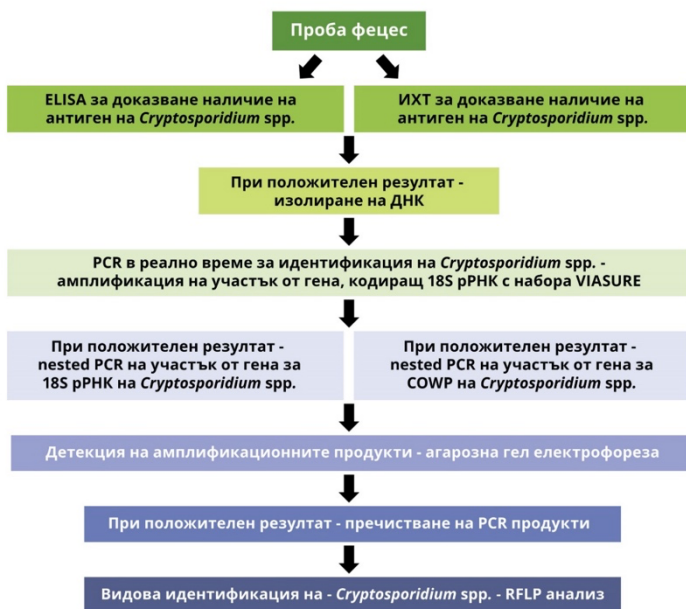
След проведените лабораторни анализи се установи, че имунологичните методи (ELISA и ИХТ) са със сходни резултати за детекция на ооцисти на *Cryptosporidium* spp., за разлика от морфологичните изследвания, които зависят от броя на ооцистите в изследваната проба и от субективния фактор.

4. Резултати от молекулярно-биологични методи

4.1 Изолиране на ДНК от *Cryptosporidium* spp.

За изолиране на ДНК от *Cryptosporidium* spp. са приложени два метода за екстракция: пречистване с твърда фаза – матрикс от силициев диоксид под формата на колонки (с готов търговски набор – 2 набора: за изолиране на ДНК от фецеси и за изолиране на ДНК от клинични материали) и с термична обработка на пробата в присъствие на хелатен агент – Chelex® 100. За да се направи оценка на ефективността им е определено количеството и чистотата на изолираната ДНК от 10 фекални материала чрез спектрофотометрично измерване. Така от всеки фецес са приготвени аликвоти за трикратно изолиране на ДНК – с два търговски набора и със смолата Chelex® 100. Получените ДНК проби са измерени със спектрофотометър ([Спектрофотометър за микрообеди Biochrom, BioDrop Lite+, сериен № 6491, Harvard Bioscience Co. Ltd. (Shanghai, China)]).

Доказването на *Cryptosporidium* spp. в изследваните фекални проби и последваща идентификация на вида е извършвана в последователност, представена на фигура 12.



Фигура 12. Алгоритъм за провеждане на молекулярно-биологичен анализ за доказване и видова идентификация на изолати на *Cryptosporidium* spp.

Легенда: ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay; ИХТ – Имунохроматографски тест; RFLP – restriction fragment length polymorphism.

Молекулярните техники намират широко приложение в областта на диагностиката на паразитните инвазии, включително и за доказване на протозоите от род *Cryptosporidium* като инвазионни агенти както при човека, така и при животните. Те повишават значително откриваемостта на криптоспоридиите в различните видове изследвани материали (напр. клинични и водни проби).

4.2 PCR в реално време на базата на *TaqMan* технологията

За амплификация на гена, кодиращ *18S pPHK*, е използван търговският набор *VIASURE Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica Real Time PCR Detection Kit (Certest Biotec S.L., Zaragoza, Spain)* за специфично качествено откриване на паразитите в реално време според инструкциите на производителя. Амплификациите са проведени на апарата *Gentier Real-Time PCR System 96 (Xian Tianlong Science and Technology Co., Ltd.)*. Включената вътрешна контрола (*Internal Control DNA (ICD)*) дава възможност за откриване на PCR инхибитори, за мониторинг на целостта на реагентите, както и да се потвърди, че екстракцията на нуклеинова киселина е била успешна и следователно гарантира получаването на надеждни резултати.

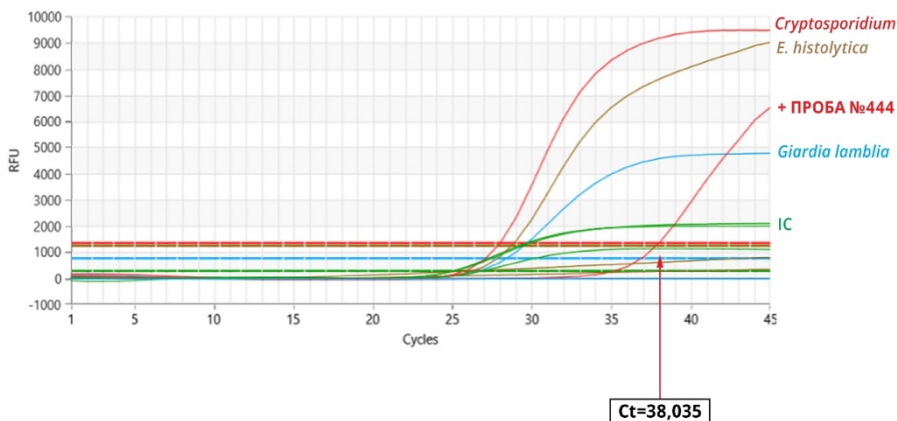
4.2.1 Качествено откриване на ДНК на *Cryptosporidium* spp.

В настоящата разработка за наличие на ДНК на патогена са изследвани фекални проби от човешки и животински произход.

Група 1 (хора): Изследвани са общо 86 лица, суспектни за инвазия с *Cryptosporidium* spp. Амплификация на фрагмент от гена, кодиращ *18S pPHK*, е отчетена при 32 изследвани лица.

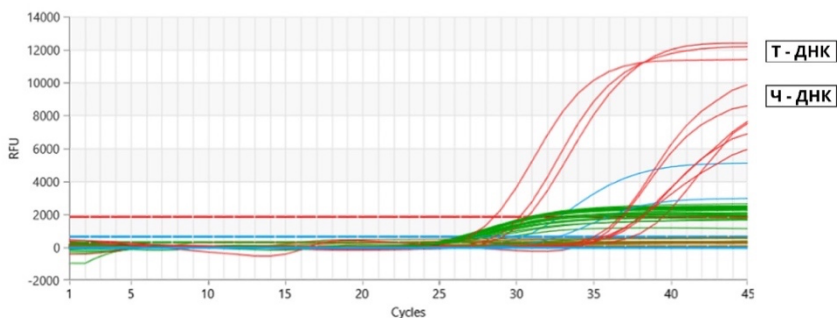
Група 2 (животни): Изследвани са 40 животни, от които 36 телета, 3 крави и 1 козле със симптоми от страна на стомашно-чревния тракт. Положителен резултат при амплификацията на гена, кодиращ *18S pPHK*, е получен при 37 проби (36 телета на възраст 6 дни до 2 месеца и 1 козле на възраст 1 месец).

На фигура 13 е представен анализ на резултата от амплификацията на изследваната проба ДНК (пациент №444), която е отчетена като положителна със стойност на *Ct* по-малка от 40 (*Ct*=38,035) и вътрешна контрола (*IC*), показваща амплификационен сигнал.



Фигура 13. Резултат от PCR в реално време за откриване на *Cryptosporidium spp.* в проба фецес от пациент ИД №444. Положителната контрола (К+) за трите патогена е предоставена в търговския набор.

С помощта на търговския набор VIASURE, чрез амплификацията на участък от гена за *18S рРНК* на *Cryptosporidium spp.*, са идентифицирани като положителни общо 32 проби фецес на суспектни за криптоспоридиоза лица и 36 фекални проби на телета и 1 проба на козле. На фигура 14 е представен анализът на резултатите от протеклата амплификационна реакция на девет проби ДНК, изолирани от фекални материали на хора (n=6) и телета (n=3).



Легенда на цветовете	Патоген
	Положителна контрола за <i>Cryptosporidium spp.</i>
	Положителна контрола за <i>E. histolytica</i>
	Положителна контрола за <i>Giardia lamblia</i>
	Вътрешна контрола

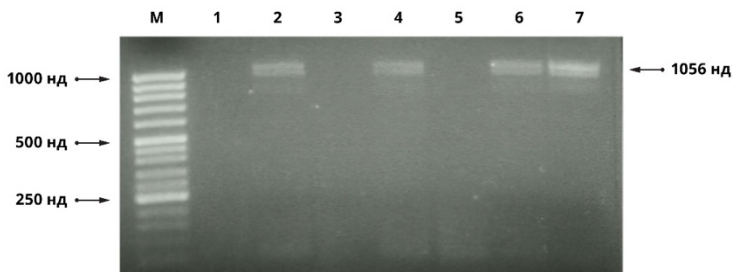
Фигура 14. Резултат от PCR в реално време за откриване на ДНК на *Cryptosporidium* spp. в проби фецес от човешки ($n=6$) и животински (телета, $n=3$) произход. Т-ДНК, изолирана от фекални проби на телета; Ч-ДНК, изолирана от човешки фекални проби.

4.3 Видова идентификация на *Cryptosporidium* spp. чрез RFLP анализ

Анализът на полиморфизма по дължината на рестрикционните фрагменти, проведен след nested PCR (nPCR-RFLP), е специфична и чувствителна техника за откриване на ооцисти на *Cryptosporidium* в проби от фекални материали. По литературни данни броят на валидните видове *Cryptosporidium* нарастна значително с прилагането на молекулярните техники – 49 признати вида и повече от 120 генотипа, които предстои да бъдат официално описани (поради липса на биологични и/или генетични данни). *Cryptosporidium hominis* и *C. parvum* са видовете, най-често съобщавани като причинители на по-голямата част от инфекциите при хората по света, например за всички известни типизирани водни огнища на криптоспоридиоза, с изключение на едно огнище, причинено от *C. cuniculus* в Обединеното кралство. Освен *C. hominis* и *C. parvum*, други видове и генотипове на *Cryptosporidium* са доказани при хора чрез генетични методи, включително *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. ditrichi*, *C. erinacei*, *C. fayeri*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. scrofarum*, *C. suis*, *C. tyzzeri*, *C. ubiquitum*, *C. viatorum*, *C. xiaoi*, *Cryptosporidium chipmunk* генотип I, *Cryptosporidium* скункс генотип, *Cryptosporidium* конски генотип и *Cryptosporidium* генотип на норка.

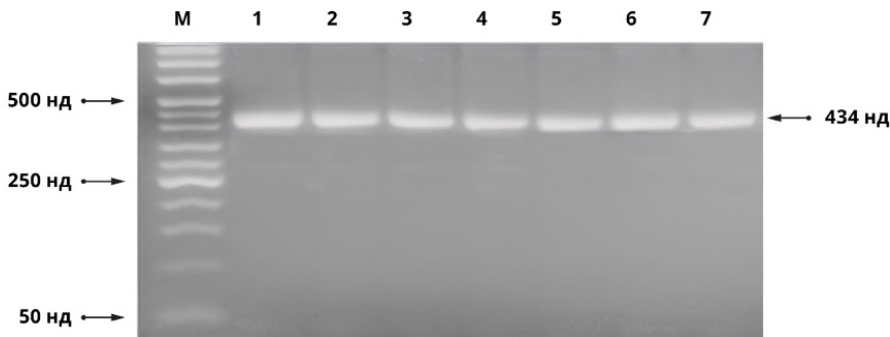
В настоящата разработка са приложени nPCR, насочени към участъци от два гена с висока степен на полиморфизъм, като хипервариабилния регион от гена за *18S рPHK* (големина на ампликона ~434 нд), представен с много копия (20 копия на ооциста) в генома на паразита, и гена, кодиращ протеин от ооцистната стена на криптоспоридиите (COWP, ампликон с големина ~341 нд), представен с едно копие в генома на паразита, което ги определя като подходящ маркер за видова идентификация на криптоспоридиите. Високата степен на полиморфизъм в сегментите от тези гени позволява идентифицирането чрез RFLP анализ на видовете *C. hominis* и *C. parvum*, които се откриват като причинители при повечето човешки инфекции.

По време на първия етап от nPCR, участък от гена за *18S рPHK* на *C. parvum* с големина 1056 нд е амплифициран с външната двойка праймери KLJ1-F/KLJ2-R (фигура 15).



Фигура 15. Електрофоретичен анализ през 1,5% агарозен гел на ампликоните от етап 1 на pPCR с външната двойка праймери *KLJ1-F/KLJ2-R*. Линия М, 50-1000-нд маркер; Линия 1, референтна контролна проба ДНК на *S. parvum* (ATCC PRA-67DQ); линии 2-4, ДНК проби, изолирани от фецеси на пациенти с диарийни изхождания; линии 5-7, ДНК проби, изолирани от животински фецеси. На този първи етап липсват амплификационни продукти при три от пробите (линии 1, 3 и 5). Визуализирането на разделените продукти е извършено с флуоресцентната боя *GelRed® Nucleic Acid Stain*.

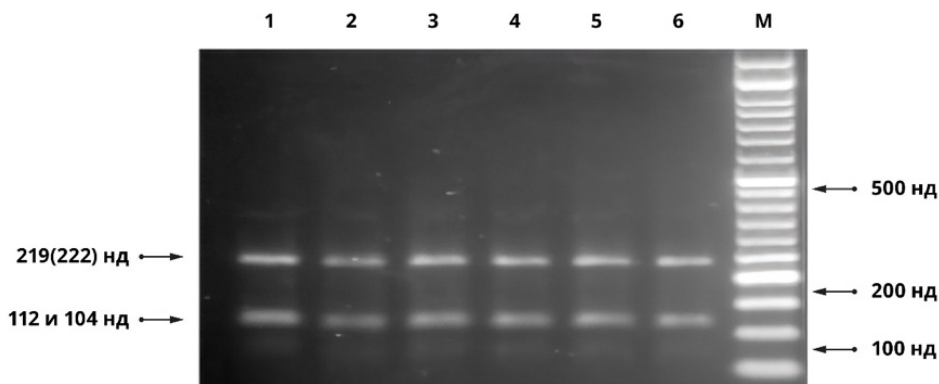
По време на втория етап на pPCR, матрица за вътрешната двойка праймери *CPB-DIAGF/CPB-DIAGR* е продуктът, намножен в първия етап. Ампликоните са с големина 434 нд (фигура 16).



Фигура 16. Електрофоретичен анализ през 1,5% агарозен гел на ампликоните (434 нд) от етап 2 на pPCR с вътрешната двойка праймери *CPB-DIAGF/CPB-DIAGR*. Линия М, 50-нд маркер; линия 1, референтна контролна проба ДНК на *S. parvum* (ATCC PRA-67DQ); линии 2-4, ДНК проби, изолирани от фецеси на пациенти с диарийни изхождания; линии 5-7, ДНК проби, изолирани от животински фецеси. Визуализирането на разделените продукти е извършено с флуоресцентната боя *GelRed® Nucleic Acid Stain*.

В настоящата разработка всички изолати са идентифицирани до вид чрез рестрикционен анализ на амплифицираните участъци от гена, кодиращ *18S pPHK* (с ензимите *DraI*, *AseI* (*VspI*), *DdeI*, *NdeI*) и от гена, кодиращ протеин от ооцистната стена на *Cryptosporidium* (COWP) съответно с ензимите *RsaI* и *AluI*.

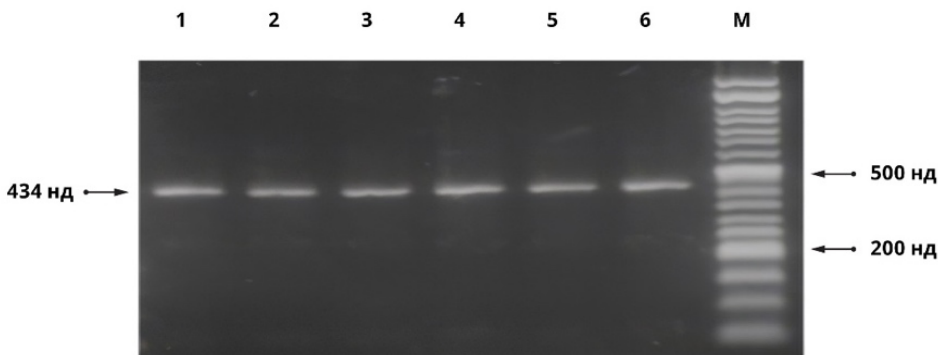
При рестрикционния анализ ампликоните от човешките и животински изолати на *Cryptosporidium*, получени при втората PCR (с вътрешната двойка праймери CPB-DIAGF / CPB-DIAGR), са подложени на едновременно смилане с ензимите *DraI* и *AseI* (*VspI*). Очакваните бандове са с големина около 219 (222), 112 и 104 нд (фигура 17).



Фигура 17. Електрофоретичен анализ през 2% агарозен гел на фрагментираните ампликони (434 нд) от етап 2 на пPCR (вътрешната двойка праймери CPB-DIAGF / CPB-DIAGR), получени след едновременно смилане с рестрикционните ензими *DraI* и *AseI* (*VspI*). Линия M, 50-нд маркер; линия 1, фрагментиран PCR продукт на *C. parvum* (референтна контролна проба ДНК, ATCC PRA-67DQ); линии 2-4, фрагментирани PCR продукти от човешки изолати на *Cryptosporidium* с RFLP профил идентичен с този на референтния щам на *C. parvum* (ATCC PRA-67DQ); линии 5 и 6, фрагментирани PCR продукти от животински изолати (телета) на *Cryptosporidium* с RFLP профил характерен за този на референтния щам на *C. parvum*. Визуализирането на разделените фрагменти е извършено с флуоресцентната боя GelRed® Nucleic Acid Stain.

В нашия експериментален анализ фрагментираните PCR продукти са с големината на тези на продуктите от вида *C. parvum* (219 (222), 112 и 104 нд). Разликата между големините на първия фрагмент за генотип 1 и генотип 2 на *C. parvum* е 3 нд (222 нд за *C. parvum* генотип 1 и 219 нд за *C. parvum* генотип 2). Бандовете с големина 112 и 104 нд мигрират заедно и се появяват като един банд, което не оказва влияние върху интерпретацията на RFLP анализа, нито върху възможността за разграничаване на (петте) вида (*C. parvum* генотип 2, *C. muris*, *C. baileyi*, *C. felis* и *C. meleagridis*).

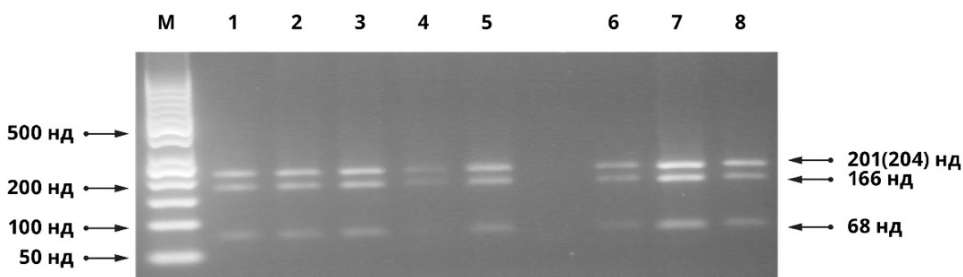
Ензимът *Dra*I разпознава последователността 5'-ТТТ↓ААА-3', която се открива в амплифицирания участък от гена за *18S pPHK* само при видовете *C. baileyi* и *C. felis*. В резултат на действието на ензима се получават фрагменти с големина 84 и 344 нд (ако видът е *C. baileyi*) и 50 и 405 нд (ако видът е *C. felis*). Амплификационните продукти от местните изолати, участващи в проучването, и от референтната контролна проба ДНК на *C. parvum* (ATCC PRA-67DQ) не съдържат място за срязване, определящо се от специфичната за ензима последователност, поради което остават несмлени. Този резултат позволи проучваните изолати да се причислят към вида *C. parvum* (фигура 18).



Фигура 18. Електрофоретичен анализ през 2% агарозен гел на нефрагментираните ампликони (434 нд) от етап 2 на пPCR (вътрешната двойка праймери CPB-DIAGF / CPB-DIAGR) след смилане с рестриктазата *Dra*I. Линия М, 50-нд маркер; линия 1, фрагментиран PCR продукт на *C. parvum* (референтна контролна проба ДНК, ATCC PRA-67DQ); линии 2-4, нефрагментирани PCR продукти от човешки изолати на *Cryptosporidium*; линии 5 и 6, нефрагментирани PCR продукти от животински изолати (телема) на *Cryptosporidium* с RFLP профил характерен за този на референтния щам на *C. parvum* (ATCC PRA-67DQ). Визуализирането на разделените фрагменти е извършено с флуоресцентната боя GelRed® Nucleic Acid Stain.

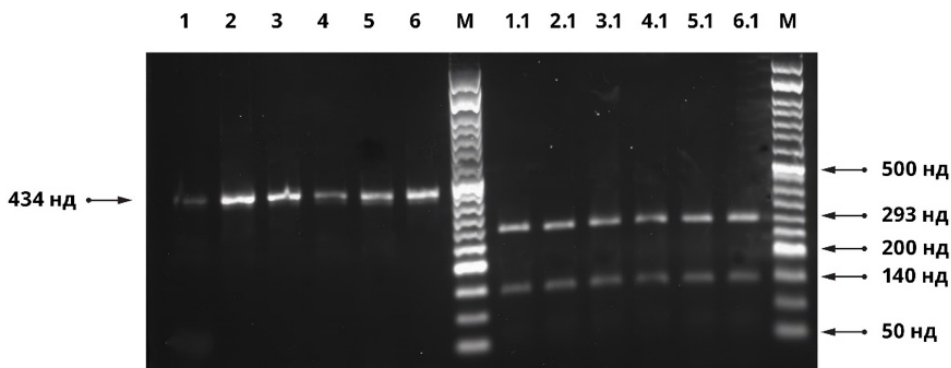
Разграничаването между *C. andersoni* и *C. muris* е възможно чрез допълнително смилане на PCR продуктите (434 нд) от втория етап на реакцията (с вътрешната двойка праймери CPB-DIAGF/CPB-DIAGR) с рестрикцияния ензим *Dde*I. Ензимът разпознава секвенцията 5'- C↓TNAG-3'. На фигура 19 е представена извадка от резултатите от пPCR-RFLP анализ на ампликони от 5 човешки и 3 животински изолата на *Cryptosporidium*, които са разградени на 3 фрагмента с големина ~201(204), 166 и 68 нд. Малката разлика (3 нуклеотида) между рестрикцияните профили на криптоспоридиите от генотип 1 (*C. parvum* human genotype (genotype H)) и генотип 2 (*C. parvum* bovine genotype

(genotype B)) затруднява определянето на генотипа на местните изолати въз основа на получените фрагменти. Използваната в настоящото проучване референтна проба ДНК (Quantitative Genomic DNA from *Cryptosporidium parvum* (ATCC PRA-67DQ)) е закупена от Американската колекция за типови култури (American Type Culture Collection, ATCC) за целите на молекулярните експерименти и представлява количествена геномна ДНК от *Cryptosporidium parvum* Tyzzer (щам *Cryptosporidium parvum* Iowa II). Щамът „Айова“ („Iowa“) на *C. parvum* (генотип 2) първоначално е изолиран от Н. Моон от теле със симптоми в Еймс, Айова и е използван за различни имунологични, биохимични и инфекциозни изследвания при хората и животните и като такъв е станал изолат "златен стандарт", с който се сравняват други изолати. На страницата на ATCC (<https://www.atcc.org/products/prs-67dq>) е публикувана информация за продукта и са направени кръстосани препратки към генната банка (GenBank AAEE01000000 *Cryptosporidium parvum* Iowa II, whole genome shotgun sequencing project), където се съдържат данни за целогеномно секвениране на щамата. Следователно, на базата на изложеното по-горе, и на факта, че рестрикционните профили на местните човешки и животински изолати на *Cryptosporidium* са идентични с профила на щам *Cryptosporidium parvum* Iowa II, използван като референтен в настоящата разработка (фигура19), местните изолати са причислени към генотип 2 на *Cryptosporidium parvum* (зоонозен генотип), който заразява хора, преживни и някои други животни.



Фигура 19. Електрофоретичен анализ (2% агарозен гел) на ампликони (434 нд) от етап 2 на nPCR (с вътрешната двойка праймери CPB-DIAGF/CPB-DIAGR) след смилане с рестриктазата DdeI. Линия М, 50-нд маркер; линия 1, фрагментиран PCR продукт на *C. parvum* (референтна контролна проба ДНК, ATCC PRA-67DQ); линии 2-5, фрагментирани PCR продукти от човешки изолати на *Cryptosporidium*; линии 6-8, фрагментирани PCR продукти от животински изолати (телета) на *Cryptosporidium* с RFLP профил характерен за този на референтния щам на *C. parvum* (ATCC PRA-67DQ) (201(204), 166 и 68 нд). Визуализирането на разделените фрагменти е извършено с флуоресцентната боя GelRed® Nucleic Acid Stain.

С цел разграничаване на изолатите на *C. parvum* от другите видове *Cryptosporidium* е проведен рестрикционен анализ на продуктите от амплификацията на участък от гена, кодиращ *18S pPHK* с ензима *NdeI*. Ампликоните с големина от ~434 нд, получени от втората PCR, са срязани от рестриктазата при изолатите на *C. parvum*. В резултат на съдържащото се място в геномната последователност, което ензимът разпознава (секвенцията 5'-CA↓TATG-3'), са получени два фрагмента с големина 293 нд и 140 нд. В секвенциите на другите видове *Cryptosporidium*, като *C. muris*, *C. baileyi*, *C. serpentis* и *C. felis*, липсва такова място и амплификационните продукти остават цели (несмлени). Това показва принадлежността на проучваните изолати от хора и животни към вида *C. parvum*. Рестрикционните фрагменти на използвания в разработката референтен щам на *C. parvum* (ATCC PRA-67DQ) са идентични на тези, получени при смилането на ампликоните от проучваните човешки и животински изолати (фигура 20).

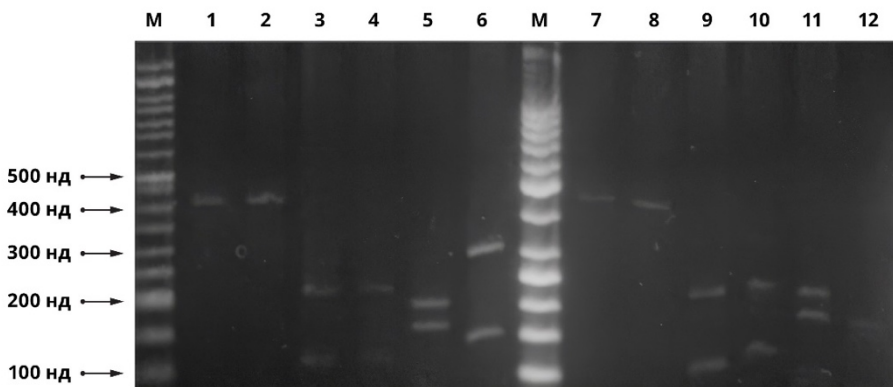


Фигура 20. Електрофореза (2% агарозен гел) на продуктите от пPCR (с вътрешната двойка праймери CPB-DIAGF/CPB-DIAGR), подложени на действието на рестрикционния ензим *NdeI*. Гелът е оцветен с флуоресцентната боя GelRed® Nucleic Acid Stain. Линия M, 50-1500-нд ДНК маркер; линии 1-6, ампликони, получени от втория етап на пPCR (434 нд); линия 1, референтен щам на *C. parvum* генотип 2 (ATCC PRA-67DQ); линии 2-4, PCR продукти от човешки изолати на *Cryptosporidium*; линии 5 и 6, PCR продукти от животински изолати (телема) на *Cryptosporidium*; линии 1.1-6.1, фрагменти, получени след смилането на ампликоните (1-6) от изолати от хора и животни с ензима *NdeI* (~293 и 140 нд).

На фигура 21 е представена общата картина на профилите, получени при смилане на продуктите от пPCR с вътрешната двойка праймери CPB-DIAGF/CPB-DIAGR, която размножава участък от гена, кодиращ *18S pPHK* с големина ~434 нд, на изолат от теле и човешки изолат. Резултатите от проведените PCR-RFLP реакции са представени в таблица 3.

Таблица 3. Рестрикционни фрагменти, получени в резултат на смилането с ензимите *DraI*, *VspI*, *DraI+VspI*, *DdeI* и *NdeI* на участък от гена, кодиращ 18S рРНК (~434 нд) на изолати от животински и човешки произход.

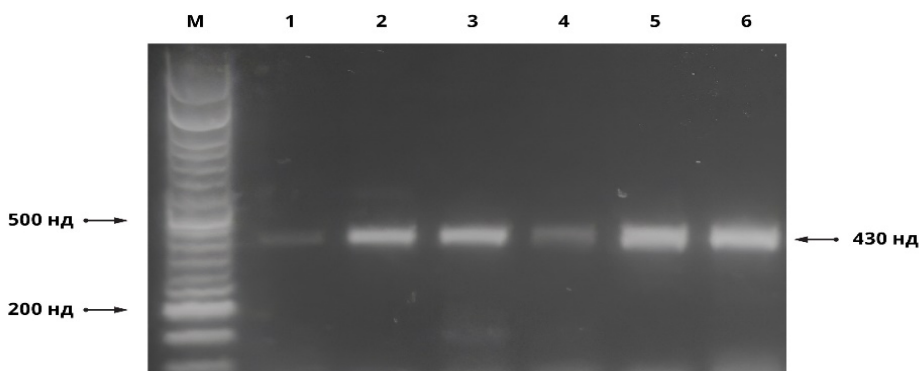
Позиция на гела	Ензим	Големина на фрагментите от PCR-RFLP	Идентификация до вид (генотип)
М (50-нд маркер)	изолат от теле / човешки изолат позиции от 1-6 / 7-12		
1/7	-	~434 нд	
2/8	<i>DraI</i>	не съдържат място за срязване	<i>Cryptosporidium parvum</i>
3/9	<i>VspI</i>	фрагментирани PCR продукти 219 (222*) и 112 нд (липсва 104 bp)	<i>C. parvum</i> *-генотип 2
4/10	<i>DraI+VspI</i>	фрагментирани PCR продукти 219 (222*) и 112 нд (липсва 104 bp)	<i>C. parvum</i> *-генотип 2
5/11	<i>DdeI</i>	три фрагмента с големина 201(204*), 166 и 68 нд	<i>C. parvum</i> *-генотип 2
6/12	<i>NdeI</i>	два фрагмента с големина 293 нд и 140 нд	<i>C. parvum</i>



Фигура 21. Електрофоретичен анализ през 2% агарозен гел на ампликоните преди и след смилане с рестриктазните ензими *DraI* (линии 2 и 8), *VspI* (линии 3 и 9), *DraI+VspI* (линии 4 и 10), *DdeI* (линии 5 и 11) и *NdeI* (линии 6 и 12). Линии М, 50-нд маркер; Линии 1-6, животински изолат (теле); линии 7-12, човешки изолат; линии

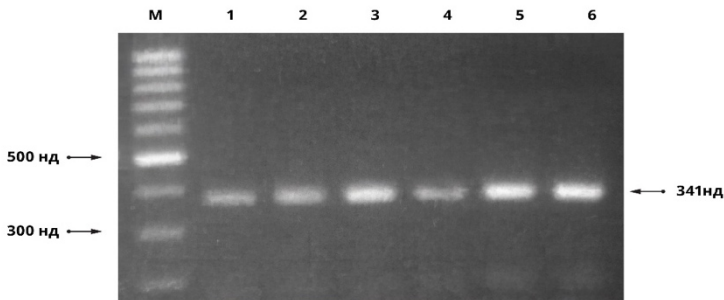
1 и 7, не смлени продукти от nPCR с вътрешната двойка CPB-DIAGF/CPB-DIAGR (с големина ~434 нд) на изолати от теле и човек.

За амплификация на гена, кодиращ протеин от ооцистната стена на *Cryptosporidium* (COWP) е приложен nPCR (COWP-nPCR). Този ген е представен с едно копие в генома на паразита. Амплификацията е проведена в два етапа. По време на първият етап правия (PCOWPF) и обратния (PCOWPR) праймери амплифицират фрагмент от гена за COWP с големина 430 нд. Участък от COWP гена е амплифициран успешно от всички положителни проби в PCR в реално време с търговския набор VIASURE, 32 от хора и 37 от животни (фигура 22).



Фигура 22. Електрофоретичен анализ през 1,5% агарозен гел на продуктите от етап 1 на nPCR (430 нд) с външната двойка праймери PCOWPF/PCOWPR. Линия M, 50-нд маркер; линия 1, референтна контролна проба ДНК на *C. parvum* (ATCC PRA-67DQ); линии 2-4, ДНК проби, изолирани от фецеси на пациенти с диарийни изхождания; линии 5 и 6, ДНК проби, изолирани от животински фецеси. Визуализирането на разделените продукти е извършено с флуоресцентната боя GelRed® Nucleic Acid Stain.

Във втория етап на реакцията продуктите от етап едно служат като матрица за вътрешните праймери (PCOWPIF/IR), които амплифицират фрагмент от гена за COWP с големина 341 нд. Ампликоните, намножени при този втори етап, след това се подлагат на рестрикционен анализ за генотипиране на местните изолати на *Cryptosporidium* чрез RFLP анализ на базата на смилане с рестриктазните ензими *AluI* и *RsaI* (фигура 23).



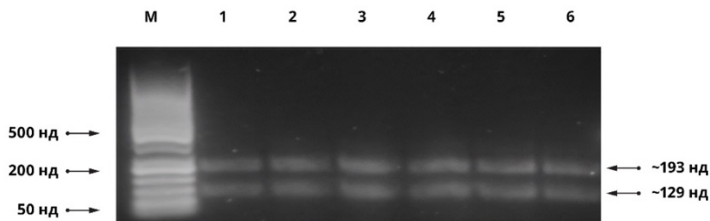
Фигура 23. Електрофоретичен анализ през 1,5% агарозен гел на ампликоните (341 нд) от етап 2 на pPCR с вътрешната двойка праймери PCOWPIF/PCOWPIR. Линия М, 100-1000 нд маркер; линия 1, референтна контролна проба ДНК на *C. parvum* (ATCC PRA-67DQ); линии 2-4, ДНК проби, изолирани от фецеси на пациенти с диарийни изхождания; линии 5 и 6, ДНК проби, изолирани от животински фецеси. Визуализирането на разделените продукти е извършено с флуоресцентната боя GelRed® Nucleic Acid Stain.

Поради висока степен на полиморфизъм в COWP гена, рестрикционните места за ензимите *RsaI* и *AluI* се използват за идинифицирането на *C. hominis* и *C. parvum* и разграничаването им от останалите видове криптоспоридии. Резултатите от смилането на PCR продуктите (341 нд) с ензимите *AluI* и *RsaI* са с RFLP профили, характерни за *C. parvum* генотип 2.

В редица проучвания на рестрикционните профили, получени при смилане с *RsaI* и с *AluI* на 341-нд фрагмент от гена, кодиращ протеин от ооцистната стена на *Cryptosporidium*, амплифициран от двойката праймери PCOWPIF/PCOWPIR показват, че *Cryptosporidium parvum* е основният причинител на криптоспоридиозата при хората (доказан е и сред проби от телета) и включва най-малко два различни генотипа, които таксономично представляват отделни видове паразити (*C. hominis* и *C. parvum*). Единият генотип се среща изключително при естествено заразени хора и при един нечовекоподобен примат (генотип 1 или човешки генотип), а вторият се среща при стопански животни, както и при хора (генотип 2 или говежди генотип).

Резултатите от RFLP анализа, за определяне на вида (генотипа) на *Cryptosporidium* чрез рестрикционно смилане на COWP генен фрагмент е извършен с ензимите *RsaI* и *AluI* както е описано от Amar et al., 2004. Рестрикционните фрагменти са разделени чрез електрофореза в 2% агарозни гелове и оцветени с флуоресцентната боя GelRed® Nucleic Acid Stain. Генерираните фрагменти с *RsaI* са с големина ~311 и 30 нд (*C. parvum* генотип 2), а под действието на ензима *AluI*, продуктите са разградени на три фрагмента

с големини 193 и 129 нд. Последният, най-малък фрагмент (19 нд), не достига прага на визуализиране (фигура 24).



Фигура 24. Електрофоретичен анализ (2% агарозен гел) на ампликони (341 нд) от етап 2 на pPCR (с вътрешната двойка праймери PCOWPIF/PCOWPIR) след смилане с рестриктазата *AluI*. Линия М, 50-нд.маркер; линия 1, фрагментиран PCR продукт на *C. parvum* (референтна контролна проба ДНК, ATCC PRA-67DQ); линии 2-4, фрагментирани PCR продукти от човешки изолати на *Cryptosporidium*; линии 5 и 6, фрагментирани PCR продукти от животински изолати (телета) на *Cryptosporidium*. RFLP профилът на всички местни изолати са идентични на този на референтния щам на *C. parvum* (ATCC PRA-67DQ) (193 и 129 нд). Визуализирането на разделените фрагменти е извършено с флуоресцентната боя GelRed®

В различни проучвания трите вида *C. parvum*, *C. bovis* и *C. ryanae* са най-често изолирани при изследване на млади говеда. Установена е и свързана с възрастта последователност на откриване на видовете *Cryptosporidium* при млечни телета. Видът *C. parvum* е доказан в по-голямата част от инвазиите при предварително отбити млечни телета, докато *C. bovis* и *C. ryanae* се срещат при по-стари или вече отбити телета. В нашето проучване резултатите са сходни с публикуваните от тези автори и от други изследователски групи. В анализираният от нас животински проби е идентифициран видът *C. parvum* (зоонозен генотип 2). Възрастта на животните при пробонабирането варира от 6 дни до 2 месеца (козлето е на 1 месец). Най-голям ($n=29$) е броят на тези под едномесечна възраст, докато останалите 8 животни са по-големи – на 1 месец ($n=6$), на 38 дни ($n=1$) и на 2 месеца ($n=1$). Тези резултати са в съответствие с установеното от други проучвания, които описват, че телетата на възраст под 2 месеца са преобладаващата популация, заразена с *C. parvum* (зоонозен вид). Животновъдите и въобще хората, които се грижат или имат контакт с тези животни са изложени на риск от заразяване с *C. parvum*. В подкрепа на това заключение са изследванията на учени от Иран, които съобщават за зоонозна трансмисия на *Cryptosporidium parvum* сред хората, работещи в близост до телета. В нашето изследване са установени лица ($n=3$), чиито проби се позитивират след контакт със заразени с *C. parvum* животни по три от използваните методи за диагностика.

Молекулярно-генетичното характеризиране на изолатите от фекална проба от хора в настоящата разработка показва тяхната принадлежност към същия генотип 2 на *C. parvum*, който се установи и във фекалните проби от животни.

Идентифицирането на *Cryptosporidium* spp. на ниво вид или генотип е от съществено значение за оценката потенциала на паразитите и на източниците на инвазия – хора и животни в светлината на инициативата на СЗО „One health“.

Cryptosporidium parvum е сред малкото видове *Cryptosporidium* с широк кръг гостоприемници и е най-важният зоонозен вид. Субтипирането активно се използва за установяване на трансмисията на *C. parvum* при хора и животни.

5. Резултати от влиянието на демографския статус на изследваните лица върху честотата на разпространение на криптоспоридиозата

За да се установи разпространението на криптоспоридиозата сред населението на Плевенска област е осъществено проучване сред таргетни групи изследвани лица според основните демографски показатели: пол, възраст, етническа принадлежност, вид населено място.

При изследване на основната група от 1133 лица от областта, позитивни за криптоспоридиоза са общо 86 лица, като са приложени три основни диагностични метода.

5.1 Разпределение на изследваните лица за криптоспоридиоза в зависимост от пола

Изследвани за криптоспоридиоза са общо 1133 лица. От тях 547 са от женски пол и 586 са от мъжки. От тестваните чрез ELISA позитивни лица за криптоспоридиоза лица от женски пол са 7,3% и от мъжки – 7,2%. Чрез морфодиагностика по модифициран метод на Ziehl-Neelsen (метод на Kinyoun) позитивни за криптоспоридиоза са еднакъв процент за двата пола – 7,3%. Приблизителни резултати се получават при изследване чрез бързите имунохроматографски тестове – позитивен резултат е получен при 6,9% лица от женски пол и 6,3% от мъжки пол.

Коефициентите на Крамер (Cramer's V) за трите метода варират от 0,000 до 0,013 и показват слаба корелационна зависимост между пола и заболяването криптоспоридиоза. Това се потвърждава и от стойностите на p-value (0,925; 0,987; 0,668), които показват липса на статистически значими разлики в честотата на опаразитяване при мъжете и жените.

В таблица 4 са представени резултати от потвърдените случаи за криптоспоридиоза по използваните методи в зависимост от признака пол.

Таблица 4. Разпределение на потвърдените за криптоспоридиоза случаи в зависимост от пола

		Негативни n (%)	Позитивни n (%)	Общо n (%)	Cramer's V	Sig. (p-value)
ELISA						
ПОЛ	жени	2 (4,9)	39 (95,1)	41 (100,0)	0,162	0,134
	мъже	0 (0,0)	45 (100,0)	45 (100,0)		
Общо		2 (2,3)	84 (97,7)	86 (100,0)		
Модифициран Ziehl-Neelsen						
ПОЛ	жени	5 (12,2)	36 (87,8)	41(100,0)	0,017	0,875
	мъже	6 (13,3)	39 (86,7)	45 (100,0)		
Общо		11 (12,8)	75 (87,2)	86 (100,0)		
Имунохроматографски бърз тест - ICH						
ПОЛ	жени	2 (4,9)	39 (95,1)	41 (100,0)	0,114	0,291
	мъже	5 (11,1)	40 (88,9)	45 (100,0)		
Общо		7 (8,1)	79 (91,9)	86 (100,0)		
RT-PCR VIASURE						
ПОЛ	жени	29 (70,7)	12 (29,3)	41 (100,0)	0,157	0,146
	мъже	25 (55,6)	20 (44,4)	45 (100,0)		
Общо		54 (62,8)	32 (37,2)	86 (100,0)		
nPCR 18S rRNA						
ПОЛ	жени	29 (70,7)	12 (29,3)	41 (100,0)	0,157	0,146
	мъже	25 (55,6)	20 (44,4)	45 (100,0)		
Общо		54 (62,8)	32 (37,2)	86 (100,0)		
nCOWP-PCR						
ПОЛ	жени	29 (70,7)	12 (29,3)	41 (100,0)	0,157	0,146
	мъже	25 (55,6)	20 (44,4)	45 (100,0)		
Общо		54 (62,8)	32 (37,2)	86 (100,0)		

Корелационната зависимост между пола и заразяването с *Cryptosporidium* spp. е слаба, което е видно от ниските коефициенти на Крамер (0,017 ÷ 0,162). Р-стойностите (p-value) варират в границите 0,134 ÷ 0,875 и доказват, че заразяването с *Cryptosporidium* spp. не зависи от пола.

5.2 Разпределение на изследваните лица за криптоспоридиоза в зависимост от етническата принадлежност

Общо изследвани за криптоспоридиоза са 1133 лица . От тях 887 са българи, 47 са турци, а 199 на роми.

От тестваните чрез ELISA, позитивни за криптоспоридиоза са 6,8% лица от българската етническа група, а 11,1% са от ромската. Позитивни проби при лицата от турската етническа група не са установени и по трите използвани метода. Чрез морфодиагностика по модифициран метод на Ziehl-Neelsen (метод на Kinyoun) позитивни за криптоспоридиоза са 6,75% българи и 11,6% роми.

Бързите имунохроматографски тестове показват, че позитивни лица от българската етническа група са 6,3%, а 9,5% са роми.

Въпреки че, коефициентите на Крамер (0,074; 0,083; 0,086) показват слаба връзка между етническата принадлежност и заболяемостта от криптоспоридиоза, при анализираният чрез ELISA и модифициран метод на Ziehl-Neelsen проби, се отчитат статистически значими разлики (0,041; 0,050) в заболяемостта на лицата от различните етнически групи. При бързите имунохроматографски тестове не се установяват значими разлики между различните етноси (0,101).

В таблица 5 са представени резултатите при потвърдените случаи за криптоспоридиоза според етническата принадлежност на изследваните лица.

Таблица 5. Разпределение на потвърдените за криптоспоридиоза случаи в зависимост от етническата принадлежност

		Негативни n (%)	Позитивни n (%)	Общо n (%)	Cramer's V	Sig. (p-value)
ELISA						
етническа група	българи	1 (1,7)	57 (98,3)	58 (100,0)	0,057	0,594
	роми	1 (3,6)	27 (96,4)	28 (100,0)		
Общо		2 (2,3)	84 (97,7)	86 (100,0)		
Модифициран Ziehl-Neelsen						
етническа група	българи	8 (13,8)	50 (86,2)	58 (100,0)	0,043	0,689
	роми	3 (10,7)	25 (89,3)	28 (100,0)		
Общо		11 (12,8)	75 (87,2)	86 (100,0)		
Имунохроматографски бърз тест - ICH						
етническа група	българи	3 (5,2)	55 (94,8)	58 (100,0)	0,156	0,148
	роми	4 (14,3)	24 (85,7)	28 (100,0)		
Общо		7 (8,1)	79 (91,9)	86 (100,0)		
RT-PCR VIASURE						
етническа група	българи	31 (53,4)	27 (46,6)	58 (100,0)	0,278	0,010
	роми	23 (82,1)	5 (17,9)	28 (100,0)		
Общо		54 (62,8)	32 (37,2)	86 (100,0)		
NPCR 18S rRNA						
етническа група	българи	31 (53,4)	27 (46,6)	(58) 100,0	0,278	0,010
	роми	23 (82,1)	5 (17,9)	(28) 100,0		
Общо		54 (62,8)	32 (37,2)	(86) 100,0		
nCOWP-PCR						
етническа група	българи	31 (53,4)	27 (46,6)	58 (100,0)	0,278	0,010
	роми	23 (82,1)	5 (17,9)	28 (100,0)		
Общо		54 (62,8)	32 (37,2)	86 (100,0)		

При потвърдените за криптоспоридиоза случаи чрез ELISA, модифициран метод на Ziehl-Neelsen и имунохроматографски методи, коефициентите на Крамер са съответно 0,057; 0,043 и 0,156, т.е. едва 4,3% ÷ 15,6% от вариациите в потвърдените с тези диагностични методи случаи се дължат на етническата

принадлежност. Р-стойностите (0,594; 0,689 и 0,148) не отчитат значими разлики между различните етноси.

Значими разлики между етносите (0,010) са установени при трите разновидности на PCR – RT-PCR VIASURE, nPCR 18S rRNA и MT nPCR COWP, а според коефициентите на Крамер 27,8% от вариациите в данните се дължат на етническата принадлежност на изследваните лица.

5.3 Разпределение на изследваните лица за криптоспоридиоза в зависимост от населеното място

От изследваните 1133 лица 730 живеят в град, а 403 в село.

Резултатите от провеждането на ELISA показват по-висок процент положителни проби при лицата живеещи на село – 9,9% спрямо тези от градското население – 5,8%. Чрез морфодиагностика по модифициран метод на Ziehl-Neelsen (метод на Kinyoun) позитивни са 5,5% от живеещите в градовете и 10,7% в селата. Позитивните резултати при бързите имунохроматографски тестове са 5,6% при градските жители и 8,4% в при тези от селата.

Отново са изчислени статистически значими разлики (p-value = 0,009; 0,001) между потвърдените за криптоспоридиоза случаи чрез ELISA и модифицирания метод на Ziehl-Neelsen според местоживеенето. При използване на бързите имунохроматографски тестове не са установени значими разлики (p-value = 0,068) между лицата, живеещи в градовете, и тези от селата. И при трите метода между 5,4% ÷ 9,5% от вариациите в случаите се дължат на признака населено място (Cramer's V = 0,077; 0,095 и 0,054).

В таблица 6 са представени резултатите при потвърдените случаи за криптоспоридиоза в зависимост от местоживеенето.

Таблица 6. Разпределение на потвърдените за криптоспоридиоза случаи в зависимост от местоживеенето

		Негативни n (%)	Позитивни n (%)	Общо n (%)	Cramer's V	Sig. (p-value)
ELISA						
населено място	град	1 (2,2)	44 (97,8)	45 (100,0)	0,007	0,947
	село	1 (2,4)	40 (97,6)	41 (100,0)		
Общо		2 (2,3)	84 (97,7)	86 (100,0)		
Модифициран Ziehl-Neelsen						
населено място	град	7 (15,6)	38 (84,4)	45 (100,0)	0,087	0,421
	село	4 (9,8)	37 (90,2)	41 (100,0)		
Общо		11 (12,8)	75 (87,2)	86 (100,0)		
Имунохроматографски бърз тест - ICH						
населено място	град	3 (6,7)	42 (93,3)	45 (100,0)	0,056	0,601
	село	4 (9,8)	37 (90,2)	41 (100,0)		

Общо		7 (8,1)	79 (91,9)	86 (100,0)		
RT-PCR VIASURE						
населено място	град	22 (48,9)	23 (51,1)	45 (100,0)	0,301	0,005
	село	32 (78,0)	9 (22,0)	41 (100,0)		
Общо		54 (62,8)	32 (37,2)	86 (100,0)		
nPCR 18S rRNA						
населено място	град	22 (48,9)	23 (51,1)	45 (100,0)	0,301	0,005
	село	32 (78,0)	9 (22,0)	41 (100,0)		
Общо		54 (62,8)	32 (37,2)	86 (100,0)		
nCOWP-PCR						
населено място	град	22 (48,9)	23 (51,1)	45 (100,0)	0,301	0,005
	село	32 (78,0)	9 (22,0)	41 (100,0)		
Общо		54 (62,8)	32 (37,2)	86 (100,0)		

При потвърдените за криптоспоридиоза случаи чрез методите ELISA, оцветяване по Ziehl-Neelsen и имунохроматографски на лица от различни населени места, коефициентите на Крамер са съответно 0,007; 0,083 и 0,056, т.е. много малък процент от вариациите (0,7% ÷ 8,3%) в потвърдените случаи с тези диагностични методи зависят от местоживеенето. Р-стойностите (0,947; 0,421 и 0,601) са показател, че няма значими разлики между честотата на опаразитяване на лицата от градовете и селата.

При използване на трите разновидности на PCR – RT-PCR VIASURE, nPCR 18S rRNA и MT nPCR COWP се установи, че местоживеенето оказва влияние на честотата на опаразитяване на лицата (0,005). Коефициентите на Крамер (0,301) показват, че 30,1% от вариациите в данните се дължат на признака населено място на изследваните лица.

5.4 Разпределение на изследваните за криптоспоридиоза проби в зависимост от възрастта

Общо изследвани за криптоспоридиоза са 1133 проби. От тях 129 са на лица от първата възрастова група, 665 са на такива от втората, 64 от третата и 275 от четвъртата група. От тестваните чрез ELISA, позитивни за криптоспоридиоза са 9,3% лица от първата група, 6,9% от втората, 7,8% от третата и 6,9% от четвъртата група. Чрез морфодиагностика по модифициран метод на Ziehl-Neelsen (метод на Kinyoun) позитивни за криптоспоридиоза са 8,5% лица от първа група, 6,2% от втората, 7,8% от третата и 9,5% от четвъртата група. Бързите имунохроматографски тестове показват следните положителни резултати: 7,0% от първата възрастова група, 6,2% от втората, 7,8% от третата и 7,3% от четвъртата възрастова група.

Коефициентите на Крамер за трите метода варират от 0,023 до 0,055 и показват слаба корелационна зависимост между възрастта и честотата на опаразитяване с *Cryptosporidium* spp. Това се потвърждава и от стойностите на p-value (0,802; 0,327; 0,900), които показват, че честотата на опаразитяване не зависи от възрастовата група.

В таблица 7 са представени резултатите на потвърдените случаи за криптоспоридиоза според възрастта на изследваните лица.

Таблица 7. Разпределение на потвърдените за криптоспоридиоза проби в зависимост от възрастта

		Негативни n (%)	Позитивни n (%)	Общо n (%)	Cramer's V	Sig. (p-value)
ELISA						
възраст	0-2 г.	0 (0,0)	12 (100,0)	12 (100,0)	0,134	0,672
	3-7 г.	2 (4,1)	47 (95,9)	49 (100,0)		
	8-18 г.	0 (0,0)	5 (100,0)	5 (100,0)		
	19-70 г.	0 (0,0)	20 (100,0)	20 (100,0)		
Общо		2 (2,3)	84 (97,7)	86 (100,0)		
Модифициран Ziehl-Neelsen						
възраст	0-2 г.	1 (8,3)	11 (91,7)	12 (100,0)	0,199	0,334
	3-7 г.	9 (18,4)	40 (81,6)	49 (100,0)		
	8-18 г.	0 (0,0)	5 (100,0)	5 (100,0)		
	19-70 г.	1 (5,0)	19 (95,0)	20 (100,0)		
Общо		11 (12,8)	75 (87,2)	86 (100,0)		
Имунохроматографски бърз тест - ICH						
възраст	0-2 г.	0 (0,0)	12 (100,0)	12 (100,0)	0,259	0,124
	3-7 г.	7 (14,3)	42 (85,7)	49 (100,0)		
	8-18 г.	0 (0,0)	5 (100,0)	5 (100,0)		
	19-70 г.	0 (0,0)	20 (100,0)	20 (100,0)		
Общо		7 (8,1)	79 (91,9)	86 (100,0)		
RT-PCR VIASURE						
възраст	0-2 г.	6 (50,0)	6 (50,0)	12 (100,0)	0,634	0,000
	3-7 г.	43 (87,8)	6 (12,2)	49 (100,0)		
	8-18 г.	0 (0,0)	5 (100,0)	5 (100,0)		
	19-70 г.	5 (25,0)	15 (75,0)	20 (100,0)		
Общо		54 (62,8)	32 (37,2)	86 (100,0)		
nPCR 18S rRNA						
възраст	0-2 г.	6 (50,0)	6 (50,0)	12 (100,0)	0,634	0,000
	3-7 г.	43 (87,8)	6 (12,2)	49 (100,0)		
	8-18 г.	0 (0,0)	5 (100,0)	5 (100,0)		
	19-70 г.	5 (25,0)	15 (75,0)	20 (100,0)		
Общо		54 (62,8)	32 (37,2)	86 (100,0)		
nCOWP-PCR						
възраст	0-2 г.	6 (50,0)	6 (50,0)	12 (100,0)	0,634	0,000
	3-7 г.	43 (87,8)	6 (12,2)	49 (100,0)		
	8-18 г.	0 (0,0)	5 (100,0)	5 (100,0)		
	19-70 г.	5 (25,0)	15 (75,0)	20 (100,0)		
Общо		54 (62,8)	32 (37,2)	86 (100,0)		

При потвърдените за криптоспоридиоза случаи чрез ELISA, модифициран метод на Ziehl-Neelsen и имунохроматографски методи, р-стойностите (0,672; 0,334 и 0,124) показват, че няма статистически значимо влияние на признака възраст върху честотата на опаразитяване с *Cryptosporidium* spp. При използване на трите разновидности на PCR – RT-PCR VIASURE, nPCR 18S rRNA и MT nPCR COWP се установи, че възрастта влияе значително върху честотата на опаразитяване с *Cryptosporidium* spp. Потвърждение за това са коефициентите на Крамер (0,634), според които 63,4% от вариациите в потвърдените с тези диагностични методи случаи се дължат на възрастта на пациентите.

5.5 Разпределение на позитивните лица за криптоспоридиоза в зависимост от клиничното протичане на заболяването

В таблица 8 са представени резултати на изследваните позитивни за криптоспоридиоза лица в зависимост от клиничното протичане на заболяването. Общият брой на позитивните проби е 86 (100,0%).

Таблица 8. Разпределение на позитивните за криптоспоридиоза проби в зависимост от наличие или отсъствие на симптоми при протичане на заболяването

		Асимтомно n (%)	Симптомно n (%)	Общо n (%)	Cramer's V	Sig. (p-value)
ELISA						
пол	жена	31 (75,6)	10 (24,4)	41 (100,0)	0,253	0,019
	мъж	23 (51,1)	22 (48,9)	45 (100,0)		
Общо		54 (62,8)	32 (37,2)	86 (100,0)	0,432	0,000
етническа група	българи	28 (48,3)	30 (51,7)	58 (100,0)		
	роми	26 (92,9)	2 (7,1)	28 (100,0)		
Общо		54 (62,8)	32 (37,2)	86 (100,0)		
населено място	град	21 (46,7)	24 (53,3)	45 (100,0)	0,349	0,001
	село	33 (80,5)	8 (19,5)	41 (100,0)		
Общо		54 (62,8)	32 (37,2)	86 (100,0)		
възраст	0-2 г.	4 (33,3)	8 (66,7)	12 (100,0)	0,754	0,000
	3-7 г.	46 (93,9)	3 (6,1)	49 (100,0)		
	8-18 г.	0 (0,0)	5 (100,0)	5 (100,0)		
	19-70 г.	4 (20,0)	16 (80,0)	20 (100,0)		
Общо		54 (62,8)	32 (37,2)	86 (100,0)		

При изследваните позитивни за криптоспоридиоза лица в зависимост от наличието или отсъствието на симптоми при протичането на криптоспоридиоза най-високи коефициенти на Крамер са получени за признака възраст (0,754), следван от етническата принадлежност (0,432). От тук

може да се направи извод, че тези два признака оказват най-силно влияние върху изследваните показатели.

6. Резултати от изследваните животни

Общо изследваните проби на животни са 107, като от тях 11 са поставени в контролна група, в която не са установени позитивни за *Cryptosporidium* spp. проби.

В таблица 9 са представени резултати от изследваните за криптоспоридиоза животни по трите използвани метода. Общо изследвани за криптоспоридиоза по трите метода са 96 животни. От тях 2 са агнета, 2 са кози, 1 козле, 28 са крави и 63 – телета .

Таблица 9. Разпределение на изследваните за криптоспоридиоза проби в зависимост от вида на животното

		Негативни n (%)	Позитивни n (%)	Общо n (%)	Cramer's V	Sig. (p-value)
ELISA						
вид животно	агне	2 (100)	0 (0,0)	2 (100)	0,473	0,000
	коза	2 (100)	0 (0,0)	2 (100)		
	козле	0 (0,0)	1 (100)	1 (100)		
	крава	25 (89,3)	3 (10,7)	28 (100)		
	теле	27 (42,9)	36 (57,1)	63 (100)		
Общо		56 (58,3)	40 (41,7)	96 (100)		
Модифициран Ziehl-Neelsen						
вид животно	агне	2 (100)	0 (0,0)	2 (100)	0,365	0,012
	коза	2 (100)	0 (0,0)	2 (100)		
	козле	0 (0,0)	1 (100)	1 (100)		
	крава	22 (78,6)	6 (21,4)	28 (100)		
	теле	29 (46,0)	34 (54,0)	63 (100)		
Общо		55 (57,3)	41 (42,7)	96 (100)		
Имунохроматографски бърз тест - ICH						
вид животно	агне	2 (100)	0 (0,0)	2 (100)	0,523	0,000
	коза	2 (100)	0 (0,0)	2 (100)		
	козле	0 (0,0)	1 (100)	1 (100)		
	крава	27 (96,4)	1 (3,6)	28 (100)		
	теле	28 (44,4)	35 (55,6)	63 (100)		
Общо		59 (61,5)	37 (38,5)	96 (100)		

Общият брой на негативните проби изследвани чрез ELISA е 56, като от тях 2 са от агнета, 2 от кози, 25 от крави и 27 от телета. Позитивни резултати са получени в три от групите като най-голям брой има при телетата 36. Три положителни проби има при кравите, а една при козлето. Общият брой позитивни проби е 40.

Чрез морфодиагностика по модифициран метод на Ziehl-Neelsen (метод на Kinyoun) негативни са общо 55 проби, като от тях 2 са от агнета, 2 от кози, 22 от крави и 29 от телета. Ооцисти на криптоспоридии са открити в общо 41 проби – 1 от козлето, 6 от крави и 34 от телета.

Чрез бързите имунохроматографски тестове общият брой на позитивните проби е 37, като от тях 1 е на козле, 1 от крава и 35 от телета.

Общият брой отрицателни проби е 59, като от тях 2 са от агнета, 2 от кози, 27 от крави и 28 от телета.

Коефициентите на Крамер (Cramer's V) за трите метода варират от 0,365 до 0,523 и показват умерена корелационна зависимост между животинския вид и честотата на опаразитяване с *Cryptosporidium* spp. при животните. Това се потвърждава и от стойностите на p-value (0,000; 0,012; 0,000), които показват статистически доказано влияние на признака вид животно върху честотата на опаразитяване с *Cryptosporidium* spp.

В таблица 10 са представени резултати от изследваните за криптоспоридиоза проби на животни по трите използвани метода в зависимост от възрастта на животното. Общият брой изследвани животни 67 са млади животни, а 29 възрастни.

Таблица 10. Разпределение на изследваните за криптоспоридиоза проби в зависимост от възрастта на животното

		Негативни n (%)	Позитивни n (%)	Общо n (%)	Cramer's V	Sig. (p-value)
ELISA						
възраст	възрастни	26 (89,7)	3 (10,3)	29 (100)	0,418	0,000
	млади	30 (44,8)	37 (55,2)	67 (100)		
Общо		56 (58,3)	40 (41,7)	96 (100)		
Модифициран Ziehl-Neelsen						
възраст	възрастни	23 (79,3)	6 (20,7)	29 (100)	0,293	0,004
	млади	32 (47,8)	35 (52,2)	67 (100)		
Общо		55 (57,3)	41 (42,7)	96 (100)		
Имунохроматографски бърз тест - ICH						
възраст	възрастни	28 (96,6)	1 (3,4)	29 (100)	0,474	0,000
	млади	31 (46,3)	36 (53,7)	67 (100)		
Общо		59 (61,5)	37 (38,5)	96 (100)		

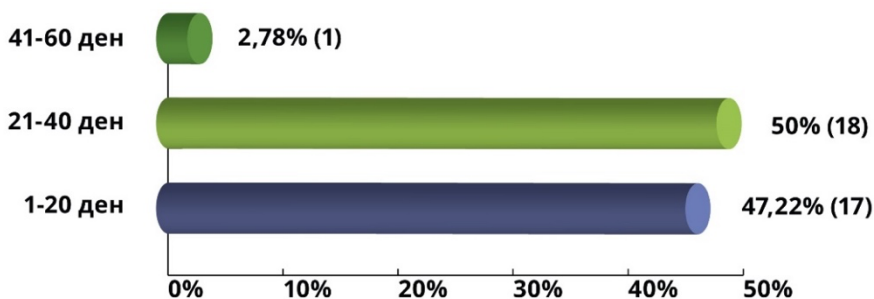
Отрицателни са общо 56 проби от изследваните с метода ELISA, като от тях 26 са на възрастни и 30 на млади животни. Подобни резултати са установени и по модифицирания метод на Ziehl-Neelsen (метод на Kinyoun). От общо 55 отрицателни проби на животни, 23 са от възрастни, а 32 от млади животни.

Положителните проби с ELISA са общо 40 – 37 от млади животни и само 3 от възрастни. По модифицирания метод на Ziehl-Neelsen позитивни са общо 41 проби – 35 от млади, а 6 от възрастни животни.

Позитивните проби установени чрез бързите имунохроматографски тестове са общо 37. С изключение на 1 всички проби са от младите животни (36). Общият брой негативни проби за криптоспоридиоза на изследваните животни е 59, от тях 28 са от възрастни и 31 от млади животни.

При потвърдените за криптоспоридиоза случаи чрез ELISA и бързите имунохроматографски тестове е установена умерена по сила връзка (Cramer's $V=0,418$; $0,474$) между възрастта и честотата на опаразитяване с *Cryptosporidium* spp. при животните, докато при модифицирания метод на Ziehl-Neelsen тази връзка е слаба ($0,293$). И при трите използвани метода влиянието на възрастта върху честотата на опаразитяване с *Cryptosporidium* spp. при животните е статистически значимо ($p\text{-value} = 0,000$; $0,004$; $0,000$).

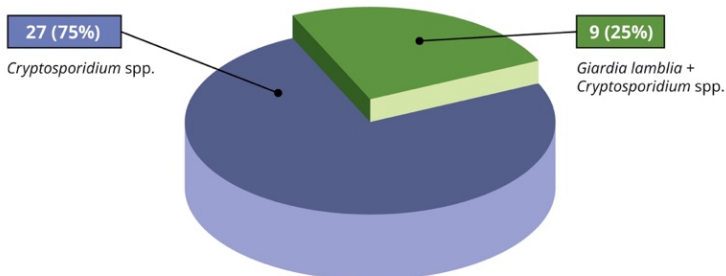
На фигура 25 са представени резултати от разпределението на позитивните случаи при телетата в зависимост от възрастта. Приблизителен е броят на позитивните проби в първите две възрастови групи, съответно 17 в първата и 18 във втората. При третата е регистриран само един случай.



Фигура 25. Разпределение на позитивни случаи на криптоспоридиоза при телетата в зависимост от възрастта

Само положителните за криптоспоридиоза по използваните три метода животински проби са подложени на PCR тестове.

При 9 от пробите на млади телета чрез RT-PCR VIASURE е детектирана полиинвазия – *Cryptosporidium* spp. + *Giardia lamblia*. Резултатите са представени на фигура 26.



Фигура 26. Наличие на полиинвазия с *Cryptosporidium* spp. и *Giardia lamblia* при телетата

7. Резултати от анкетно проучване сред персонал от детски градини, ясли и клиники за информираността им относно ЧПИ и криптоспоридиоза

В анкетното проучване участват 233 лица, от тях 79 работят в лечебно заведение, 118 в детска градина и 36 в детска ясла. По професия лицата са разпределени както следва: 30 са лекари, 71 медицински сестри, 56 детски учители, 42 помощник-възпитатели, 16 детегледачи и 17 санитарни. По образование 94 лица са магистри, 58 са бакалаври, 20 са специалисти, със средно образование са 54 лица и 7 са с основно образование.

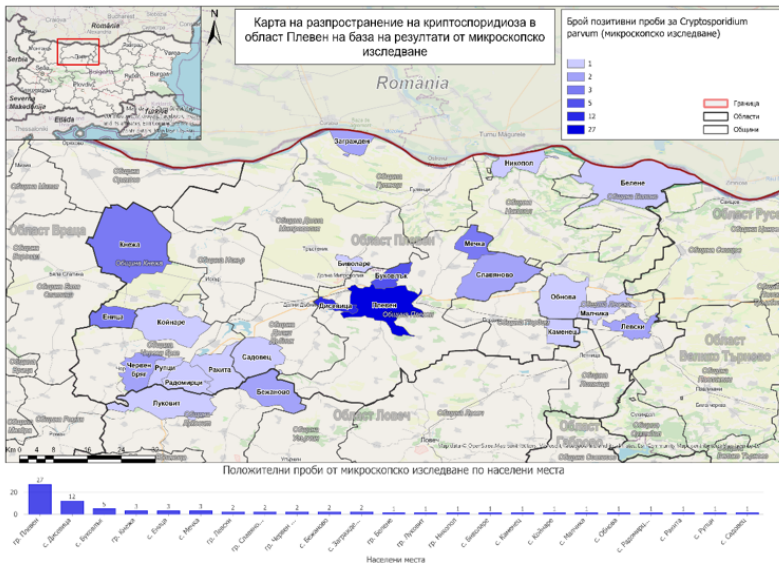
В резултат на проведеното анкетно проучване могат да бъдат направени следните изводи:

Образованието, професията, видът, както и населеното място на месторабота, оказват значимо влияние върху познанията на респондентите за ЧПИ и в частност за криптоспоридиозата.

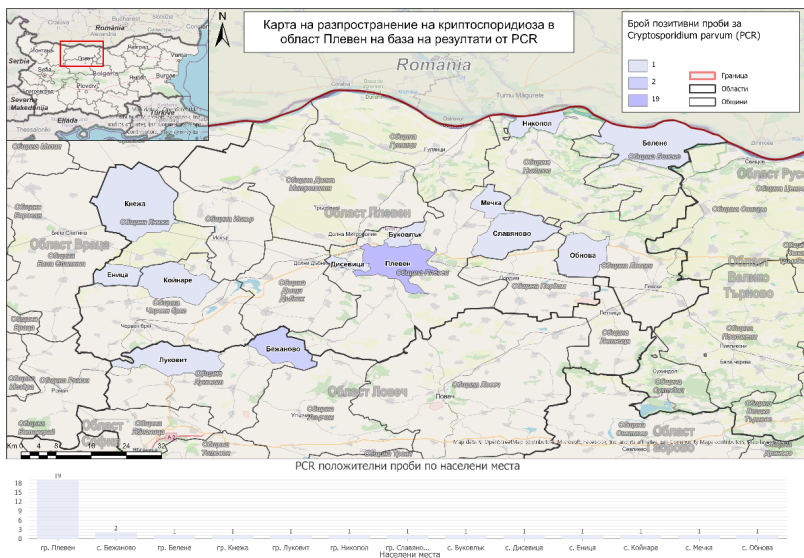
Очаквано, с най-добри познания относно симптоматиката и природата на причинителите на ЧПИ и криптоспоридиоза са работещите в болнични заведения, лицата с по-висока степен на образование и квалификация, както и тези, работещи в заведения в градски условия.

8. Картиране на разпространението на *Cryptosporidium* spp. инвазията сред хората и животните в Плевенска област по общини

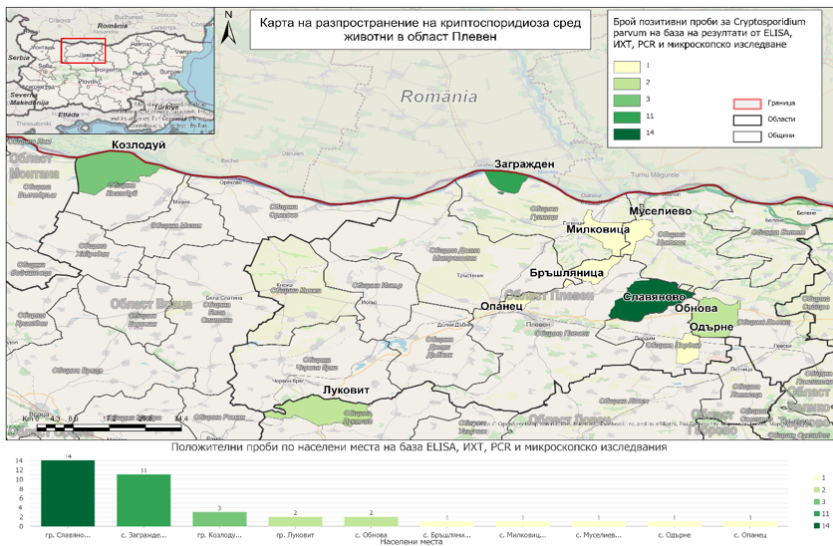
В резултат от цялостната работа по проучването върху *Cryptosporidium* spp. и криптоспоридиозата при хората и животните са изработени карти на разпространението на *Cryptosporidium* spp. инвазията сред хората и животните в Плевенска област и прилежащите райони. Картите на фигури 27, 28, 29 и 30



Фигура 29. Карта на разпространение на криптоспоридиоза сред хора в област Плевен на база на резултати от микроскопско изследване.



Фигура 30. Карта на разпространение на криптоспоридиоза сред хора в област Плевен на база на резултати от PCR.



Фигура 31. Карта на разпространение на криптоспоридиоза сред животни в област Плевен.

Картирането на ареалите на разпространение на криптоспоридиоза сред хора и животни в Плевенска област би било полезен инструмент при вземането на решения от страна на здравните власти с цел определяне на възможния риск от ЧПИ. Настоящото проучване би подпомогнало и избора на адекватни стратегии с цел опазване на общественото здраве в светлината на глобалната инициатива на СЗО „One health“.

V. Заключение

Понастоящем усилията за превенция на паразитните болести трябва да се съсредоточат върху подобряване на хигиената и санитарните условия, за да се ограничат ареалите на разпространение на *Cryptosporidium spp.* инвазията в популациите на хора и животни. Това касае особено развиващите се страни, където заболяването попада в групата на negliжираните зоонози. Активните миграционни процеси на големи популации от хора, съпътствани от животни, глобалните климатични промени, туристическите дестинации в ендемични за различни паразитни и инфекциозни заболявания региони, увеличават рисковете за поява на нови болести или възобновяване на вече овладяни епидемични процеси. Подобрената диагностика, разработването и въвеждането на диагностични и терапевтични иновации, както и осведомеността относно тяхното приложение допринасят за получаване на по-реалистична оценка на актуалното състояние на редица социално значими паразитни заболявания. Всичко това, в светлината на глобалната инициатива на СЗО “*One health*“ дава нов тласък в превенцията и профилактиката на редица инфекциозни и паразитни заболявания.

Тъй като криптоспоридиозата е зооноза, попадаща в топ 10 на инфекциите разпространявани по хранителната верига, както е и най-честия етиопатоген при епидемиите, възникнали по воден път, актуализирането на методите за епидемиологичен надзор е наложително в региони с компрометирани санитарно-хигиенни условия. Трябва да се акцентира върху проследяването на източника на патогенни микроорганизми като допълнителен инструмент, използващ молекулярно-биологични техники за прецизно идентифициране на абиотичните и биотични участници в епидемичната верига.

В България криптоспоридиозата е недостатъчно диагностицирано паразитно заболяване, с недобре позната от медицинските специалисти епидемиология, клиника, терапия. Малкият брой диагностицирани случаи отклонява вниманието и възможностите за финансиране не само на научни изследвания, но и за административно уреждане вноса на етиологични активни лекарствени препарати. Това се оказва особено значим проблем при постоянно увеличаващият се брой имunosупресирани пациенти по различни причини, вкл. и СПИН, в който контингент криптоспоридиозата е животозастрашаващо паразитно заболяване.

VI. Изводи

В изпълнение на задачите за реализиране на основната цел на дисертационния труд – проучване на биологията, разпространението, епидемиологията на криптоспоридиозата в един недостатъчно проучен регион като Плевенска област чрез съвременни диагностични методи са направени следните изводи:

1. На базата на изследваните 1133 фекални проби от хора за периода от 2016-2023 г. се установява екстензитет на *Cryptosporidium* spp.-инвазията от 7,6% сред определени групи от населението на гр. Плевен и Плевенска област.
2. Натрупаната база данни въз основа на основните демографски показатели възраст, пол, населено място и етническа принадлежност при хората са предпоставка за актуална оценка на честотата на опаразитяване с *Cryptosporidium* spp. в Плевенска област.
3. Въз основа на статистическия анализ се установи, че полът, етническата принадлежност и местоживеенето оказват слабо влияние върху разпространението на криптоспоридиозата при прилагане на трите основни диагностични метода. Многогодишните проучвания очертават слабо изразена тенденция в разпространението на криптоспоридиозата с преобладаване на лица с българска етническа принадлежност, градските жители. Честотата на опаразитяване сред лицата от женски и мъжки пол в Плевенска област е без установена разлика.
4. Коефициентите на Крамер показват, че възрастта на хората е в зависимост от честотата на опаразитяване с *Cryptosporidium* spp. Най-голям е относителният дял на децата, цистоотделители във възрастовия диапазон между 3 и 7 години.
5. За същия период са изследвани общо 96 проби от различни видове стопански животни (крави, телета, кози, агнета, козленца), от които 38,5% са инвазирани с патогена. Установено е, че видът и възрастта на животното са главни фактори, оказващи влияние върху честотата на опаразитяване с *Cryptosporidium* spp.
6. Високата степен на полиморфизъм в сегментите на използваните от нас два гена е подходящ маркер за видова идентификация на криптоспоридиите.
7. Приложените молекулярни методи показват, че *Cryptosporidium parvum* е основният причинител на криптоспоридиоза при хората и преживните животни в Плевенска област.

8. Използваните морфологични, имунологични и молекулярно-биологични методи за диагностика на *Cryptosporidium* spp. са основа за разкриването на скрита опаразитеност сред изследваните таргетни групи лица.
9. Установени са ареалите на разпространение на криптоспоридиозата през проучвания период въз основа на анализ, базиран на ГИС.
10. Чрез прилагане на анкетен метод е установено, че образованието, професията, месторабота в град/село, оказват влияние върху познанията на респондентите за ЧПИ и в частност за криптоспоридиозата. Очаквано, с най-добри познания относно симптоматиката при ЧПИ и криптоспоридиоза, както и природата на причинителите им са работещите в болнични лечебни заведения, лицата с по-висока степен на образование и квалификация, както и тези, с месторабота в градовете.
11. Със съставяне на здравнообразователни брошури и разпространяването им сред определени рискови групи и работещите в сферата на здравеопазването лица се ангажира вниманието им с полезна за здравето и професионалната им практика информация.

VII. Приноси

1. Приноси с оригинален характер

1.1 За първи път в Плевен и областта е проведено мащабно проучване през периода 2016-2023 г. за установяване честотата на опаразитяване с *Cryptosporidium* spp. сред определени групи хора и животни с приложение на рутинни и съвременни морфологични, имунологични и молекулярно-биологични методи.

1.2 За първи път се установява екстензитет на *Cryptosporidium* spp.-инвазията сред таргетните групи от населението на гр. Плевен и Плевенска област.

1.3 За първи път в България е извършено генотипиране на базата на RFLP анализ след проведен pPCR на изолати на *Cryptosporidium* spp. от фекални проби от хора и животни, които показват рестрикционни профили на *Cryptosporidium parvum*, идентични с тези на използвания референтен щам *Cryptosporidium parvum* Iowa II (генотип 2).

1.4 Адаптирани и приложени са три метода за изолиране на ДНК на *Cryptosporidium* spp. от фекални проби.

1.5 Разработен е алгоритъм за провеждане на биомолекулярни проучвания на изолатите на *Cryptosporidium* spp. от фекални проби на хора и животни от Плевенска област за първи път в България. Този алгоритъм може да послужи като модел и при изследвания на други патогени.

1.6 Установената скрита заболяемост от криптоспоридиоза в Плевенски регион при деца и възрастни има важно клинично-епидемиологично значение и е съществен принос за разширяване на познанията за тази паразитоза.

2. Приноси с приложен и потвърдителен характер

2.1 Изработени са карти с ареалите на разпространение на *Cryptosporidium parvum* в гр. Плевен и Плевенска област. Kartите могат да се използват в системата на здравеопазването.

2.2 Получените резултати и анализи допълват и обогатяват данните за разпространението на криптоспоридиозата в България.

2.3 В резултат на комплексното проучване е направена съвременна епидемиологична характеристика за седем годишен период, която е допълнение към съществуващата информация за вида в България.

2.4 Потвърждава се важното епидемиологично значение на *Cryptosporidium parvum* като причинител на стомашно-чревни инфекции при хора и при животни.

VIII. Публикации, участия в научни форуми и в научни проекти във връзка с дисертационния труд

1. Списък на научните публикации във връзка с дисертацията

1.1 Драгомирова П, Добрев Р, Боева-Бангъзова В. Клинична картина на криптоспоридиозата при хората. Детски и инфекциозни болести 2018; X (2): 52-56. ISSN: 1313-762X

1.2 Драгомирова П, Клисарова Д, Добрев Р, Драгомиров А, Неделчева Н. Разпространение на *Cryptosporidium* spp. сред таргетни групи в Плевенска област. Медицински преглед 2020; 56(6): 40-46. ISSN: 1312-2193

1.3 Драгомирова П, Енева Кр, Боева-Бангъзова В. Криптоспоридиоза - надзор, контрол и профилактика. Мединфо. 2018;8:50–52. ISSN: 1314-0345

2. Списък на участия в научни конференции във връзка с дисертацията

2.1 Dragomirova P, Petrova L, Klisarova D, Dragomirov A, Nedelcheva N, Atanasova M. A study of distribution frequency of *Cryptosporidium* among the human population and domestic animals in Pleven district. Folia Medica. 2017;59(1)19. /Abstracts/

2.2 Драгомирова П, Атанасова М. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. in animal population in Pleven region. XIII Национална конференция по медицинска биология. Варна. 2019.

2.3 Dragomirova P, Dobrev R, Boshnakova-Mihaylova J, Atanasova M. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. in human population in Pleven region. 45 years Medical University – Pleven”. Journal of Biomedical and Clinical Research. 2019;12(1):142 /Abstracts/

2.4 Dragomirova P. Detection of *Cryptosporidium* oocysts by rapid immunochromatographic test. Agriculture – way of life. Trakia University - Stara Zagora, Bulgaria. 2024

3. Списък на участието в проекти във връзка с дисертацията

3.1 Проект №11/2017, МУ-Плевен „Проучване честотата на разпространение на криптоспоридиоза сред населението и животните в Плевенска област”.

3.2 Проект №3/2019, МУ-Плевен „Видова идентификация на *Cryptosporidium* spp. чрез гнездови PCR и анализ на рестрикционните фрагменти”.

IX. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

