

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

**Charles University in Prague
Faculty of Science**



Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis

Uplatnění metod molekulární a buněčné biologie ve
výzkumu prvoků *Eimeria*

Application of molecular and cellular biology methods
in research of protozoa *Eimeria*

Mgr. Vladimír Vrba

Praha 2011

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Program: Vývojová a buněčná biologie

Předseda oborové rady: Doc. RNDr. Josef Nedvídek, CSc.

Školící pracoviště: BIOPHARM, Výzkumný ústav
biofarmacie a veterinárních léčiv
a.s., Pohoří – Chotouň, 254 49,
Jílové u Prahy

Autor: Mgr. Vladimír Vrba

Školitel: RNDr. Jiří Škvor, CSc.

Školitel konsultant: Ing. Martin Poplštejn

S disertací je možno se seznámit v příslušných
knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity
Karlovy v Praze.

Obsah / Table of contents

Seznam zkratek.....	4
Abbreviations list.....	4
Abstrakt.....	5
Abstract.....	6
Úvod.....	7
Introduction	10
Hypotézy a cíle práce	13
Aims of the work.....	14
Materiál a metodika.....	15
Material and methods.....	17
Výsledky.....	19
Results	22
Diskuse	25
Discussion	27
Závěry	29
Conclusions.....	30
Literatura / References.....	31
Publikace <i>in extenso</i> , které jsou podkladem disertace / Publications <i>in extenso</i> that form basis of this work.....	33
Životopis	34
Curriculum vitae.....	35

Seznam zkratek

- qPCR – kvantitativní real-time polymerázová řetězová reakce
rRNA – ribozomální RNA
rDNA – ribozomální DNA (kódující rRNA)
18S – označení malé ribozomální podjednotky eukaryot
ITS1 – internal transcribed spacer 1, úsek ribozomální DNA mezi
18S rRNA a 5.8S rRNA
COI – gen mitochondriální cytochrom *c* oxidázy, podjednotky I
RAPD – random amplified polymorphic DNA – polymorfní DNA
amplifikovaná náhodnými primery
SCAR – sequence-characterized amplified region – osekvenované
fragmenty z PCR charakterizující daný vzorek (např. z
RAPD)

Abbreviations list

- qPCR – quantitative real-time polymerase chain reaction
rRNA – ribosomal RNA
rDNA – ribosomal DNA (encoding rRNA)
18S – eukaryotic small ribosomal subunit
ITS1 – internal transcribed spacer 1, region of ribosomal DNA
between 18S rRNA and 5.8S rRNA
COI – mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I gene
RAPD - random amplified polymorphic DNA
SCAR - sequence-characterized amplified region

Abstrakt

Eimerie jsou jednobuněční prvoci z kmene Apicomplexa způsobující nemoc kokcidiózu, která je příčinou velkých ekonomických ztrát především v drůbežářském průmyslu. Cílem této práce bylo vyvinout nové molekulární metody a vyřešit některé problémy, což by bylo cenným příspěvkem v oboru, využitelným jak ve výzkumu tak i v praxi. Protože imunita proti eimeriím je druhově přísně specifická, je důležité znát jednotlivé druhy a dokázat je rozpoznávat. Tradiční diagnostické postupy spoléhají na klasické metody jako je určování morfologie oocyst pod mikroskopem, stanovování prepatentní periody nebo hodnocení lézí způsobených parazitem. Určování druhů těmito způsoby je však časově velice náročné a často nespolehlivé, hlavně v případech, kdy analyzujeme směs více druhů, jejichž parametry se překrývají. I když metody určování druhů využívající klasickou PCR již existují, tyto metody postrádají výhody nabízené real-time kvantitativní PCR (qPCR). Prvním cílem této práce bylo vyvinout qPCR metody pro detekci a kvantifikaci sedmi druhů kuřecích eimerií. Cílem byla vysoká specifita a maximální pokrytí všech různých kmenů každého druhu, proto byly jako cílové sekvence hledány jednokopiové nepolymorfnní oblasti. Užitečnost metody byla demonstrována analýzou vzorků z terénu. Dalším cílem práce bylo vyřešení postavení druhu kuřecí kokcidie *Eimeria mivati*, jehož platnost je často zpochybňována. Pomocí izolace čistých kmenů a následné analýzy sekvencí malé ribozomální podjednotky (18S) jsme dokázali, že v rámci jednoho genomu tohoto parazita existují dva typy 18S sekvence a že tyto typy odpovídají sekvencím *E. mitis* a *E. mivati*. Existence dvou typů 18S tak byla u eimerií pozorována poprvé a znamená, že druh *E. mivati* je stejný druh jako *E. mitis*. Toto zjištění má důležité dopady pro diagnostiku kuřecích eimerií, veterinární praxi a výrobu živých vakcín. Další oblastí práce byly kokcidie krůt, kde jsme objasnili otázku dvou kmenů druhu *E. adenoeides*, které se lišily morfologií oocyst do takové míry, že jeden kmen byl původně považován za jiný druh. Pomocí analýzy genu 18S a testů křížové imunity jsme dokázali, že oba tyto kmene představují jeden a ten samý druh.

Abstract

Eimeria is an apicomplexan parasite causing disease coccidiosis that is most prominent in poultry farming industry. This thesis is aimed to develop new molecular tools and resolve issues that would be a valuable contribution in the field from both research and industry perspective. Because immunity to *Eimeria* is strictly species-specific it is important to know and recognize correctly all species that parasitize the host. Traditional diagnostic approaches rely on classical methods like oocyst morphology determination under the microscope, measurement of prepatent period or in-vivo assessment of lesions caused by this parasite. However, diagnostics of individual species using these methods is very time-consuming and it is often unreliable, especially when mixture of multiple species whose parameters overlap is analyzed. Methods utilizing conventional PCR to distinguish species already exist, however, they lack advantages offered by quantitative real-time PCR (qPCR). The first aim of this thesis was to develop qPCR assays for detection and quantification of seven *Eimeria* species which infect chicken utilizing single-copy non-polymorphic targets in order to ensure maximal specificity and coverage of all strains of each species. Usefulness of this method was demonstrated by analysis of field samples. Another aim was to resolve status of *Eimeria mivati* that has been considered doubtful species. We have analyzed small ribosomal subunit (18S) sequences of single-oocyst derived strains of *E. mitis* and we have found that two types of 18S co-exist within single genome that correspond to sequences of *E. mitis* and *E. mivati*. It implies that *E. mitis* and *E. mivati* represent the same species. The phenomenon of two types of 18S within single genome was not observed in *Eimeria* until now and it has important implications for diagnostics and vaccine production. The last aim was related to turkey coccidia *E. adenoeides* where we encountered two strains that differed in oocyst morphology to the extent never described before. We have resolved their status by molecular phylogenetics using 18S gene and cross-immunity tests.

Úvod

Jednobuněční paraziti z rodu *Eimeria* se řadí mezi důležité veterinární patogeny. Způsobují hemoragické onemocnění kokcidiózu, která působí problémy především v drůbežářském průmyslu. Podobně jako ostatní organizmy z kmene *Apicomplexa*, i eimerie mají složitý životní cyklus začínající pozřením oocysts, pokračující masivní replikací uvnitř střevních buněk hostitele a končící tvorbou nových oocyst vylučovaných trusem. Vysoká intenzita současných chovů drůbeže napomáhá rozvoji této časté nemoci, proto musí být předcházena buď přidáváním antikokcidik do krmiva nebo podáváním živých vakcín (Shirley et al., 2005). Používání antikokcidik přidávaných do krmiva je dlouholetý tradiční způsob prevence kokcidiózy. Nicméně z důvodu zvyšujícího se výskytu rezistentních kmenů a kvůli tlaku na snižování reziduí léčiv v potravinách začínají být upřednostňovány živé vakcíny, zvláště u dlouho žijících zvířat. Živé vakcíny obsahují buď virulentní kmeny kokciidií nebo kmeny oslabené zkracováním prepatentní periody. Protože imunita proti eimeriím je druhově přísně specifická (Smith et al., 2002; Shirley et al., 2007), každý druh, proti kterému má vakcína chránit, musí být ve vakcíně zastoupen zvláště. V Evropské Unii jsou povoleny jenom oslabené vakcíny proti kokcidióze. Výroba živých oslabených vakcín je mimořádně náročná a vyžaduje důkladnou kontrolu, protože vakcinační linie se mohou fenotypicky rychle měnit a také může docházet ke kontaminaci jinými kmeny.

Tradiční metody určování jednotlivých druhů kokciidií zahrnují hodnocení morfologie oocyst, prepatentní periody, místa infekce nebo makroskopických lézí. Protože se tyto parametry často překrývají, bývá určování druhů těmito metodami často nespolehlivé a navíc může trvat i týdny. Proto byly vyvinuty PCR metody na rozlišení jednotlivých druhů (Schnitzler et al., 1999; Fernandez et al., 2003) a my jsme pokročili dále vyvinutím real-time kvantitativní PCR (qPCR), která nabízí mnoho výhod oproti klasické PCR. Použitím qPCR dokážeme nejenom spolehlivě detekovat a identifikovat jednotlivé druhy, ale také kvantifikovat relativní podíl

jednotlivých druhů ve směsi. V terénu se zpravidla setkáváme se smíšenými infekcemi a směsné vzorky jsou proto nejčastěji podrobovány laboratorní analýze a je tedy často velmi důležité znát alespoň to, který druh v daném vzorku převažuje. Nami vyvinutá metoda najde uplatnění i při laboratorní výzkumné práci a výrobě živých vakcín.

Je známo sedm druhů kokcií, které infikují kura domácího: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* a *E. tenella*. Kromě těchto druhů je popsán také druh *E. mivati*, jehož platnost je však v oboru často zpochybňována, přestože je tento druh obsažen v jedné virulentní vakcíně vyráběné v USA. V minulosti už byly publikované články naznačující, že tento druh je pravděpodobně totožný s druhem *E. mitis*, nicméně nebyly žádné molekulární důkazy, které by platnost tohoto druhu potvrdily nebo vyvrátily (Shirley et al., 1983). Proto jsme provedli analýzu sekvence malé ribozomální podjednotky (18S) u *E. mitis* a zjistili jsme, že tento druh obsahuje dva typy genu pro 18S v rámci jednoho genomu. Tyto dva typy genu odpovídají 18S sekvencím *E. mitis* a *E. mivati*, což vylučuje existenci *E. mivati* jako samostatného druhu. Je to zároveň první objev existence dvou forem 18S v rámci rodu *Eimeria*, i když podobný fenomén byl popsán u jiných zástupců kmene *Apicomplexa* (*Plasmodium*, *Babesia*). Je tedy pravděpodobné, že i jiné druhy eimerií mohou obsahovat dva typy 18S sekvence, proto je na místě opatrnost při využívání tohoto genu k hodnocení diverzity druhů a kmenů nebo při diagnostice založené na tomto genu.

Druhy eimerií, jejichž hostitelem je krůta, jsou daleko méně prozkoumané než kuřecí kokcidie. V literatuře je popsáno sedm druhů: *E. adenoides*, *E. dispersa*, *E. gallopavonis*, *E. innocua*, *E. meleagridis*, *E. meleagrimitis* a *E. subrotunda* (Chapman, 2008). Jejich diagnostika na základě kriterií, jako morfologie oocyst, prepatentní perioda nebo místo infekce je ještě daleko náročnější, protože literární zdroje se často rozcházejí v popisu jednotlivých druhů. Existence několika z těchto druhů je zpochybňována a ještě donedávna neexistovala PCR metoda na identifikaci alespoň některých z těchto druhů (Cook et al., 2010).

V současnosti neexistuje žádná atenuovaná vakcína proti kokcidióze krůt a proto jsou krůtí farmy závislé jen na používání antikokcidik. Naše výzkumná skupina vyvíjí takovou vakcínu a prvním krokem bylo právě vyřešení otázky, jaké druhy skutečně existují a jak je spolehlivě identifikovat. Jedním z úkolů, který je i součástí této práce, bylo vyřešit otázku postavení jednoho kmene, který podle morfologie oocyst odpovídal druhu *E. meleagriditis*, ale podle sekvence 18S měl blízko k *E. adenoides*. Rozdíl v morfologii byl natolik velký, že tento druh byl námi na začátku považován za *E. meleagriditis*, protože takové rozdíly v rámci druhu nebyli nikdy u eimerií popsány a mělo se za to, že morfologie oocyst je v rámci druhu fixovaný a poměrně spolehlivý parametr. Avšak data z analýzy genů pro 18S, ITS1 a cytochrom oxidázu a následné biologické testy křížové imunity ukázaly, že se jedná o dva různé kmeny jednoho druhu – *E. adenoides*. Test křížové imunity je totiž v kokcidiologii považován za dobrý nástroj vymezující jednotlivé druhy.

Introduction

The protozoan parasites from the genus *Eimeria* are important veterinary pathogens. They cause the hemorrhagic disease coccidiosis, most notable in poultry farming industry. Like other organisms from the phylum *Apicomplexa*, *Eimeria* has a complex life cycle starting with ingestion of tough oocysts, massive replication within intestinal cells and ending with excretion of newly created oocysts in faeces. The high stocking density in current poultry breeding facilities is favourable for this disease, therefore it has to be prevented either by using in-feed anticoccidials or by applying live vaccines (Shirley et al., 2005). In-feed anticoccidials represent traditional approach for disease prevention, however, due to increasing resistance of field strains and concerns about drug residuals, live vaccine are being more preferred, especially in long-lived animals. Live vaccines can be composed of parasites that are either virulent (wild) or attenuated by shortening prepatent period. Because the immunity to *Eimeria* is strictly species-specific (Smith et al., 2002; Shirley et al., 2007), each species which is being targeted has to be included in vaccine. Only attenuated coccidiosis vaccines are permitted in European Union. Production of attenuated live vaccines is complicated and needs careful control over live organisms that might phenotypically change or contaminate during several round of replication.

Traditionally, coccidian species were distinguished by oocyst morphology, prepatent period, site of infection or macroscopic lesions, however, because these parameters might overlap, these methods are often unreliable and are very time-consuming. Therefore PCR methods to distinguish individual species were developed (Schnitzler et al., 1999; Fernandez et al., 2003) and we have further advanced this approach by development of real-time quantitative PCR (qPCR) that offers many advantages over classical PCR. By utilizing qPCR we can not only reliably detect and identify species but also quantify its relative content in mixture of species which is particularly important during formulation of live vaccines or during field diagnostics to determine relative abundance of each species.

Seven species of *Eimeria* that infect the chicken are recognized, namely: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. tenella* and *E. praecox*. There is also a species called *E. mivati* that was described in the past but its validity is questioned by many researches in the field, although it is already included in one live virulent vaccine produced in USA. There were reports from the past that it might be the same species as *E. mitis* but there was no molecular analysis that would support or oppose its validity (Shirley et al., 1983). We have carried out analysis of small ribosomal subunit (18S) sequences in *E. mitis* and we have found that it contains two types of 18S gene that correspond to *E. mitis* and *E. mivati* which then invalidates *E. mivati* species. It was also the first report of the two types of 18S within single genome in *Eimeria*. This phenomenon was known in some other apicomplexan species (*Plasmodium*, *Babesia*) but not in *Eimeria*. It is expected that some other eimerian species might contain two types of 18S and it therefore means that care should be taken when assessing diversity according to 18S or when using this gene for species or strain diagnostics.

Species of *Eimeria* that infect the turkey are much less studied than chicken *Eimeria* and there is seven species described in literature, namely: *E. adenoides*, *E. dispersa*, *E. gallopavonis*, *E. innocua*, *E. meleagridis*, *E. meleagrimitis* and *E. subrotunda* (Chapman, 2008). Their diagnostics according the classical criterions like oocyst morphology, prepatent period or site of infection is much more harder because literature is often inconsistent in their description. Existence of some of these species is also doubtful and only until recently (Cook et al., 2010) there were no PCR tools to identify at least some of these species.

Currently, no attenuated vaccine against turkey coccidia exists, so the turkey farms rely solely on using in-feed anticoccidials. Our research group have been developing live vaccine against turkey coccidia, however, first step was to resolve issues arising from identification of individual species and recognition what species really exist using molecular tools that are being newly developed. The one particular aim that is part of this thesis was to resolve issue of two unexpectedly

different strains of *E. adenooides*. These two strains differed by oocyst morphology to the extent never observed before so the smaller species was at the beginning of our work considered to be another species (*E. meleagrimitis*). The data from 18S gene sequencing, however, suggested that it might be close relative of *E. adenooides* because of high sequence similarity. This was further confirmed by cross-immunity tests that are considered as a good species delimitating tool in coccidiology.

Hypotézy a cíle práce

Cílem této práce bylo vyvinout nové nástroje a přinést řešení otázek, které budou cenným příspěvkem v oblasti kokcidiózy jak z hlediska vědeckého tak i praktického.

Prvním cílem bylo vyvinout qPCR metody stanovení pro sedm druhů kuřecích kokcií, které budou pokrývat maximum kmenů každého druhu. Tyto metody mohou být použity jednak ve výzkumu k zdokonalení a zrychlení analýz vzorků a jednak ve veterinární praxi pro diagnostiku vzorků z terénu.

Druhým cílem bylo pomocí molekulárních metod rozřešit otázku platnosti zpochybňovaného druhu *E. mivati*. Byl by to důležitý a zároveň přesvědčivý příspěvek do dlouhotrvající diskuze o platnosti tohoto druhu. Zároveň je to důležitá otázka pro oblast kuřecích kokcií, protože je nutné znát skutečně existující druhy abychom mohli dělat správné rozhodnutí při výrobě živých vakcín a diagnostice kokcií z terénu.

Třetím cílem práce bylo vyřešit postavení námi izolovaného kmene krůtí kokcidie, jehož morfologie oocyst a sekvence 18S naznačovaly protichůdné závěry. Sekvence 18S ukazovala na blízkost k *E. adenoides*, morfologie oocyst zase blízkost k *E. meleagridis*. Avšak takováto variabilita morfologie oocyst v rámci druhu by byla prolomením paradigmatu v kokcidiologii. Rozřešení této otázky přispěje také k celkovému vyjasnění taxonomie krůtích kokcií, o což se snažíme v našem dalším výzkumu.

Aims of the work

The aims of the work were to develop a new tools and to resolve issues that would be a valuable contributions in the field of coccidiosis from both industry and research perspectives.

The first aim was to develop a qPCR assays for all seven chicken *Eimeria* species. These assays can be used by researchers to advance their research efforts in coccidiosis as well as companies focusing on diagnostics of field samples.

The second aim was to resolve issue with *E. mivati* using molecular tools. That would be a valuable and persuading contribution to a longstanding debate about this species in the field of chicken coccidiosis as it is important to know what species really exist in order to do correct decisions in vaccine production and field diagnostics.

The third aim was to resolve unknown status of the two different strains of turkey coccidia *E. adenoeides*, where we encountered variations that were never described before. Consequently, this has an important implications for diagnostics of turkey coccidia and it is a contribution to the whole image of turkey coccidia taxonomy that we trying to complete in our further research in this field.

Materiál a metodika

Pro vývoj diagnostických qPCR metod, které budou kompatibilní s maximálním počtem různých kmenů každého druhu, jsme využili SCAR (sequence-characterized amplified region) markery, které byly testovány na několika kmenech každého druhu. Softwarově jsme v těchto sekvencích navrhli několik kandidátských qPCR markerů pro každý druh. Pro práci jsme využili všechny nám dostupné kmeny kokcií z každého druhu a kandidátské markery jsme z jejich DNA amplifikovali, zaklonovali a sekvenovali pro posouzení polymorfizmu v rámci druhu. Do konečné sady sedmi markerů byly vybrány jenom nepolymorfnní fragmenty a ty byly dále testovány na vhodnost pro qPCR (PCR efektivita, specifita, senzitivita). Požadavkem byla absolutní specifita (žádná cross-reaktivita s cizí DNA) a vysoká senzitivita. Finální qPCR stanovení byla kalibrována pomocí standardních křivek vytvořených s použitím markerů zaklonovaných v plazmidu a pomocí genomové DNA získané ze známého počtu oocyst. Takto kalibrované stanovení bylo možné použít na relativní kvantifikaci jednotlivých druhů ve směsi. Výsledky takto získané byly ověřeny také pomocí tradiční metody počítání oocyst jednotlivých druhů pod mikroskopem. Vyvinutá qPCR metoda byla poté aplikována na analýzu vzorků podestýlky a trusu pocházejících z farem z různých zemí světa.

Pro vyřešení otázky platnosti druhu *E. mivati* jsme nejprve získali druh *E. mitis* a provedli pět monosporických izolací, které spočívají ve vybrání jedné oocysty pomocí mikromanipulátoru a následné infekci kuřete touto oocystou. Takto jsme zabezpečili, že budeme pracovat s čistou linií a ne se směsí druhů. Následně jsme amplifikovali, zaklonovali a osekvenovali gen pro 18S u každé takto izolované linie *E. mitis*. Kromě 18S jsme také sekvenovali gen pro mitochondriální cytochrom oxidázu (COI). Sekvence, které jsme našli u *E. mitis* jsme porovnali se známými sekvencemi a rekonstruovali jsme fylogenetické vztahy v kontextu ostatních sekvencí kuřecích eimerií. Také jsme provedli predikce sekundární struktury dvou forem ribozomální RNA nalezených u *E. mitis* a určili jsme strukturální rozdíly mezi těmito dvěma typy sekvencí 18S.

Na začátku vývoje živé atenuované vakcíny proti kokcidióze krůt jsme získali různé terénní izoláty z krůtích farem z Česka, Polska a Německa. Každý vzorek jsme charakterizovali biologicky a také pomocí sekvenování malé ribozomální podjednotky. Kromě kmene *E. adenoides*, který odpovídal literárnímu popisu jsme našli i kmen, který jsme považovali za *E. meleagromitidis*, ale jeho 18S sekvence měla velice blízko k *E. adenoides*. U obou kmenů jsme provedli monosporickou izolaci, aby jsme získali linie odvozené z jediné oocysty. Tyto linie jsme podrobili PCR amplifikaci, klonování a sekvenování genů pro 18S, ITS1 a COI. Rovněž jsme 100 oocyst z každé linie proměřili pomocí mikroskopu a takto získali histogramy šířky a délky. Protože blízkost 18S sekvencí naznačovala, že by se mohlo jednat o jeden druh, provedli jsme křížové imunizační pokusy, při nichž byly krůty imunizovány jedním druhem a zatíženy druhým a vyhodnotili jsme pokles vylučování oocyst proti neimunizované kontrole. Provedli jsme také analýzu 18S sekvencí vyskytujících se ve dvou komerčních vakcínách a tyto porovnali s našimi sekvencemi.

Material and methods

For the development of qPCR assay that would cover maximum number of existing strains of each species we have chosen to utilize RAPD-derived sequence-characterized amplified regions (SCARs) which were validated using multiple strains. We designed multiple candidate qPCR markers using dedicated software with regards to suitability for qPCR. Furthermore, we have obtained multiple strains of each species and then amplified, cloned and sequenced each candidate marker from each strain in order to assess polymorphism. Only non-polymorphic (identical in each strain of respective species) markers were selected and then tested for their performance in qPCR assay. Absolute specificity (no cross-reactivity with other species or host DNA) and high sensitivity were the requirements. The qPCR assays were calibrated and standard curves were prepared using plasmid-encoded targets as well as using genomic DNA from known number of oocysts. Assays calibrated this way could be used for calculation of relative abundance of each species in complex mixture. Results obtained this way were compared to traditional method of counting oocysts under the microscope. This method was then used for analysis of field samples of litter from farms from around the world.

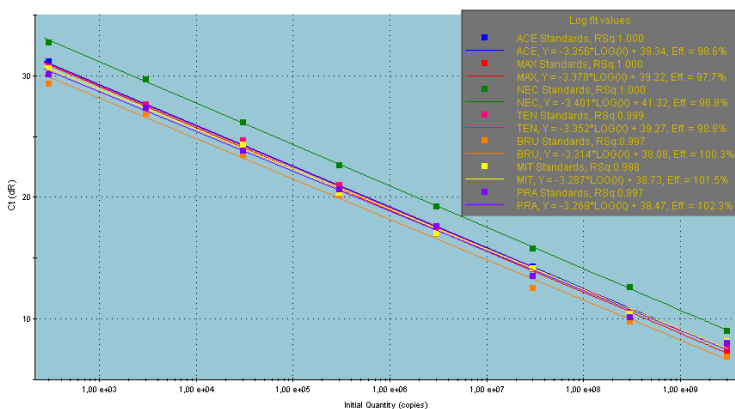
To resolve the issue with *E. mivati* we have obtained species *E. mitis* and carried out five single-oocyst isolations in order to ensure that we are working with pure lines. Then we PCR-amplified, cloned and sequenced multiple clones of small ribosomal subunit (18S) gene from each *E. mitis* line and sequenced them. Along with 18S we amplified, cloned and sequenced cytochrome oxidase (COI) gene. We have compared sequences found within *E. mitis* genome and we have reconstructed phylogenetic relationships within the context of other chicken *Eimeria* species. We also performed secondary structure predictions of 18S ribosomal RNA variants and we determined the differences between the two types of 18S rRNA found within *E. mitis* genome.

At the beginning of our efforts to develop live attenuated vaccine against turkey coccidiosis we have obtained multiple

strains and species of turkey coccidia from farms of Czech Republic, Poland and Germany. We have analyzed each sample by 18S sequencing and except *E. adenoeides* we have found a coccidia that resembled *E. meleagrimitis* but its 18S sequence was very similar to the sequence of *E. adenoeides*. In order to determine whether this species is *E. adenoeides* or some other species we carried out single-oocyst isolations to purify each strain. Then we PCR-amplified, cloned and sequenced 18S, COI and ITS1 sequences from each strain. We also measured oocysts of each strain under the microscope using 100 oocyst from each sample. Because high relatedness of 18S sequences suggested that the unknown species might be *E. adenoeides* we performed cross-immunity tests. In these tests, turkeys were immunized with one strain and later challenged with other strain and cross-protection was measured by counting of oocysts produced after challenge. We also analyzed 18S sequences from two commercial virulent vaccines and we compared 18S sequences found within these vaccines to our sequences.

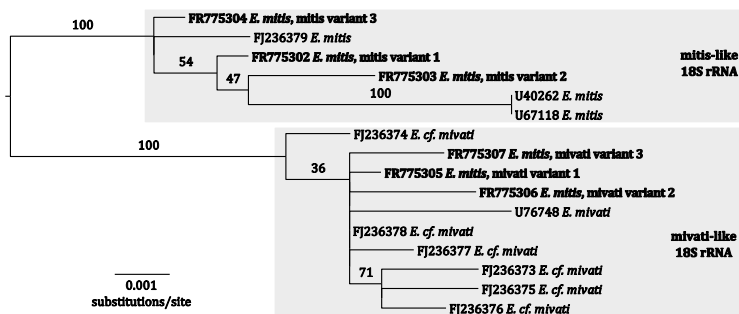
Výsledky

Real-time kvantitativní PCR metody stanovení pro sedm druhů kuřecích kokcií, které se nám podařilo vyvinout, splnily naše požadavky na specifitu a senzitivitu. Dosáhli jsme úplné specifity a zároveň citlivosti dostatečné pro detekci jediné sporulované oocysty (obsahující 8 kopií genomu). Standardní křivky ukázali široké rozmezí linearity, tj. spolehlivost a reprodukovatelnost kvantifikace v širokém rozmezí koncentrace výchozího templátu (Obr. 1). Jednotlivá qPCR stanovení nebyla ovlivněna přítomností cizorodé DNA (hostitel, bakterie, kvasinky, rostliny), což je důležité hlavně u terénních vzorků, kde cizorodá DNA tvoří absolutní většinu DNA izolované ze vzorku. Pro každý druh bylo testováno několik kandidátských markerů a do konečné sestavy byly vybrány jenom ty, u kterých jsme sekvenováním prokázali absenci polymorfizmu, tj. sekvence markerů z různých kmenů daného druhu byly identické. Metoda byla poté aplikována na terénní vzorky z farem, kde jsme zjistili různou diverzitu kokcií, a to i na farmách používajících antikokcidika. Výsledky relativního zastoupení druhů ve vzorcích z farem se také podařilo ověřit pomocí klasického počítání oocyst jednotlivých druhů pod mikroskopem.



Obrázek 1. Standardní křivky stanovení sedmi druhů vytvořené s pomocí markerů zaklonovaných v plazmidu.

Analýza čistých linií *E. mitis* pomocí sekvenování 18S ukázala, že existují dva typy genu 18S v rámci jednoho genomu. Zatímco první typ sekvence odpovídal *E. mitis*, druhý odpovídal druhu *E. mivati*. Ve fylogenetické analýze zahrnující všechny známe sekvence 18S z těchto druhů se tyto dva typy sekvence segregovaly do skupin odpovídajících druhům (Obr. 2). Sekvenování genu mitochondriální cytochrom oxidázy ukázalo vysokou příbuznost s už známou sekvencí *E. mivati* a ve fylogenetické analýze tyto dvě COI sekvence utvořily jednu vývojovou větev, což je v souladu s hypotézou, že se jedná o sekvence z jednoho druhu.

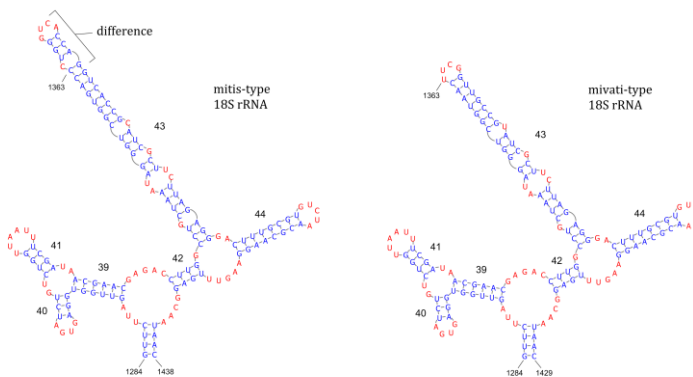


Obrázek 2. Fylogenetický strom vytvořený pomocí metody maximum likelihood z všech 18S sekvencí *E. mitis* a *E. mivati*. Naše sekvence jsou tučně.

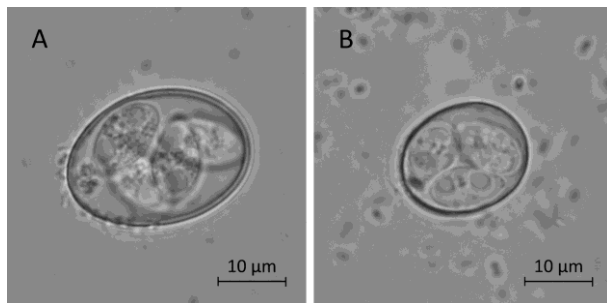
Kromě toho naše predikce sekundární struktury těchto dvou typů ribozomální RNA ukázaly, že rozdíly v sekvenci mají významný dopad na sekundární strukturu a že tyto dva typy 18S se liší v délce helixu 43 (Obr. 3).

Při řešení projektu zaměřeného na krůtí kokcidie jsme objevili dva kmeny kokcidie *E. adenoides*, které se liší v morfologii oocyst do takové míry, jaká nebyla nikdy pozorována ani popsána v literatuře (Obr. 4). Tyto kmeny kokcidií byly monosporicky izolovány a biologicky charakterizovány, přičemž byla určena jejich morfologie oocyst, prepatentní perioda a patogenita. Sekvence 18S těchto dvou kmenů byly vysoce homologní, sekvence ITS1 poměrně odlišné a sekvence COI mírně odlišné na úrovni DNA, ale identické na úrovni aminokyselinové sekvence proteinu. Křížové imunizační testy

ukázaly vysoký pokles vylučování oocyst po heterologní zátěži a ukazují tedy, že oba kmeny představují jeden druh. Kromě toho jsme ukázali, že obě komerční vakcíny obsahují odlišné kmeny *E. adenoeides* a že sekvence kmenů *E. adenoeides* z těchto vakcín odpovídají našim sekvencím.



Obrázek 3. Predikovaná sekundární struktura regionu V7 u dvou typů 18S rRNA sekvence nalezených v genomu *E. mitis*.



Obrázek 4. Sporulované oocysty *E. adenoeides* KR (A) a *E. adenoeides* KCH (B).

Results

We have developed real-time quantitative PCR assays for detection and quantification of seven chicken *Eimeria* species that met our requirements for specificity and sensitivity. We have obtained absolute specificity and the sensitivity sufficient to detect single sporulated oocyst (which contains 8 genome copies). The standard curves demonstrated reproducible quantification across a wide linear range (Fig. 1). Assays were not affected by presence of non-target (host, bacterial, yeast, plant) DNA that is predominant type of DNA occurring in field samples. Multiple candidate markers were tested for each species. Each marker that was selected for inclusion into final set was confirmed to be non-polymorphic (identical) among all available strains of respective species. Method was then applied to field samples from farms and results were verified by classical microscopic diagnostics.

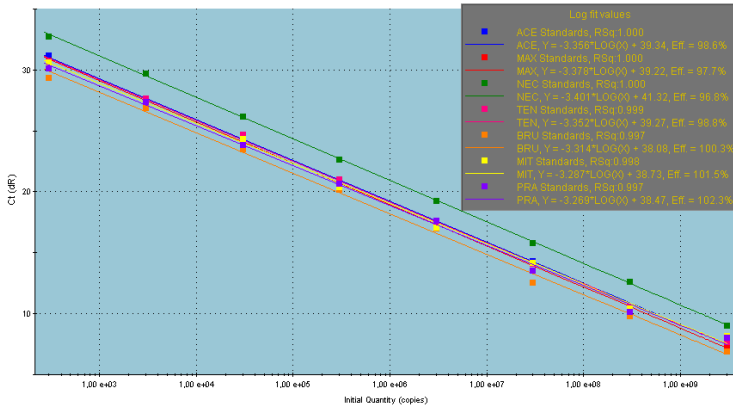


Figure 1. Standard curves of seven species assays constructed using plasmid encoded targets.

Analysis of pure lines of *E. mitis* by sequencing 18S gene revealed that two different types of 18S co-exist in genome. While the first type correspond to the sequence of *E. mitis*, the second type correspond to the sequence of *E. mivati*. In phylogenetic analysis, these two types of 18S gene clustered into

separate groups (Fig. 2). Sequencing of COI gene showed high relatedness to already determined COI sequence of *E. mivati* and phylogeny reconstruction showed that these COI sequences belong to the single lineage which is in agreement with hypothesis that these two sequences come from single species.

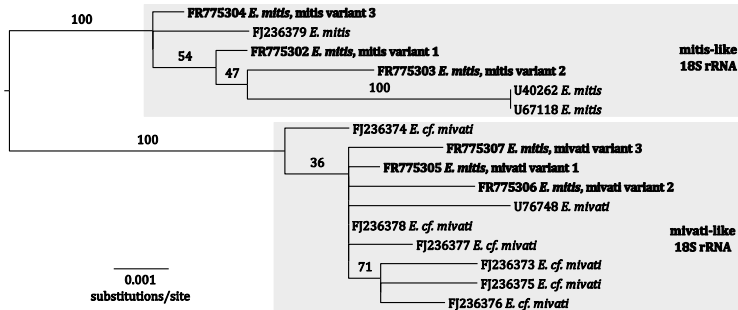


Figure 2. Maximum likelihood phylogenetic tree constructed from all 18S sequences of *E. mitis* and *E. mivati*. Our sequences highlighted bold.

Moreover, our predictions of secondary structures of these two types of ribosomal RNA showed that the differences in sequence have significant impact on structure (Fig. 3).

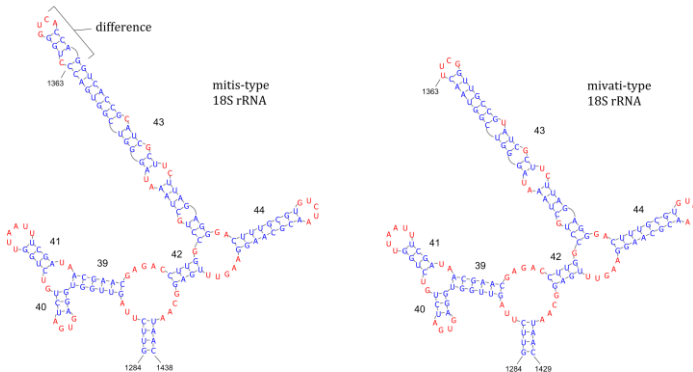


Figure 3. Predicted secondary structures of V7 region of the two types 18S rRNA sequence found within *E. mitis* genome.

In turkey coccidia project we have found two strains of *E. adenoeides* that differ in oocyst morphology to the extent never described before (Fig. 4). Strains of turkeys coccidia derived by single-oocyst isolation were biologically characterized and we have determined oocyst morphology, pathogenicity and prepatent period for each strain. The sequences of 18S were found to be very similar in both strains, sequences of ITS1 were different and COI sequences were slightly different at the DNA level and identical at protein level. Cross-immunity tests showed high decrease of oocyst output after heterologous challenge and confirmed that these two strains represent the same species. Moreover, we have showed that the two commercial turkey coccidiosis vaccines contain two different strains of *E. adenoeides* that correspond to our strains of *E. adenoeides*. 18S sequences from these vaccines were homologous to the sequences from our strains of *E. adenoeides*.

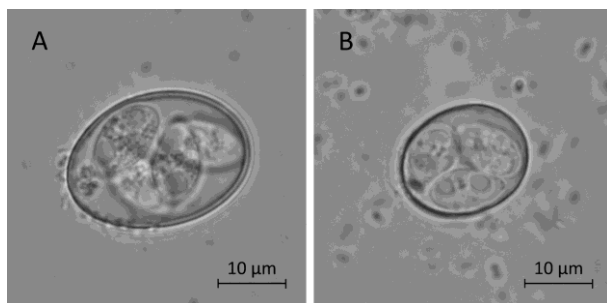


Figure 4. Sporulated oocysts of *E. adenoeides* KR (A) and *E. adenoeides* KCH (B).

Diskuse

Vyvinuté qPCR metody pro detekci a kvantifikaci sedmi druhů kuřecích eimerií jsou cenným nástrojem jak pro výzkum, tak pro veterinární praxi. Naším cílem bylo vyvinout metody použitelné pro co nejvíce kmenů každého druhu tak, aby měly globální platnost a minimalizovali riziko falešné negativy nebo pozitivy. Za tímto účelem jsme hledali jednokopiové nepolymorfnní qPCR markery u každého druhu. I když qPCR stanovení založené na vícekopiových cílových sekvencích, jako je ITS1 nebo ITS2 (Morgan et al., 2009) mají vyšší senzitivitu díky zvýšenému počtu cílových míst v genomu, tyto metody mají problém se specifitou (falešná negativita nebo falešná pozitivita) a mají také nízkou přesnost, protože počet kopií ribozomálních genů se u jednotlivých druhů liší a není znám. Námi vyvinuté qPCR metody stanovení jsou rychlé, spolehlivé a přesné. Můžou být využity například při výrobě živých vakcín, analýze směsných infekcí a vzorků ve výzkumu nebo ve veterinární praxi na diagnostiku klinické nebo subklinické kokcidiózy. Typ vzorku není omezen jenom na oocysty, ale jakýkoli vzorek obsahující nějaká vývojová stadia eimerií může být podroben izolaci DNA a qPCR analýze. Příkladem mohou být vzorky infikovaných tkání z různých míst trávicího traktu, kde můžeme pomocí qPCR zjistit lokalizaci jednotlivých druhů a to i při směsné infekci. Užitečnost těchto metod jsme demonstrovali také analýzou relativního zastoupení jednotlivých druhů ve vzorcích z farem z různých zemí. Ve více případech jsme zaznamenali přítomnost kokciidií i na farmách používajících antikokcidika, což značí výskyt rezistentních kmenů, nejčastěji *E. acervulina*.

Pro objasnění postavení druhu *E. mivati* jsme využili gen pro malou ribozomální podjednotku (18S), který je u eukaryot často používán pro rekonstrukci fylogenetických vztahů a pro populačně-genetické studie. Zjistili jsme, že v rámci jednoho genomu druhu *E. mitis* existují dva typy sekvence tohoto genu, což až doposud nebylo nikdy pozorováno u rodu *Eimeria*, i když veřejné databáze již obsahují stovky sekvencí 18S z eimerií. Ribozomální geny se normálně vyvíjejí podle všeobecně uznávaného modelu spřažené evoluce (concerted evolution), kde

jsou jednotlivé kopie neustále homogenizovány a je tak udržována jejich sekvence stejná u všech kopií genu, avšak my jsme narazili na výjimku z tohoto modelu, která byla také pozorována u některých dalších zástupců kmene *Apicomplexa* (Rooney, 2004; Nei and Rooney, 2005). Výsledkem našeho zjištění je vyvrácení platnosti *E. mivati* jako samostatného druhu, tj. jedná se stále o tentýž druh – *E. mitis*. Další důsledky vyplývají pro molekulární metody využívající tento gen pro diagnostiku nebo populační genetiku, kde je třeba počítat s možností, že i jiné druhy eimerií můžou mít takovýto intragenomový polymorfismus. Při přehlednutí tohoto fenoménu může lehce dojít k přecenění diverzity kmenů nebo druhů. Predikce sekundární struktury těchto dvou typů RNA nám ukázala, že rozdíly v sekvenci nejsou jenom náhodné jednonukleotidové polymorfizmy, ale mají významnější dopad na strukturu malé ribozomální podjednotky. Tyto dva typy 18S rRNA mohou pravděpodobně hrát různou roli v různých stádiích vývojového cyklu parazita, jak bylo pozorováno u jiných apikomplex (McCutchan et al., 1988; Qari et al., 1994; Le Blancq et al., 1997).

Výzkum krutích kokcií vykonávaný jako součást projektu na vývoj živé oslabené vakcíny přinesl mnoho otázek v oblasti určení a rozpoznání jednotlivých druhů a kmenů krutích eimerií. S pomocí sekvenování 18S jsme našli dva kmeny druhu *E. adenoeides*, které se lišily v morfologii oocyst do takové míry, že jeden kmen byl nejprve námi považován za jiný druh. Až blízkost sekvencí 18S a následná důkladnější analýza ITS1, COI a biologické křížové imunizační testy ukázaly, že se jedná o jeden druh. Takováto vnitrodruhová variabilita morfologie oocyst nebyla u kokcií nikdy pozorována a pro oblast krutích kokcií to znamená, že diagnostika druhů na základě tohoto kritéria nemůže být spolehlivá a tudíž by měla být využívána s opatrností a pokud možno společně se znalostí dalších biologických vlastností nebo výsledky získanými molekulárně-biologickými metodami. Až doposud se totiž mělo za to, že morfologie oocysty je v rámci druhu poměrně stálá. Naše skupina v současnosti vyvíjí metody qPCR, které by, podobně jako u kuřecích kokcií, umožnili rychlou a spolehlivou identifikaci jednotlivých druhů.

Discussion

The assays developed for identification and quantification of seven chicken *Eimeria* species provide valuable tool for both industry and research use. We aimed to develop assays with global validity by using as many strains of each species as possible and by seeking for single-copy non-polymorphic sequence targets. Although assays based on multi-copy ITS1 or ITS2 sequences (Morgan et al., 2009) have higher sensitivity than our assays based on single-copy targets, these assays suffer from impaired specificity (false negativity, false positivity) and low precision of quantification. The developed qPCR assays are both fast and reliable and can be applied to in coccidiosis research, live vaccine manufacture or veterinary practice. We have demonstrated utility of these assays by analyzing field samples from different farms. In multiple cases, coccidia were detected while the farms were using in-feed anticoccidials, which means that the resistant strains were present.

In order to resolve status of doubtful coccidian species *E. mivati*, that was not included in our qPCR assays, we have employed gene for small ribosomal subunit (18S) which is well known marker for inferring phylogenetic relations and distinguishing species. We have found, for the first time in *Eimeria*, that two types of 18S gene co-exist within single genome. Although ribosomal DNA is thought to develop according to the model of concerted evolution where the gene copies are continuously homogenized, we have encountered exception from this model that was observed also in some other apicomplexan parasites (Rooney, 2004; Nei and Rooney, 2005). As a result, this finding invalidates existence of *E. mivati* as an independent species and it has important consequences for molecular methods utilizing this gene either for diagnostics or for population genetic studies. Furthermore, we have showed that the differences in DNA sequence have significant impact on RNA secondary structure and that the two types of this rRNA might be used in different stages of life cycles as it was observed in other apicomplexan species (McCutchan et al., 1988; Qari et al., 1994; Le Blancq et al., 1997).

The turkey coccidia research performed as a part of project aimed to develop live attenuated turkey coccidiosis vaccine introduced new challenges in distinguishing between species and strains of this group of *Eimeria*. According to the 18S sequencing we have identified two strains of *E. adenoides* that were very similar in 18S sequence but differed in oocyst morphology to the extent that the smaller strain was considered to be another species. Using further analysis of ITS1, COI and biological cross-immunization experiments we have showed that these two strains represent single species. Such an variability in oocyst size within species was never observed in coccidia and it means that the traditional methods of distinguishing species have to be done with caution or abolished entirely in case of turkey coccidia. We are currently developing similar qPCR assays as in chicken coccidia in order to come up with reliable method of identification of these species.

Závěry

V této práci bylo dosaženo následujících výsledků:

1. Byly vyvinuty real-time kvantitativní PCR metody stanovení pro sedm druhů kuřecích eimerií využívající jednokopiové nepolymorfní cílové sekvence. Tyto metody najdou využití jak ve výzkumu, tak v zemědělské a veterinární praxi jako rychlý nástroj pro spolehlivou detekci a kvantifikaci jednotlivých druhů.
2. Pomocí molekulární analýzy genu 18S byla vyřešena otázka nejasného taxonomického postavení druhu *E. mivati*. Tento druh byl zpochybňován více než 30 let, ale až teď byly přineseny molekulární důkazy objasňující situaci. Bylo potvrzeno, že tento druh je totožný s *E. mitis* a název *E. mivati* lze považovat za synonymum. Poprvé u eimerií byla objevena přítomnost dvou forem 18S v rámci jednoho genomu. Mimoto bylo demonstrováno, že rozdíly v sekvenci mají významný dopad na sekundární strukturu těchto ribozomálních RNA a tyto dva typy 18S tak mohou hrát rozličnou roli během životního cyklu parazita.
3. Byla vyřešena otázka dvou kmenů druhu *E. adenoeides*, které se liší morfologií oocyst v míře doposud u eimerií nikdy nepozorované. Kmen s menšími oocystami byl nejprve námi považován za druh *E. meleagriditis*, ale molekulární rozbor a křížové imunizační testy ukázaly, že se jedná o dva kmene jednoho druhu.

Conclusions

In the present work we have obtained the following results:

1. We have developed quantitative real-time PCR assays for all seven chicken *Eimeria* species using single-copy non-polymorphic targets. These assays can be used both in research as well as in industry for specific pathogen detection and precise quantification of mixed infections.
2. We have resolved the doubtful taxonomical status of *E. mivati* using molecular analysis of 18S rRNA. This species has been questioned for more than 30 years and we have brought the molecular evidence that clarifies its status. We confirmed that it is the same species as *E. mitis* and we have discovered for the first time in *Eimeria* that two types of 18S co-exist within genome. Moreover, we showed that these two rRNA types differ significantly in secondary structure and might play different roles in parasite life cycle.
3. We have resolved the status of the two strains of *E. adenoeides* that differ in oocyst morphology to the extent never observed before in coccidiosis. The smaller strain resembled species *E. meleagridis* but molecular evidence and further cross-immunity tests showed that these are the two strains of the same species.

Literatura / References

- Le Blancq, S. M., Khramtsov, N. V., Zamani, F., Upton, S. J. and Wu, T. W.** (1997). Ribosomal RNA gene organization in *Cryptosporidium parvum*. *Molecular and biochemical parasitology*, **90**, 463-78.
- Chapman, H. D.** (2008). Coccidiosis in the turkey. *Avian pathology*, **37**, 205-23.
- Cook, S. M., Higuchi, D., McGowan, A., Schrader, J., Withanage, G. S. and Francis, M.** (2010). Polymerase Chain Reaction-Based Identity Assay for Pathogenic Turkey *Eimeria*. *Avian Diseases*, **54**, 1152-1156.
- Fernandez, S., Pagotto, A. H., Furtado, M. M., Katsuyama, A. M., Madeira, A. M. B. N. and Gruber, A.** (2003). A multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of the seven *Eimeria* species that infect domestic fowl. *Parasitology*, **127**, 317-25.
- McCutchan, T. F., de la Cruz, V. F., Lal, A. A., Gunderson, J. H., Elwood, H. J. and Sogin, M. L.** (1988). Primary sequences of two small subunit ribosomal RNA genes from *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*, **28**, 63-8.
- Morgan, J. A. T., Morris, G. M., Wlodek, B. M., Byrnes, R., Jenner, M., Constantinoiu, C. C. anderson, G. R., Lew-Tabor, A. E., Molloy, J. B., Gasser, R. B. and Jorgensen, W. K.** (2009). Real-time polymerase chain reaction (PCR) assays for the specific detection and quantification of seven *Eimeria* species that cause coccidiosis in chickens. *Molecular and cellular probes*, **23**, 83-9.

- Nei, M. and Rooney, A. P.** (2005). Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annual review of genetics*, **39**, 121-52.
- Qari, S. H., Goldman, I. F., Pieniazek, N. J., Collins, W. E. and Lal, A. A.** (1994). Blood and sporozoite stage-specific small subunit ribosomal RNA-encoding genes of the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Gene*, **150**, 43-9.
- Rooney, A. P.** (2004). Mechanisms underlying the evolution and maintenance of functionally heterogeneous 18S rRNA genes in Apicomplexans. *Molecular biology and evolution*, **21**, 1704-11.
- Schnitzler, B. E., Thebo, P. L., Tomley, F. M., Uggla, A. and Shirley, M. W.** (1999). PCR identification of chicken *Eimeria*: a simplified read-out. *Avian pathology*, **28**, 89-93.
- Shirley, M. W., Jeffers, T. K. and Long, P. L.** (1983). Studies to determine the taxonomic status of *Eimeria mitis*, Tyzzer 1929 and *E. mivati*, Edgar and Seibold 1964. *Parasitology*, **87**, 185-98.
- Shirley, M. W., Smith, A. L. and Blake, D. P.** (2007). Challenges in the successful control of the avian coccidia. *Vaccine*, **25**, 5540-7.
- Shirley, M. W., Smith, A. and Tomley, F.** (2005). The Biology of Avian *Eimeria* with an Emphasis on their Control by Vaccination. *Advances in Parasitology*, **60**, 285-330.
- Smith, A. L., Hesketh, P., Archer, A. and Shirley, M. W.** (2002). Antigenic diversity in *Eimeria maxima* and the influence of host genetics and immunization schedule on cross-protective immunity. *Infection and immunity*, **70**, 2472-9.

**Publikace *in extenso*, které jsou podkladem
disertace /
Publications *in extenso* that form basis of this
work**

(IF 2010 Journal Citation Reports, Thomson Reuters)

I.

Vrba, V., Blake, D. P. and Poplstein, M. (2010). Quantitative real-time PCR assays for detection and quantification of all seven *Eimeria* species that infect the chicken. *Veterinary Parasitology*, **174**, 183-90. (IF=2.331)

II.

Vrba, V., Poplstein, M. and Pakandl, M. (2011). The discovery of the two types of small subunit ribosomal RNA gene in *Eimeria mitis* contests the existence of *E. mivati* as an independent species. *Veterinary Parasitology* (In Press). (IF=2.331)

III.

Poplstein, M. and Vrba, V. (2011). Description of the two strains of turkey coccidia *Eimeria adenoeides* with remarkable morphological variability. *Parasitology*, **138**, 1211-6. (IF=2.522)

Životopis

Mgr. Vladimír Vrba (*13.9.1980)

BIOPHARM Výzkumný ústav biofarmacie a veterinárních léčiv a.s.
Pohoří – Chotouň
254 49 Jílové u Prahy
Tel.: 261 395 233
E-mail: vrba@bri.cz

Vzdělání

2004 – současnost

Doktorské studium, oborová rada vývojové biologie,
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze
Prvotní téma „Studium reprogramování dárcovského jádra po přenosu do enukleovaného oocyty myši“ později změněno na „Uplatnění metod molekulární a buněčné biologie ve výzkumu prvoků *Eimeria*“ z důvodu změny zaměření pracoviště.
Školitel: RNDr. Jiří Škvor, CSc.

2000 – 2004

Magisterské studium, Katedra antropologie a genetiky člověka,
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze
Téma „Vývoj metody nukleární transplantace u myši“.
Školitel: RNDr. Jiří Škvor, CSc.

Praktické dovednosti

Metody molekulární a buněčné biologie jako jsou qPCR, klonování genů, exprese proteinů, imunoflorescence, tkáňové kultury, western blot a jiné. Metody klasické kokcidiologie, izolace oocyst a jejich DNA. Programování a bioinformatika, predikce genů *E. tenella*.

Curriculum vitae

Mgr. Vladimír Vrba (*13.9.1980)

BIOPHARM Research Institute of Biopharmacy and Veterinary Drugs
Pohoří – Chotouň
254 49 Jílové u Prahy
Czech Republic
Tel.: +420 - 261 395 233
E-mail: vrba@bri.cz

Education

2004 – present

PhD study, board of developmental biology,
Faculty of Science, Charles University in Prague
Initial PhD thesis „Study of reprogramming of donor nucleus
after transfer into enucleated mouse oocyte“ was later changed
to „Application of molecular and cellular biology methods in
research of protozoa *Eimeria*“ due to the change in the main
focus of the institute.
Supervisor: RNDr. Jiří Škvor, CSc.

2000 – 2004

Master degree, Department of Anthropology and Human
Genetics, Faculty of Science, Charles University in Prague
Thesis „Development of nuclear transplantation method in
mouse“.
Supervisor: RNDr. Jiří Škvor, CSc.

Practical skills

Methods of molecular and cellular biology including qPCR, gene
cloning, protein expression, immunofluorescence, tissue cultures,
western blotting etc. Classical methods of coccidiology, isolation
of oocysts and their DNA. Programming and bioinformatics, gene
predictions in *E. tenella*.