

MICHAŁ POLUS, RENATA KOCWA-HALUCH*

ANALIZA OBECNOŚCI *CRYPTOSPORIDIUM SP.*
W ŚCIEKACH KOMUNALNYCH METODĄ RFLP-PCR

DETECTION OF *CRYPTOSPORIDIUM*
IN WASTEWATER BY RFLP-PCR

Streszczenie

Opracowanie szybkiej, czulej i niezawodnej metody detekcji oocyst *Cryptosporidium sp.* jest koniecznością wynikającą z rozpowszechnienia tego pierwotniaka w środowisku i łatwości zakażenia nim, jak i z zaleceń dyrektywy UE 98/83/WE. Niniejszy artykuł stanowi próbę praktycznego zastosowania jednej z technik biologii molekularnej – analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych w obrębie genu 18S rRNA małej podjednostki rybosomalnej – w detekcji oocyst *Cryptosporidium* w ściekach komunalnych. Na podstawie wstępnych wyników można ocenić, że metoda pozwala na wykrycie ok. 2–3 oocyst oraz identyfikację ich przynależności gatunkowej.

Słowa kluczowe: Cryptosporidium, kryptosporydioza, woda do picia, ścieki, zdrowie publiczne, PCR, RFLP

Abstract

Development of a rapid, sensitive and reliable detection methods for *Cryptosporidium sp.* oocysts in environmental samples is a necessity resulting from both the spread of this parasite and the recommendations of EU 98/83/EC directive. This work is a practical attempt to verify and assess one of the techniques of molecular biology – the analysis of restriction fragments length polymorphism in the 18S rRNA gene – in detecting *Cryptosporidium* oocysts in wastewater. First results show a sensitivity that allows to detect 2–3 oocysts and identify their species.

Keywords: Cryptosporidium, cryptosporidiosis, drinking water, wastewater, public health, PCR, RFLP

* Dr Michał Polus, prof. dr hab. inż. Renata Kocwa-Haluch, Instytut Zaopatrzenia w Wodę i Ochrony Środowiska, Wydział Inżynierii Środowiska, Politechnika Krakowska.

1. Wstęp

Pierwszy przypadek zakażenia pierwotniakiem z rodzaju *Cryptosporidium* został opisany w 1976 r. i w ślad za nim zaczęły się pojawiać kolejne coraz liczniejsze i lepiej udokumentowane przypadki kryptosporydiozy – obecnie można mówić o ponad 150 przypadkach z ponad 90 krajów [1, 2] – wywołanej głównie spożyciem wody lub rekreacją na pływalniach [3, 4]. Liczba doniesień oraz fakt, że pochodziły one z krajów wysoko rozwiniętych każą przypuszczać, że skala zagrożenia może być duża, a metody uzdatniania wody dotąd stosowane – niewystarczające [2, 5, 6]. Dlatego pojawia się potrzeba wdrożenia szybkiej, czulej, specyficznej i możliwie taniej metody pozwalającej wykryć i zidentyfikować pierwotniaki z rodzaju *Cryptosporidium*.

Rodzaj *Cryptosporidium* stanowią pierwotniaki będące pasożytami bezwzględnie wewnątrzkomórkowymi. Wytwarzają one niezwykle odporne na działanie czynników środowiska oocysty o wielkości 4–6 μm [7, 8]. Spośród kilkunastu gatunków rodzaju *Cryptosporidium*, najszerzej rozpowszechnionym, posiadającym największy zasięg żywicielski, jest gatunek *C. parvum*, którego kilka genotypów stanowi zagrożenie epidemiologiczne dla człowieka [3, 5, 9]. Minimalną dawkę zakaźną stanowi u osób zdrowych około 100–200 oocyst, u osób o obniżonej odporności objawy pojawiają się już po przyjęciu 30 oocyst, a można przypuszczać, że nawet pojedyncza, żywa oocysta jest zdolna wywołać chorobę u osób z zaburzeniami układu immunologicznego [5, 7]. Zasadnicza trudność w prewencji kryptosporydiozy wynika z biologicznych właściwości oocyst – ich dużej odporności na rozmaite czynniki środowiskowe oraz większość stosowanych w procesie uzdatniania wody dezynfekantów [6, 8–10].

W Polsce przeprowadzono nieliczne badania nad występowaniem kryptosporydiozy, nie uzyskując jednoznacznych wyników dotyczących częstości występowania *Cryptosporidium*. Ponadto w zależności od przyjętych metod diagnostycznych uzyskiwano różne wyniki. Wykazano natomiast kryptosporydiozy u zwierząt hodowlanych, a także u wybranych gatunków zwierząt dzikich [11, 12, 13]. Nie wiadomo jak częste są przypadki zakażeń oocystami *Cryptosporidium* z wody pitnej, gdyż nie prowadzono w Polsce takich badań.

Najbardziej dopracowanymi metodami wykrywania oocyst *Cryptosporidium* w wodzie są protokoły 1622 i 1623 opracowane w latach 90. przez amerykańską Agencję Ochrony Środowiska (US Environmental Protection Agency, EPA). Polegają one na filtracji próbki wody, izolacji oocyst z zebranego z filtra eluatu za pomocą immunoseparacji magnetycznej (Immunomagnetic Separation, IMS), wybarwianiu oocyst przeciwciałami znakowanymi fluorescencyjnie (Immunofluorescence, Assay IFA) i zliczaniu oocyst pod mikroskopem. Zasadniczym celem tych protokołów jest ustalenie liczby żywych oocyst z rodzaju *Cryptosporidium* przy braku informacji do jakiego gatunku czy genotypu zliczone oocysty należą [14, 15]. Czułość i powtarzalność protokołów EPA zależy od wielu czynników, takich jak: rodzaj filtra, technika elucji, mętność wody [16–18]. Przyjęta przez EPA metodyka nie pozwala odróżnić oocyst żywych od martwych czy pustych, nie pozwala również ustalić gatunku, czy genotypu [19–21], czyli trudno ocenić, czy uzyskany pozytywny sygnał świadczy o zagrożeniu dla człowieka.

Jako podstawę detekcji w niniejszym artykule przyjęto reakcję łańcuchową polimerazy (Polymerase Chain Reaction, PCR), która daje wiele możliwości, gdyż genom *Cryptosporidium* został gruntownie zbadany [22, 23]. Zastosowanie PCR zapewnia wy-

soką czułość i swoistość badania, ponieważ odpowiednia konstrukcja starterów umożliwia amplifikację, a więc detekcję materiału genetycznego tylko jednego, wybranego gatunku lub nawet poszczególnego szczepu, czy genotypu [16, 24, 25].

Graniczna czułość metody PCR w zależności od doboru starterów może wahać się w granicach od około 0,1 pg do około 100 pg wykrywanego DNA [24], a więc różnice w czułości sięgają trzech rzędów wielkości. Przekładając te wartości na minimalną liczbę oocyst *Cryptosporidium* zdolnych do wykrycia metodą PCR, otrzymujemy odpowiednio czułość od jednej oocysty do około stu w pobranej próbce. Podkreślić jednak trzeba, że wyniki te dotyczą prac eksperymentalnych, w których przygotowywano sztuczne posiewy określonej liczby oocyst w wodzie. Oznaczenie prowadzone w warunkach naturalnych (wysiewanie oocyst do wody rzecznej i wykonywanie rutynowej izolacji oocyst) wykazuje, że wiele oocyst ginie lub w inny sposób ulega utraceniu w trakcie izolacji i rzeczywista obserwowana czułość jest nieco niższa. Mimo tego, czułość technik opartych na PCR, zależnie od rodzaju badanego materiału, czasu, jaki upłynął od jego pobrania, stopnia oczyszczenia próbek i innych czynników waha się w przedziale od 1 do 200 oocyst [6, 16, 26].

Metoda RFLP-PCR (Restricted Fragment Length Polymorphism – PCR) polega na analizie polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych wewnątrz amplifikowanego fragmentu DNA [27–31]. Zatem technika ta łączy w sobie dobrą czułość typową dla PCR ze swoistością gatunkową wobec większości opisanych gatunków *Cryptosporidium*. Stosunkowo dobrze rozpoznany jest polimorfizm w obrębie genu 18S rRNA dla małej podjednostki rybosomalnej. W obrębie tego genu występują co najmniej dwa obszary polimorfizmu: jeden w pozycji 179–271 pz i drugi (hiperzmienny) w pozycji 615–850 pz względem początku genu. Polimorfizm występujący w tych obszarach ma charakter zarówno insercji, jak i substytucji i pozwala wygenerować za pomocą tych samych par starterów produkty PCR różniące się długością, w których pojawiają się sekwencje swoiste dla różnych enzymów restrykcyjnych. Polimorfizm w obszarze 179–271 pz można analizować za pomocą enzymów TaqI, AseI, MseI, BstI, SspI, SimI i FmuI [27], natomiast polimorfizm w obszarze 615–850 pz za pomocą enzymów DdeI, DraI i VspI [28]. W obu przypadkach uzyskuje się możliwość identyfikacji niemal wszystkich gatunków i genotypów *Cryptosporidium* (tabela 1).

Ponieważ oba obszary polimorfizmu oddalone są od siebie dość daleko, możliwe jest skonstruowanie dwóch par starterów i poprzedzenie analizy restrykcyjnej wykonaniem reakcji wewnętrznej PCR (nested-PCR), dla poprawy zarówno czułości, jak i swoistości detekcji.

W niniejszym artykule wykorzystano detekcję polimorfizmu w obszarze sekwencji 615–850 pz genu 18S rRNA gdyż wymaga użycia mniejszej liczby enzymów restrykcyjnych i jest tym samym prostsza.

2. Materiały i metody

Materiał

Ścieki komunalne (5 litrów) były poddane wirowaniu (10 000 xg, 15 minut) w temperaturze pokojowej. Zebraną peletkę zawieszono w niewielkiej ilości wody i narwarstwiono na 3-krotną objętość wodnego roztworu sacharozy ($d = 1,17 \text{ g/cm}^3$) i pod-

dano wirowaniu (1250 xg, 15 minut, 4°C). Po wirowaniu zbierano całą interfazę i rozcieńczano 5-krotnie wodą. Zawiesinę ponownie wirowano (2500 xg, 15 minut, 4°C). Z zebranych peletek natychmiast izolowano DNA. Przeanalizowano łącznie trzy próbki ścieków komunalnych pobranych po stopniu oczyszczania mechanicznego.

Izolacja DNA

Z uzyskanej peletki wykonywano bezpośrednią izolację DNA. Na wstępie próbki cyklicznie zamrażano/rozmrzaano (kilkanaście cykli ciekły azot/65°C) w alkalicznym buforze lizującym z SDS (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,5% SDS, pH 8,5). Po tym etapie materiał traktowano wysoką dawką proteinazy K (200 µg/ml) i intensywnie wytrząsano przez 12 godzin w 55°C (ThermoMixer, Eppendorf). Reakcję przerywano przez podniesienie temperatury do 90°C na 30 minut. Po wytrawieniu wykonywano podwójną ekstrakcję mieszaniną fenol:chloroform:alkohol izoamylowy (25:24:1, pH 8,0) i precipitację etanolem. DNA rozpuszczano w wodzie (200 µl).

Alternatywnie izolację DNA wykonywano za pomocą zestawu QIAamp Stool DNA (Qiagen), w skład którego wchodzi inhibitorów PCR zwykle obecnych w kale. W porównaniu do oryginalnego protokołu wprowadzono niewielkie modyfikacje: 1) dodanie wstępnej dezintegracji w buforze lizującym przez cykliczne zamrażanie w ciekłym azocie i gwałtowne rozmrażanie (5–10 cykli ciekły azot/+65°C); 2) dwukrotne wydłużenie czasu trawienia proteinazą K.

RFLP-PCR

PCR wykonano w termocyklerze Mastercycler Personal (Eppendorf) w 0,2 ml cienkościennych probówkach (Kisker) w objętości 100 µl. Startery [16] (forward: 5'-aagctcgtagttggattcttg, reverse: 5'-taaggtgctgaaggagtaagg, Oligo.pl) użyto w stężeniu 0,5 µM. PCR mix zawierał 250 µM każdego dNTP, 2,5 U hotstartowej polimerazy DNA HotStarTaq Plus (Qiagen). Profil reakcji obejmował wstępną denaturację DNA i aktywację polimerazy (95°C, 15 minut), 40 cykli amplifikacji (94°C 45 sekund, 55°C 45 sekund, 72°C 75 sekund) oraz końcowe wydłużanie (72°C 10 minut). Długość produktu PCR może wynosić zależnie od gatunku 431–455 pz.

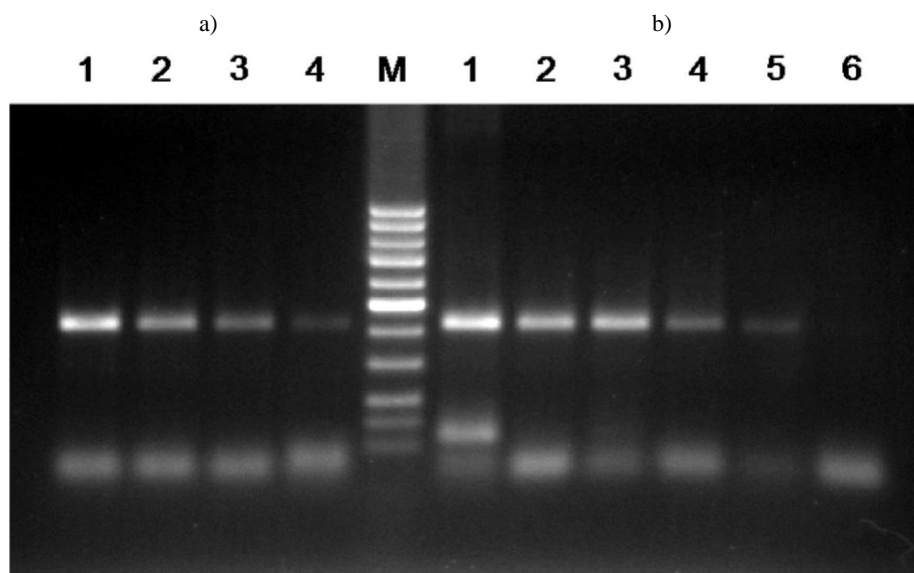
Jako kontrolę pozytywną użyto genomowe DNA *Cryptosporidium parvum* (ATCC, PRA-67D) w ilości 100 pg–10 fg albo bibliotekę *C. parvum* wklejoną w Bluescript II (ATCC 87668). Fagemid z biblioteką był izolowany z bakterii za pomocą standardowego protokołu łagodnej lizy alkalicznej, wytrawiania RNazą A i ekstrakcji fenolowo-chloroformowej. Po izolacji fagemid był cięty enzymem restrykcyjnym EcoRI (Fermentas, 1 U na 1 µg, 37°C, 18 godzin). Po inaktywacji termicznej enzymu oznaczano stężenie DNA, przygotowywano rozcieńczenia i przechowywano je w temp. –20°C.

Po zakończeniu reakcji PCR produkt dzielono na cztery próbki, z których trzy poddawano trawieniu enzymami restrykcyjnymi DdeI, DraI, VspI (FastDigest, Fermentas). Elektroforezę produktów wykonano na 2% agarozie (VWR) przy napięciu 5V/cm. Bromek etydyny (VWR) był użyty zarówno w żelu, jak i buforze (1 x TAE) w stężeniu 0,5 µg/ml. Dokumentację fotograficzną wykonywano przy użyciu kamery VisiDocIt (UVP).

3. Wyniki

Wstępnie przeprowadzone analizy pokazują, że bezpośrednia reakcja PCR pozwala wykryć co najmniej 0,1 pg genomowego DNA *C. parvum*, co oznacza około 10 kopii genu (rys. 1a). Czulość reakcji wobec biblioteki genomowej w fagemidzie wynosiła 50 pg (rys. 1b).

Rezultaty PCR na trzech próbkach ścieków komunalnych zebrane są na rys. 2. Próbkę ścieków były pobierane na oczyszczalni po wstępnym mechanicznym oczyszczeniu w sierpniu i wrześniu 2009 r. Próbkę pozytywną została reamplifikowana i poddana trawieniu enzymami restrykcyjnymi, którego efekt znajduje się na rys. 3. Uzyskany obraz restrykcyjny pozwala przypuszczać, że wyizolowany materiał pochodził od *C. parvum*.

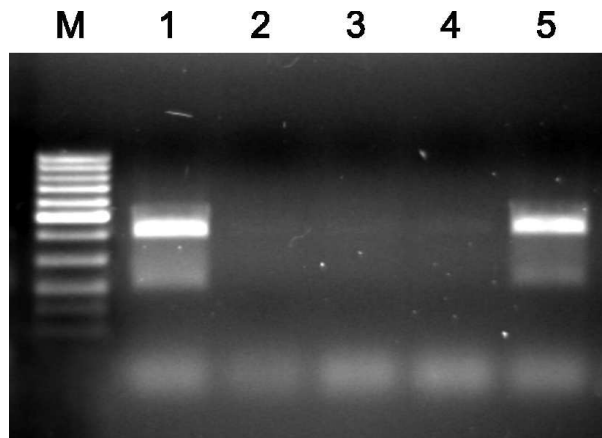


Rys. 1. Czulość detekcji DNA *Cryptosporidium parvum*. Elektroforeza produktów w 2% agarozie. Barwienie bromkiem etydy: a) amplifikacja genomowego DNA *C. parvum*: 1 – 100 pg, 2 – 10 pg, 3 – 1 pg, 4 – 0,1 pg; b) amplifikacja na matrycy biblioteki genomowej *C. parvum* w fagemidzie: 1 – 500 ng, 2 – 50 ng, 3 – 5 ng, 4 – 500 pg, 5 – 50 pg, 6 – 5 pg, M) marker 100 pz (pogrubiony prążek – 500 pz).

Fig. 1. Sensitivity of detection of *Cryptosporidium parvum* DNA by PCR (EtBr staining in 2% agarose): a) genomic DNA 1 – 100 pg, 2 – 10 pg, 3 – 1 pg, 4 – 0,1 pg; b) genomic library of *C. parvum* DNA in phagemid vector: 1 – 500 ng, 2 – 50 ng, 3 – 5 ng, 4 – 500 pg, 5 – 50 pg, 6 – 5 pg, M) DNA ladder 100 bp

Przedstawione wyniki pokazują, że jest możliwe zastosowanie metod biologii molekularnej do wykrywania *Cryptosporidium* w próbach środowiskowych. Sama reakcja PCR charakteryzuje się bardzo dobrą czulością – bezproblemowa detekcja 10 kopii genomowego DNA oznacza w praktyce zdolność wykrycia 2–3 oocyst *Cryptosporidium*, o ile uda się bez strat wyizolować DNA. Taka czulość oznacza, że wprowadzanie dodatkowych

modyfikacji zwiększających czułość detekcji (np. wewnętrzna PCR, czy hybrydyzacja dot-blot produktów PCR) nie jest konieczne do uzyskania satysfakcjonujących wyników.



Rys. 2. Detekcja *Cryptosporidium* w próbkach środowiskowych: 1 – kontrola pozytywna (10 pg DNA); 2 – kontrola negatywna, 3, 4, 5 – amplifikacja materiału z trzech próbek ścieków komunalnych; M – marker 100 pz (pogrubiony prążek – 500pz)

Fig. 2. Detection of *Cryptosporidium* in environmental samples: 1 – control(+) (10 pg of genome DNA), 2 – control(-), 3, 4, 5 – three samples of municipal wastewater, M – DNA ladder (100 bp)

Taka czułość pozwala teoretycznie na wykrycie oocyst znajdujących w badanej próbce w ilości 0,5–2 na litr. Rysunek 2 ilustruje wynik pozytywny uzyskany dla kilku różnych próbek materiału. Wyniki te należy jednak interpretować jako całkowicie jakościowe, informujące wyłącznie o obecności *Cryptosporidium* w badanej próbce.

Także identyfikacja przynależności gatunkowej jest możliwa wskutek jednoetapowej obróbki enzymami restrykcyjnymi produktów PCR (tabela 1). Efektywność analizy RFLP jest w dużym stopniu uzależniona od jakości rozdziału fragmentów DNA w trakcie elektroforezy – stosunkowo niewielkie różnice między długością produktu PCR (1–24 pz wobec kilkuset pz produktu PCR) oraz równie niewielkie różnice długości fragmentów restrykcyjnych (104 pz/112 pz) mogą być łatwo pominięte, jeżeli jakość żelu i warunki elektroforezy nie będą optymalne.

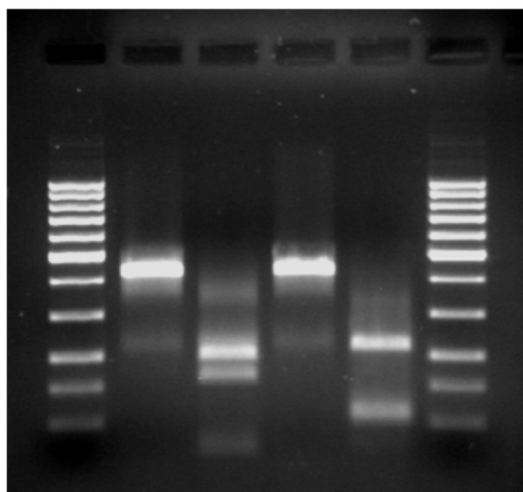
Pewną niedogodnością wynikającą z metod biologii molekularnej jest fakt, że wykrywana jest obecność targetowego dla PCR odcinka DNA, co wcale nie musi oznaczać wykrycia żywej, zdolnej do zakażenia oocysty. Niestety DNA jest cząsteczką dość trwałą i zdolną przetrwać pomimo skutecznej dezaktywacji oocysty, np. dezynfekantem. Jako rozwiązanie tego problemu, dodatkowo mogące podnieść czułość, proponuje się oparcie reakcji na detekcji bezpośrednio rRNA, czyli wykonanie odwrotnej transkrypcji przed PCR. Duża labilność RNA powinna wyeliminować wyniki fałszywie pozytywne i dać wynik wyłącznie w sytuacji wykrycia żywych oocyst. Niestety labilność RNA połączona z trwałością wszechobecnych rybonukleaz powoduje ogromne trudności techniczne związane z izolacją RNA z próbek środowiskowych, w sposób wykluczający degradację materiału.

Tabela 1

Oznaczenie gatunków z rodzaju *Cryptosporidium* za pomocą RFLP.
Tabela zawiera długości fragmentów restrykcyjnych
po trawieniu produktów PCR enzymami DdeI, DraI i VspI.

Długość produktu PCR dla poszczególnych gatunków <i>Cryptosporidium</i>	Długość fragmentów restrykcyjnych (pz):			Genbank nr
	<i>VspI</i>	<i>DraI</i>	<i>DdeI</i>	
<i>C. parvum</i> typ 1 (438)	222, 104, 112	---	204, 68, 166	L16997
<i>C. parvum</i> typ 2 (435)	219, 104, 112	---	201, 68, 166	L16996, AF161856
<i>C. muris</i> (432)	320, 112	---	42, 224, 166	AF093498, AF093497
<i>C. andersoni</i> (431)	319, 112	---	265, 166	AF093496
<i>C. felis</i> (455)	239, 104, 112	50, 405	221, 68, 166	AF087577
<i>C. baileyi</i> (428)	212, 104, 112	84, 344	262, 166	L19068, AF093495
<i>C. meleagridis</i> (434)	47, 171, 104, 112	---	200, 68, 166	AF112574
<i>C. serpentis</i> (430)	318, 112	---	264, 166	AF093502
<i>C. wrairi</i> (435)	219, 104, 112	---	201, 68, 166	AF115378

M 1 2 3 4 M



Rys. 3. Analiza polimorfizmu w obszarze 615–850 pz genu 18S rRNA: 1 – kontrola (produkt pierwotny PCR 435 pz); 2 – trawienie DdeI (prążki 201 pz, 166 pz i 68 pz); 3 – trawienie DraI; 4 – trawienie VspI (prążki 219 pz, 112 pz i 104 pz); M – marker 100 pz (pogrubiony prążek – 500 pz)

Fig. 3. Analysis of restriction fragment length polymorphism within 18S rRNA gene (range 615–850 bp): 1 – control lane (PCR product 435 bp), 2 – DdeI (201 bp, 166 bp, 68 bp), 3 – DraI (no digestion), 4 – VspI (219 bp, 112 bp, 104 bp), M – DNA ladder (100 bp)

Wysoka czułość PCR sprawia, że uzyskany wynik ma charakter wyłącznie jakościowy. Można rozważać wykonywanie ilościowej reakcji PCR (real-time PCR), jednak oznacza to zdecydowane podniesienie kosztów całej analizy. Niemożność bezpośredniej oceny liczby kopii DNA w badanym materiale zwraca przy okazji uwagę na pewną trudność interpretacyjną wyników zarówno pozytywnych (czy w materiale była 1 oocysta, czy więcej), jak i negatywnych (czy materiał był negatywny, czy zawiodła izolacja DNA).

Zdecydowanie najtrudniejszym etapem, krytycznym dla powodzenia całej metody, wydaje się izolacja DNA z peletki. Z uwagi na dużą oporność ścian oocyst *Cryptosporidium* konieczne jest użycie stosunkowo agresywnych środków (szok termiczny, wysokie stężenia proteiny K, homogenizacja mechaniczna) mogących równocześnie prowadzić do degradacji DNA. Ponieważ późniejsza reakcja PCR powiela tylko stosunkowo niewielki odcinek DNA, częściowa fragmentacja izolowanego DNA nie powinna stanowić problemu. Drugą trudnością jest obecność w ściekach licznych, trudnych do przewidzenia substancji, których obecność może wpływać na aktywność polimerazy DNA, a w efekcie – na przebieg PCR. Dlatego uproszczenie izolacji polegające na pominięciu separacji immunomagnetycznej oocyst powinno być uzupełnione staranną ekstrakcją.

Opisana metoda może stać się użyteczna w analizie wody [33], jednak po wprowadzeniu modyfikacji uwzględniających znacznie większe objętości materiału koniecznego do przebadania i komplikującego nieco etap bezpośredniej izolacji DNA.

Podsumowując, można stwierdzić, że RFLP-PCR jest obiecującą techniką detekcji i identyfikacji oocyst *Cryptosporidium* w ściekach. W porównaniu do klasycznych już protokołów 1622/1623 EPA, przynosi pewne korzyści (szybkość, czułość, specyficzność gatunkową, względnie niską cenę), lecz nie pozostaje bez wad, np. nie pozwala na ocenę żywotności oocyst. Jednak, jak się wydaje, największym problemem jest etap izolacji DNA z materiału środowiskowego, a zwłaszcza oczyszczanie od inhibitorów PCR, oraz opracowanie skutecznej kontroli pozytywnej.

Praca była wykonywana w ramach projektu badawczego nr 4159/B/T02/2008/35.

Literatura

- [1] Smith H.V., Rose J.B., *Waterborne cryptosporidiosis: current status*, Parasitol. Today, 14(1), 1998, 14-22.
- [2] MacKenzie W.R., Hoxie N.J., Proctor M.E., Gradus M.S., Blair K.A., Peterson D.E., Kazmierczak J.J., Addiss D.G., Fox K.R., Rose J.B., *A massive outbreak in Milwaukee of Cryptosporidium infection transmitted through public water supply*, N. Engl. J. Med., 331, 1994, 161-167.
- [3] Xiao L., Singh A., Limor J., Graczyk T.K., Gradus S., Lal A., *Molecular Characterization of Cryptosporidium Oocysts in Samples of Raw Surface Water and Wastewater*, Appl. Environ. Microbiol., 67(3), 2001, 1097-1101.
- [4] Fayer R., Morgan U., Upton S.J., *Epidemiology of Cryptosporidium: transmission, detection and identification*, Int. J. Parasitol., 30, 2000, 1315-1322.

- [5] Majewska A.C., Kosiński Z., Werner A., Sulima P., Nowosad P., *Pasożytnicze pierwotniaki jelitowe: nowe wodnopochodne zagrożenie zdrowia publicznego*, Wydanie II, Uniwersytet Warszawski, 2001, 19-16.
- [6] Keegan A.R., Fanok S., Monis P.T., Saint C.P., *Cell Culture-Taqman PCR Assay for Evaluation of Cryptosporidium parvum Disinfection*, Appl. Environ. Microbiol., 69(5), 2003, 2505-2511.
- [7] Marshall M.M., Naumowitz D., Ortega Y., Sterling C.R., *Waterborne Protozoan Pathogens*, Clin. Microbiol. Rev., 10(1), 1997, 67-85.
- [8] Carey C.M., Lee H., Trevors J.T., *Biology, persistence and detection of Cryptosporidium parvum and Cryptosporidium hominis oocyst*, Water Research, 38, 2004, 818-862.
- [9] Xiao L., Fayer R., *Molecular characterisation of species and genotypes of Cryptosporidium and Giardia and assessment of zoonotic transmission*, Int. J. Parasitol., 38(11), 2008, 1239-55.
- [10] Kocwa-Haluch R., Polus M., *Występowanie patogennych pierwotniaków jelitowych w wodzie wodociągowej, część II: Usuwanie cyst i oocyst patogennych pierwotniaków jelitowych z wody przeznaczonej do picia*, Wydawnictwo Politechniki Krakowskiej, Czasopismo Techniczne, z. 8-Ś/2004, 113-124.
- [11] Szostakowska B., Kruminis-Lozowska W., Racewicz M., Knight R., Tamang L., Myjak P., Graczyk T.K., *Cryptosporidium parvum and Giardia lamblia Recovered from Flies on a Cattle Farm and in a Landfill*, Appl. Environ. Microbiol. 70(6), 2004, 3742-3744.
- [12] Bednarska M., Bajer A., Siński E., *Calves as a potential reservoir of Cryptosporidium parvum and Giardia sp.*, Ann. Agric. Environ. Med., 5, 1998, 135-138.
- [13] Majewska A.C., Solarczyk P., Tamang L., Graczyk T.K., *Equine Cryptosporidium parvum infections in western Poland*, Parasitol. Res., 93, 2004, 274-278.
- [14] United States Environmental Protection Agency, *Method 1622: Cryptosporidium in Water by Filtration/IMS/FA*, 2001, EPA-821-R-01-026.
- [15] United States Environmental Protection Agency, *Method 1623: Cryptosporidium and Giardia in Water by Filtration/IMS/FA*, 2001, EPA-821-R-01-025.
- [16] Johnson D.W., Pieniazek N.J., Griffin D.W., Misener L., Rose J.B., *Development of a PCR Protocol for Sensitive Detection of Cryptosporidium Oocyst in Water Samples*, Appl. Environ. Microbiol., 61(11), 1995, 3849-3855.
- [17] DiGiovani G.D., Hashemi F.H., Shaw N.J., Abrams F.A., LeChevallier M.W., Abbaszadegan M., *Detection of Infectious Cryptosporidium parvum Oocyst in Surface and Backfill Water Samples by Immunomagnetic Separation and Integrated Cell Culture-PCR*, Appl. Environ. Microbiol., 65(8), 1999, 3427-3432.
- [18] Feng Y.Y., Ong S.L., Hu J.Y., Song L.F., Tan X.L., Ng W.J., *Effect of Particles on the Recovery of Cryptosporidium Oocysts from Source Water Samples of Various Turbidities*, Appl. Environ. Microbiol., 69(4), 2003, 1898-1903.
- [19] Francy D.S., Simmons III O.D., Ware M.W., Granger E.J., Sobsey M.D., Schaefer III F.W., *Effect of Seeding Procedures and Water Quality on Recovery of Cryptosporidium Oocyst from Stream Water by Using U.S.*

- Environmental Protection Agency Method 1623*, Appl. Environ. Microbiol., 70(7), 2004, 4118-4128.
- [20] Jenkins M.B., Anguish L.J., Bowman D.D., Walker M.J., Ghiorse W.C., *Assessment of a Dye Permeability Assay for Determination of Inactivation Rates of Cryptosporidium parvum Oocyst*, Appl. Environ. Microbiol., 63(10), 1997, 3844-3850.
- [21] Robertson L.J., Campbell A.T., Smith H.V., *Viability of Cryptosporidium parvum Oocysts: Assessment by the Dye Permeability Assay; Letter to the Editor*, Appl. Environ. Microbiol., 64(9), 1998, 3544-3545.
- [22] Abrahamsen M.S., Templeton T.J., Enomoto S., Abrahante J.E., Zhu G., Lancto C.A., Deng M., Liu C., Widmer G., Tzipori S., Buck G.A., Xu P., Bankier A.T., Dear P.H., Konfortov B.A., Spriggs H.F., Iyer L., Anantharaman V., Aravind L., Kapur V., *Complete Genome Sequence of the Apicomplexan, Cryptosporidium parvum*, Science, 304, 2004, 441-445.
- [23] Polus M., Kocwa-Haluch R., *Zastosowanie metod biologii molekularnej w diagnostyce pasożytniczych pierwotniaków jelitowych z rodzaju Cryptosporidium*, Czasopismo Techniczne, z. 16-Ś/2005, 109-126.
- [24] Wu Z., Nagano I., Matsuo A., Uga S., Kimata I., Iseki M., Takahashi Y., *Specific PCR primers for Cryptosporidium parvum with extra sensitivity*, Molecular and Cellular Probes, 14, 2000, 33-39.
- [25] Patel S., Pedraza Diaz S., McLauchlin J., *The identification of Cryptosporidium species and Cryptosporidium parvum directly from whole faeces by analysis of a multiplex PCR of the 18S rRNA gene and by PCR/RFLP of the Cryptosporidium outer wall protein (COWP) gene*, Int. J. Parasitol., 29, 1999, 1241-1247.
- [26] Villena I., Aubert D., Gomis P., Ferte H., Inglard J.-C., Denis-Bisiaux H., Dondon J.-M., Pisano E., Ortis N., Pinon J.-M., *Evaluation of a Strategy for Toxoplasma gondii Oocyst Detection in Water*, Appl. Environ. Microbiol., 70(7), 2004, 4035-4039.
- [27] Coupe S., Sarfati C., Hamane S., Derouin F., *Detection of Cryptosporidium and Identification to the Species Level by Nested PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism*, J. Clin. Microbiol., 43(3), 2005, 1017-1023.
- [28] Nichols R.A.B., Campbell B.M., Smith H.V., *Identification of Cryptosporidium spp. Oocyst in United Kingdom Noncarbonated Natural Mineral Waters and Drinking Waters by Using Modified Nested PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay*, Appl. Environ. Microbiol., 69(7), 2003, 4183-4189.
- [29] Leng X., Mosier D.A., Oberst D.R., *Differentiation of Cryptosporidium parvum, C. muris and C. baylei by PCR-RFLP analysis of the 18S rRNA gene*, Veterinary Parasitol., 62, 1996, 1-7.
- [30] Azami M., Moghaddam D.D., Salehi R., Salehi M., *The Identification of Cryptosporidium Species in Isfahan, Iran by PCR-RFLP Analysis of the 18S rRNA Gene*, Molecular Biology, 41(5), 2007, 851-856.
- [31] Yang W., Chen P., Villegas E.N., Landy R.B., Kanetsky C., Cama V., Dearen T., Schultz C.L., Orndorff K.G., Prelewicz G.J.,

- Grown M.H., Young K.R., Xiao L., *Cryptosporidium* Source Tracking in the Potomac River Watershed, *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(21), 2008, 6495-6504.
- [32] Xiao L., Morgan U., Limor J., Escalante A., Arrowood M., Shulaw W., Thompson R.C.A., Fayer R., Lal A.A., *Genetic diversity within Cryptosporidium parvum and related Cryptosporidium species*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 1999, 3386-3391.
- [33] Polus M., Kocwa-Haluch R., *Detection and identification of Cryptosporidium sp. oocysts in water and wastewater by direct DNA isolation from samples and RFLP-PCR*, *Monografia PAN*, nr 58, tom 1, 2009, 225-234.