

OZNACZANIE I IDENTYFIKACJA CRYPTOSPORIDIUM W WODZIE I ŚCIEKACH ZA POMOCĄ BEZPOŚREDNIEJ IZOLACJI DNA I RFLP-PCR.

DETECTION AND IDENTIFICATION OF CRYPTOSPORIDIUM SP. OOCYSTS IN WATER AND WASTEWATER BY DIRECT DNA ISOLATION FROM SAMPLES AND RFLP-PCR

Michał Polus, Renata Kocwa-Haluch

Katedra Technologii Środowiskowych, Instytut Zaopatrzenia w Wodę i Ochrony Środowiska
Wydział Inżynierii Środowiska, Politechnika Krakowska, ul. Warszawska 24, 31-155 Kraków
e-mail: mpolus@vistula.wis.pk.edu.pl, renata@vistula.wis.pk.edu.pl

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 water and waste water. 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

Wprowadzenie

Pierwszy zakażenie pierwotniakiem z rodzaju *Cryptosporidium* zostało opisane w dopiero roku 1976 lecz w ślad za tym doniesieniem zaczęły się pojawiać kolejne coraz liczniejsze i lepiej udokumentowane przypadki kryptosporydiozy – obecnie można mówić o ponad 150 przypadkach z ponad 90 krajów (Smith i Rose 1998, MacKenzie i inni 1994). Powtarzającą się w większości doniesień postulowaną przyczyną zachorowań jest spożycie wody zawierającej oocysty *Cryptosporidium*. Dotyczy to nie tylko wody wodociągowej lecz również przypadków połknięcia wody na pływalniach (Xiao i inni 2001, Fayer i inni 2000). Liczba doniesień pozwoliła zwrócić uwagę, że metody uzdatniania wody uznawane dotąd za wystarczająco skuteczne wobec oocyst *Cryptosporidium* w istocie są wystarczające (Majewska i inni 2001, Keegan i inni 2003). Co ciekawe, większość opisanych epidemii kryptosporydiozy wystąpiła mimo znakomitych parametrów jakości wody gdyż dotyczyła krajów wysoko rozwiniętych jak U.S.A., Japonia, czy Wielka Brytania, zatem można się spodziewać, że rzeczywista skala zagrożenia ze

strony *Cryptosporidium* jest znacznie większa. Szczególną rolę odegrała wielka epidemia kryptosporydiozy do jakiej doszło w 1993 roku w Milwaukee (MacKenzie i inni 1994), podczas której u ponad 400 tysięcy osób stwierdzono objawy zakażenia *Cryptosporidium*, cztery tysiące osób wymagało hospitalizacji, a około stu osób z niedoborami immunologicznymi zmarło. Jak wynikało z badań woda, w którą zaopatrywano Milwaukee spełniała wszystkie wymagania Amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska (EPA) dopiero przeprowadzone później szczegółowe badania wykazały, że przyczyną zanieczyszczenia ujęcia wodnego dla miasta były ścieki komunalne. Stąd pojawia się potrzeba wdrożenia szybkiej, czułej, specyficznej i możliwie taniej metody pozwalającej wykryć i zidentyfikować pierwotniaki z rodzaju *Cryptosporidium*.

Przedmiotem niniejszej pracy jest przedstawienie metody detekcji *Cryptosporidium*, wdrażanej w Katedrze Technologii Środowiskowych PK. Jako główne cele zostały postawione: dobra czułość, zdolność identyfikacji poszczególnych gatunków czy genotypów *Cryptosporidium* oraz możliwie niskie koszty analizy. Opracowywana technika bazuje na detekcji DNA pierwotniaka

metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), dzięki której udaje się uzyskać także dodatkowe korzyści: szybkość uniezależnienie od czynnika ludzkiego, możliwość zabezpieczenia zamrożonego materiału przez dłuższy okres czasu. Pewną niedogodnością jest niemożność ustalenia żywotności wykrytych oocyst.

Charakterystyka rodzaju *Cryptosporidium*

Rodzaj *Cryptosporidium* stanowią pierwotniaki będące pasożytami bezwzględnie wewnątrzkomórkowymi. Wytwarzają one niezwykle odporne na działanie czynników środowiska oocysty o wielkości 4-6µm (Marshall i inni 1997, Carey i inni 2004). W obrębie rodzaju *Cryptosporidium* wyróżnia się kilkanaście gatunków: *C. muris*, *C. wrari*, *C. andersoni*, *C. felis*, *C. baileyi*, *C. meleagridis*, *C. serpentis*, *C. saurophilum*, *C. nasorum*, *C. canis*, *C. suis*, *C. hominis* oraz *C. parvum* (Majewska i inni 2001, Xiao i Fayer 2008). Najszerszej rozpowszechnionym, posiadającym największy zasięg żywicielski obejmujący ponad 90 typów, jest wymieniony na końcu gatunek *C. parvum*. Składa się na niego kilka populacji o różnych genotypach i odmiennej specyficzności gatunkowej, w tym genotyp wyłącznie antropontyczny atakujący wyłącznie ludzi, genotyp zoonotyczny występujący u ludzi i przeżuwaczy oraz wiele innych genotypów odpowiedzialnych za infekcje u naczelnych, myszy, świni, psów i innych (Xiao i inni 2001, Majewska i inni 2001, Xiao i Fayer 2008). Wszystkie wymienione genotypy *C. parvum* posiadają podobną morfologię oocyst i są trudne do rozpoznania na podstawie analizy mikroskopowej, jednak charakterystyka molekularna pozwala odróżnić ludzkie pasożyty od form nie infekujących ludzi (Xiao i inni 2001).

C. parvum infekuje komórki nabłonka jelita wywołując objawy o dużej rozpiętości nasilenia: od wyniszczających, obfitych biegunk (dochodzących do 30 litrów na dobę), u osób z wrodzoną lub nabytą obniżoną odpornością do łagodnych, wygasających samoistnie po kilkunastu dniach od zakażenia. Typowy przebieg kryptosporydiozy manifestuje się także nudnościami, wymiotami i gorączką. Kryptosporydioza u osób o obniżonej odporności może prowadzić do zgonu. 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 (Majewska i inni 2001, Marshall i inni 1997).

Główne źródło zakażenia *Cryptosporidium* stanowi spożycie zakażonej wody, co wykazano na podstawie analizy przyczyn licznych epidemii (Smith i Rose 1998, MacKenzie i inni 1994, Majewska i inni 2001). Badania prowadzone w USA wykazały, że 67-100% wody zużytej zawiera oocysty *Cryptosporidium*, podobnie 24-100% wód powierzchniowych i 17-27% wody przeznaczonej do picia (Xiao i inni 2001). Jak wykazała analiza wodnopochoodnych epidemii kryptosporydiozy w latach 1984-1999 ponad połowa z nich (56%) została wywołana przez oocysty znajdujące się w wodzie przeznaczonej do picia. Pozostałe 44% przypadków epidemii kryptosporydiozy związanych jest z basenami pływackimi (Fayer i inni 2000). Z reguły zakażeniu tą drogą ulegały dzieci.

Zasadnicza trudność w prewencji epidemii kryptosporydiozy oraz łatwość rozprzestrzeniania rodzaju *Cryptosporidium* wynika z biologicznych właściwości oocyst – ich dużej odporności na rozmaite czynniki środowiskowe. Oczyszczanie ścieków nie zmniejsza w znaczącym stopniu ich liczby ani żywotności. Pozostawione w wodzie zachowują żywotność przez rok. Większość stosowanych w procesie uzdatniania wody dezynfekantów jest wobec nich nieskuteczna (Keegan i inni 2003, Carey i inni 2004, Xiao i Fayer 2008, Kocwa-Haluch i Polus 2004). W szczególności oocysty *Cryptosporidium* pozostają odporne na działanie chloru, jodu i bromu w dawkach stosowanych w procesie uzdatniania wody. Metody oparte na filtracji mogą stanowić skuteczną barierę dla oocyst jednak tylko po zastosowaniu filtrów o średnicy porów mniejszej od 1µm, zatem w większości przypadków nie sprawdzają się. Inne techniki – flokulacja, sedymentacja, napowietrzanie – charakteryzują się jeszcze mniejszą skutecznością usuwania oocyst *Cryptosporidium*.

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 częstość kryptosporydiozy u zwierząt hodowlanych a także u wybranych gatunków zwierząt dzikich (Szaostakowska i inni 2004, Bednarska i inni 1998, Majewska i inni 2004). Nie wiadomo jaki jest udział wodnopochoodnej transmisji oocyst *Cryptosporidium*, gdyż nie prowadzono w Polsce takich badań.

Wykrywanie oocyst *Cryptosporidium* w wodzie

Protokół EPA

Zdecydowanie najbardziej dopracowanymi metodami wykrywania oocyst *Cryptosporidium* w wodzie są protokoły 1622 i 1623 opracowane w latach dziewięćdziesiątych przez amerykańską Agencję Ochrony Środowiska (EPA). Polegają one na filtracji próbki wody, izolacji oocyst z zebranego z filtra eluatu za pomocą immunoseparacji magnetycznej (IMS), wybarwianiu oocyst przeciwciałami znakowanymi fluorescencyjnie (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 (US EPA method 1622/1623).

Pierwszym etapem postępowania diagnostycznego jest izolacja, zagęszczanie i oczyszczanie oocyst z badanego materiału za pomocą filtracji odpowiedniej objętości badanej wody (zwykle 5-100 litrów, ale w przypadku wody uzdatnionej nawet do 1000 litrów) na filtrach kapsułowych o porowatości rzędu 1µm. Po zakończeniu filtracji konieczna jest elucja zebranego w kapsule materiału, z reguły wykonywana w specjalistycznych wytrząsarkach. Filtracja/elucja jest krytycznym etapem, na którym najczęściej dochodzi do utraty materiału (oocyst). Jak wykazano w badaniach laboratoryjnych typowy odzysk oocyst na tym etapie wynosi kilkanaście procent, a zdecydowana większość oocyst jest tracona. Wysokość odzysku oocyst zależy bezpośrednio od mętności badanej próbki wody oraz od wielkości cząstek materii zawieszonych. Teoretycznie im większa jest mętność filtrowanej wody, tym więcej oocyst pozostaje na powierzchni membrany i tym większy jest ich odzysk (Johnson i inni 1995, DiGiovani i inni 1999, Feng i inni 2003).

Z zebranego eluatu separuje się oocysty za pomocą techniki IMS. Technika ta zapewnia dobrą swoistość wobec oocyst *Cryptosporidium* pozwalając je odseparować od innych mikroorganizmów obecnych w wodzie (zapewniając odzysk na poziomie 95%), jednak IMS separuje zarówno żywe zdolne do infekcji oocysty jak i oocysty zdezaktywowane, martwe, puste czy niezdolne do uwolnienia sporozoitu (Francy i inni 2004).

Właściwa detekcja polega na wyznakowaniu oocyst przeciwciałami znakowanymi fluorescencyjnie (np.

monoklinalnych przeciwciał anty -*Cryptosporidium* sprzężonych z FITC). Etap ten powinien być poprzedzony usunięciem z powierzchni oocyst kulek pozostałych po IMS. Protokoły EPA zalecają aby poza barwieniem IFA wykonać jeszcze barwienie DAPI (4,6-diamidyno-2-fenylindol, barwnik selektywnie wiążący się do par AT – wykazano silny związek między przenikaniem DAPI do jądra a zdolnością do uwolnienia sporozoita z oocysty) dla oszacowania zdolności oocyst do ekscystacji, a więc dla oceny infekcyjności wybarwionych IFA oocyst. Niestety, przenikalność barwnika do wnętrza komórki jest pewnym stanem dynamicznym ulegającym zmianom pod wpływem czynników zewnętrznych. Między innymi sama obecność fekaliów zmniejsza przenikalność barwników do wnętrza oocyst. Zatem negatywny wynik wybarwiania DAPI nie świadczy jeszcze o całkowitym braku zagrożenia ze strony takiej oocysty (Jenkins i inni 1997, Robertson i inni 1998). Innymi wadami są czasochłonność i wahania czułości, konieczność wykonania analizy w stosunkowo krótkim czasie po pobraniu próbki oraz wpływ czynnika ludzkiego. Ten ostatni może być wyeliminowany przez wykonanie zliczania oocyst w cytometrze przepływowym (FACS) jednak pod warunkiem posiadania drogiego i kosztownego w utrzymaniu cytometru.

Pomijając drobne wady protokołów 1622/1623 wymienione powyżej, nie można nie dodać, że są to protokoły wymagające wyspecjalizowanego sprzętu i odpowiednio przeszkolonego, doświadczonego personelu. Uwzględniając koszty aparatury (kapsuły filtracyjne/płuczka, zestaw do IMS, mikroskop fluorescencyjny z kontrastem różnicowo-interferencyjnym) oraz koszty materiałów (w szczególności przeciwciała do IMS i IFA) całkowity koszt analizy pojedynczej próbki wody może osiągnąć 3-6 tysięcy złotych.

Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych produktów PCR

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) jest techniką służącą do detekcji materiału genetycznego przez jego powielanie - enzymatyczną amplifikację dwuniciowych fragmentów DNA określonych przez parę starterów flankujących amplifikowanych fragment. Zastosowanie PCR do detekcji *Cryptosporidium* jest możliwe gdyż jego genom został gruntownie zbadany (Abrahamssen i inni 2004). Zasadnicza detekcja oznacza więc wykrycie produktów PCR, czyli wielokrotnie namnożonego fragmentu DNA.

Oznacza to po pierwsze, że PCR posiada dużą czułość, po drugie oznacza to znakomitą swoistość, gdyż odpowiednia konstrukcja starterów umożliwia amplifikację, a więc detekcję materiału genetycznego tylko jednego, wybranego gatunku, lub nawet poszczególnego szczepu, czy genotypu (Johnson i inni 1995, Wu i inni 2000, Patel i inni 1999).

Reakcja PCR pozwala na precyzyjne śledzenie czułości, na przykład przez zastosowanie jako kontroli pozytywnej zrekombinowanego fragmentu amplifikowanego genu wklejonego w plazmid (albo biblioteki genomowej w plazmidzie/fagemidzie) i wykorzystywanego w różnych stężeniach do oceny czułości reakcji. Taka konstrukcja kontroli pozytywnej stanowi równocześnie rozwiązanie znacznie tańsze od stosowania w celach kontrolnych całkowitego genomowego DNA *Cryptosporidium*. Detekcja produktów PCR może być wykonywana bezpośrednio przez elektroforezę w żelu agarozowym i wybarwienie bromkiem etydyny. Alternatywnie można wykonać detekcję produktów PCR przez hybrydyzację dot-blot z wyznakowaną sondą oligonukleotydową (homologiczną do produktu PCR). Jako znacznik sondy można zastosować biotynę i wdrożyć dowolny standardowy system detekcji oparty na streptawidynie sprzężonej np. ze znacznikiem chemiluminescencyjnym. Taki system detekcji pozwala zwykle zwiększyć czułość reakcji PCR o jeden-dwa rzędy wielkości (Johnson i inni 1995).

Graniczna czułość metody PCR w zależności od doboru starterów może wahać się w granicach od około 0.1pg do około 100pg DNA targetowego (Wu i inni 2000), 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 przygotowano 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 (Keegan i inni 2003, Johnson i inni 1995, Vilela i inni 2004).

Metoda RFLP-PCR (Restricted Fragment Length Polymorphism – PCR) polega na analizie polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych wewnątrz amplifikowanego fragmentu wybranego genu *Cryptosporidium* (Coupe i inni 2005, Nichols i inni 2003, Leng i inni 1996, Azami i inni 2007, Yang i inni 2008). 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 lokalizacji 179-271pz i drugi (hiperzmienny) w lokalizacji 615-850pz względem początku genu. Polimorfizm występujący w tych obszarach ma charakter zarówno insercji jak i substytucji (w różnych loci) i pozwala wygenerować przy pomocy tych samych par starterów produkty PCR różniące się długością, w których pojawiają się sekwencje swoiste dla różnych enzymów restrykcyjnych. Polimorfizm w obszarze 179-271pz można analizować za pomocą enzymów TaqI, AseI, MseI, BstI, SspI, SimI i FmuI (Coupe i inni 2005), natomiast polimorfizm w obszarze 615-850pz za pomocą enzymów DdeI, DraI i VspI (Nichols i inni 2003). 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 wewnętrznej PCR (nested-PCR), dla poprawy zarówno czułości jak i swoistości detekcji.

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

Tabela 1. Oznaczanie 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

Materiały i metody

Materiał

Woda surowa była poddana filtracji na filtrach nitrocelulozowych o porowatości 1-2µm (Millipore) w ilości 5-25 litrów, zależnie od mętności. Ścieki (1- litrów) były poddane wirowaniu (10000xg, 15 minut) w temperaturze pokojowej. Zebrane peletki służyły natychmiast do izolacji DNA, albo były zamrażane w -20°C w celu odłożenia w czasie izolacji. Przeanalizowano łącznie trzy próbki ścieków komunalnych pobranych po stopniu oczyszczania mechanicznego oraz trzy próbki wody nieuzdatnionej.

Izolacja DNA

Z uzyskanej peletki wykonywano bezpośrednią izolację DNA za pomocą cyklicznego zamrażania/rozmarzania (kilkanaście cykli ciekły azot/65°C) w alkalicznym buforze lizującym z SDS (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0,5% SDS, pH 8,5). Po tym etapie lizat traktowano wysoką dawką proteiny K (200µg/ml) i intensywnie wytrząsano przez 3 godziny w 55°C (ThermoMixer, Eppendorf). Reakcję przerywano przez podniesienie temperatury do 90°C na 30 minut. Po wytrawieniu wykonywano podwójną ekstrakcję fenolowo-chloroformową (pH 8,0) i precipitację etanolem. DNA rozpuszczono w wodzie.

Alternatywnie izolację DNA wykonywano za pomocą zestawu QIAamp DNA (Qiagen). Oryginalny protokół został zmodyfikowany przez dodanie wstępnej dezintegracji przez cykliczne zamrażanie w ciekłym azocie i gwałtowne rozmrażanie.

RFLP-PCR

PCR wykonano w termocyklerze Mastercycler Personal (Eppendorf) w 0,2ml cienkościennych probówkach (Kisker) w objętości 100µl. Startery (Johnson i inni 1995) (forward: 5'-aagctcgtagttgatttctg, reverse: 5'-taaggtgctgaaggagtaagg, oligo.pl) użyto w stężeniu 0,5µM. PCR mix zawierał 250µM każdego dNTP, 2,5U 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 431-455pz.

Alternatywnie wykonywano podwójną amplifikację (nested-PCR) wstępnie amplifikując materiał z parą starterów flankującą szerszy obszar genu 18S rRNA (forward: 5'- gtatcaattggagggaagt, reverse: 5'-ctatgtctggactggtgag). Reakcję „zewnątrzną” prowadzono w objętości 25µl z użyciem 1U

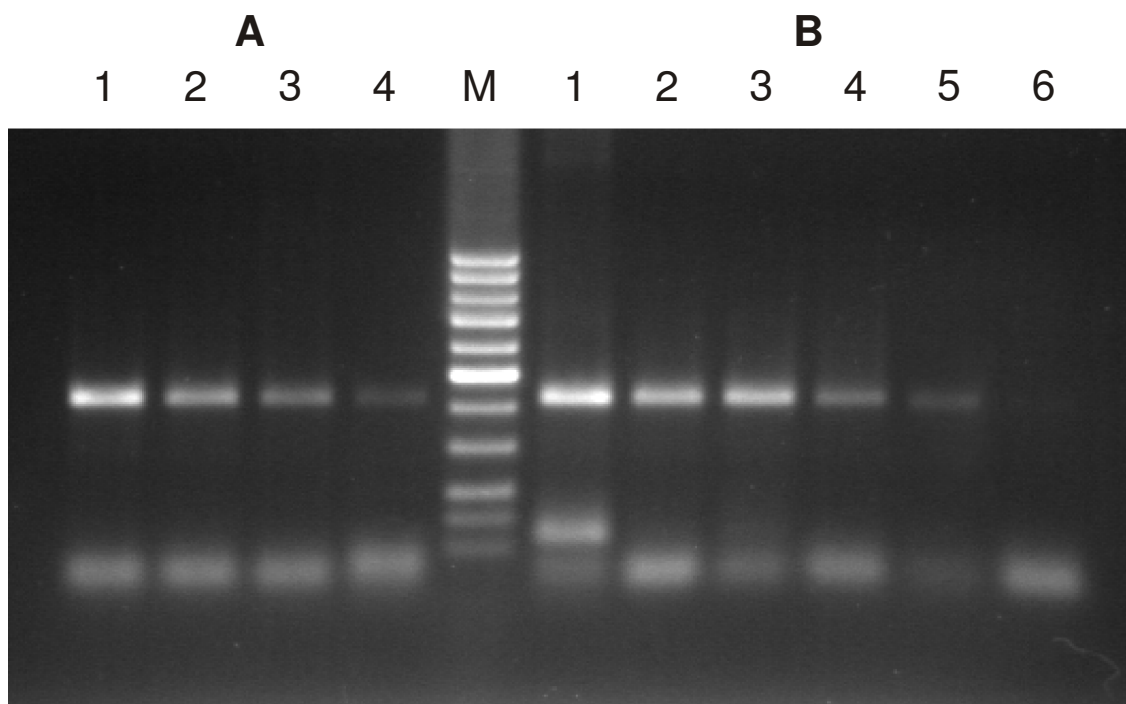
polimerazy DNA HotStarTaq Plus stosując ten sam profil termiczny reakcji. Po zakończeniu reakcji pobierano 1 μ l pierwotnego produktu (657-681pz) i wykonywano reakcję „wewnętrzną”, opisaną powyżej.

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

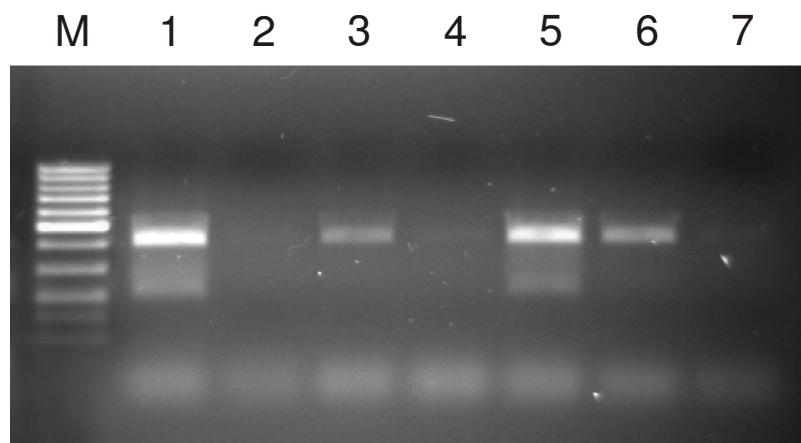
Po zakończeniu reakcji PCR produkt dzielono na cztery probówki, z których trzy poddawano trawieniu enzymami restrykcyjnymi DdeI, DraI, VspI (FastDigest, Fermentas). Elektroforezę produktów wykonano na 2% agarozie (VWR) przy napięciu 5V/cm. Bromek etydyny (VWR) był użyty zarówno w żelu jak i buforze (1x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

Wyniki i dyskusja

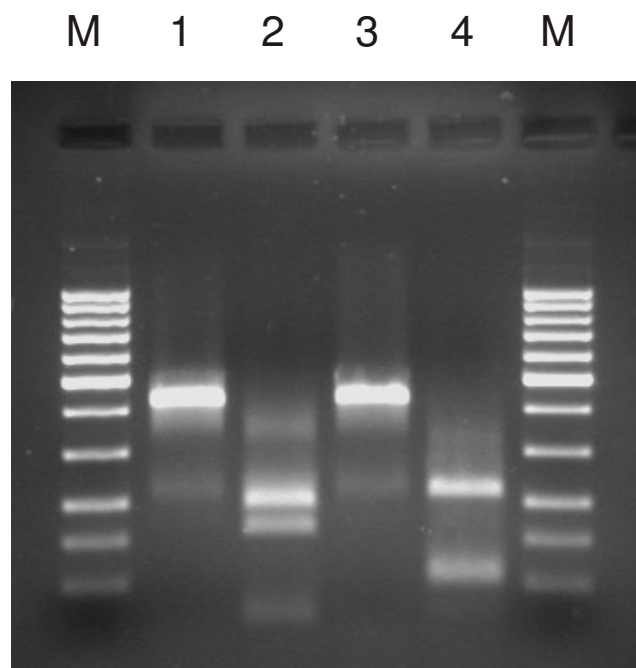
Wstępnie przeprowadzone prace pokazują, że bezpośrednia reakcja PCR pozwala wykryć co najmniej 0,1pg genomowego DNA *C. parvum*, co oznacza około 10 kopii genomu (Rys. 1A). Czulość reakcji wobec biblioteki genomowej w fagamidzie wynosiła 50pg (Rys. 1B).



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



Rys. 2 Detekcja *Cryptosporidium* w próbkach środowiskowych. 1 – kontrola pozytywna (100pg DNA); 2, 3, 4 – amplifikacja materiału izolowanego z trzech próbek wód powierzchniowych; 5, 6, 7 – amplifikacja materiału z trzech próbek ścieków komunalnych; M – marker 100pz (pogrubiony prążek – 500pz).



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

Rezultaty bezpośredniej PCR na sześciu próbkach środowiskowych zebrane są na Rys. 2. Próbkę ścieków były pobierane na oczyszczalni po wstępnym mechanicznym oczyszczeniu w kwietniu i maju 2009r. Przykładowy efekt wytrawiania produktów PCR enzymami restrykcyjnymi znajduje się na Rys. 3.

Przedstawione wyniki pokazują, że jest możliwe zastosowanie metod biologii molekularnej do wykrywania *Cryptosporidium* w próbkach środowiskowych. Sama reakcja PCR charakteryzuje się bardzo dobrą czułością – bezproblemowa detekcja 10 kopii genomowego DNA oznacza w praktyce zdolność wykrycia 2-3 oocyst *Cryptosporidium*, o ile uda się bez strat wyizolować DNA. Taka czułość oznacza, że dodatkowe zabiegi w postaci wewnętrznej reakcji PCR, czy detekcja produktów przez hybrydację dot-blot, nie są konieczne do uzyskania satysfakcjonujących wyników.

Taka czułość pozwala teoretycznie na wykrycie oocyst znajdujących w badanej próbce w ilości 0,5-2 na liter. Rys. 2 ilustruje wynik pozytywny uzyskany dla kilku różnych próbek materiału. Wyniki te należy 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 elektroforezy – stosunkowo niewielkie różnice między długością produktu PCR (1-24pz wobec kilkuset pz produktu PCR) oraz równie niewielkie różnice długości fragmentów restrykcyjnych (104pz/112pz) 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. Poniekąd 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.

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 10000?) 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 odporność ścian oocyst *Cryptosporidium* konieczne jest użycie stosunkowo agresywnych środków (szok termiczny, wysokie stężenia proteinazy K, homogenizacja mechaniczna) mogących równocześnie prowadzić do degradacji DNA. Ponieważ późniejsza reakcja PCR powieliła tylko stosunkowo niewielki odcinek DNA, częściowa fragmentacja izolowanego DNA nie powinna stanowić problemu. Drugą trudnością jest obecność w wodzie, a zwłaszcza w ściekach, licznych, trudnych do przewidzenia substancji, których obecność może wpływać na przebieg PCR. Stąd uproszczenie izolacji polegające na pominięciu separacji immunomagnetycznej oocyst powinno być uzupełnione staranną ekstrakcją.

Podsumowując można powiedzieć, że RFLP-PCR jest obiecującą techniką detekcji i identyfikacji oocyst *Cryptosporidium* w wodzie i 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 standaryzacja PCR, a zwłaszcza opracowanie skutecznej kontroli pozytywnej.

LITERATURA

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, 441-445, 2004

- 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), 851-856, 2007
- BEDNARSKA M., BAJER A. & SIŃSKI E. „Calves as a potential reservoir of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* sp.” *Ann. Agric. Environ. Med.*, 5, 135-138, 1998
- CAREY C.M., LEE H. & TREVORS J.T. „Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst” *Water Research*, 38, 818-862, 2004
- 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), 1017-1023, 2005
- 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), 3427-3432, 1999
- FAYER R., MORGAN U. & UPTON S.J. „Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification” *Int. J. Parasitol.*, 30, 1315-1322, 2000
- 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), 1898-1903, 2003
- 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), 4118-4128, 2004
- 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), 3844-3850, 1997
- 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), 3849-3855, 1995
- 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), 2505-2511, 2003
- 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-Środowisko*, 8-Ś, 113-124, 2004
- 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, 1-7, 1996
- 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, 161-167, 1994
- MAJEWSKA A.C., KOSIŃSKI Z., WERNER A., SULIMA P. & NOWOSAD P. „Pasożytnicze pierwotniaki jelitowe: nowe wodnopochoodne zagrożenie zdrowia publicznego”, *Wydanie II, Uniwersytet Warszawski*, 9-16, 2001
- MAJEWSKA A.C., SOLARCZYK P., TAMANG L. & GRACZYK T.K. „Equine *Cryptosporidium parvum* infections in western Poland” *Parasitol. Res.*, 93, 274-278, 2004
- MARSHALL M.M., NAUMOWITZ D., ORTEGA Y. & Sterling C.R. „Waterborne Protozoan Pathogens” *Clin. Microbiol. Rev.* 10(1), 67-85, 1997
- 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), 4183-4189, 2003
- 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, 1241-1247, 1999

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) , 3544-3545, 1998

SMITH H.V. & ROSE J.B. „Waterborne cryptosporidiosis: current status" *Parasitol. Today*, 14(1), 14-22, 1998

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) , 3742-3744, 2004

United States Environmental Protection Agency „Method 1622: „*Cryptosporidium* in Water by Filtration/IMS/FA", 2001, EPA-821-R-01-026

United States Environmental Protection Agency „Method 1623: „*Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA", 2001, EPA-821-R-01-025

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) , 4035-4039, 2004

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, 33-39, 2000

XIAO L., FAYER R „Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission" *Int. J. Parasitol.* 38(11), 1239-55, 2008

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, 3386-3391, 1999

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) , 1097-1101, 2001

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), 6495-6504, 2008