

OPTIMALIZACJA METODY WYKRYWANIA PIERWOTNIAKÓW PASOŻYTNICZYCH *CRYPTOSPORIDIUM* I *GIARDIA* W ŚRODOWISKU WODNYM PRZY ZASTOSOWANIU AUTOMATYCZNEJ STACJI PŁUCZĄCEJ FILTA-MAX XPRESS

OPTIMIZATION OF *CRYPTOSPORIDIUM* AND *GIARDIA* DETECTION IN WATER ENVIRONMENT USING AUTOMATIC ELUTION STATION FILTA-MAX XPRESS

Renata Matuszewska, Maciej Szczotko, Bożena Krogulska

Zakład Higieny Środowiska, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny, Warszawa

Słowa kluczowe: *Cryptosporidium*, *Giardia*, woda, metoda wykrywania, automatyczna stacja płuczka Filta-Max xpress
Key words: *Cryptosporidium*, *Giardia*, water, detection method, automatic elution station Filta-Max xpress

STRESZCZENIE

Wprowadzenie. Obecność pierwotniaków pasożytniczych w wodzie przeznaczonej do spożycia jest przeważnie następstwem niewłaściwie prowadzonych procesów jej uzdatniania. Aktualnie, w Polsce, rutynowe badania wody w kierunku wykrywania pierwotniaków z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia* nie są prowadzone.

Cel badań. Celem badań była optymalizacja metody wykrywania oocyst *Cryptosporidium* sp. i cyst *Giardia* sp. w próbkach wody powierzchniowej w oparciu o założenia metodyczne zawarte w normie ISO 15553:2006 i przy zastosowaniu automatycznej stacji płuczkiej Filta-Max xpress.

Material i metoda. Badania wstępne prowadzono na próbkach wody kontaminowanej oocytami i cystami szczepów referencyjnych *Cryptosporidium* sp. i *Giardia* sp. Dalsze badania prowadzono z zastosowaniem próbek środowiskowych wody pobranej z kilku ujęć wody powierzchniowej (21 próbek z Wisły i 8 próbek z Zalewu Zegrzyńskiego). próbki wody zagęszczano przy użyciu stacji Filta-Max xpress, a następnie oczyszczano je metodą separacji immunomagnetycznej. Cysty i oocysty barwiono za pomocą FITC i DAPI i prowadzono obserwacje mikroskopowe z wykorzystaniem mikroskopu epifluorescencyjnego.

Wyniki. Zastosowanie 9-cyklowego systemu płuczającego w badaniach fortyfikowanych próbek wody, pozwoliło na uzyskanie średniego odzysku oocyst *Cryptosporidium* w wysokości 60,6% i cyst *Giardia* w wysokości 36,1%. W próbkach środowiskowych wody pochodzącej z ujęć powierzchniowych wykazano obecność poszukiwanych pierwotniaków. Cysty *Giardia* wykryto we wszystkich badanych próbkach wody powierzchniowej w liczbie od 1,0/10 l do 4,5/10 l pochodzącej z ujęcia na Zalewie Zegrzyńskim i z ujęcia na rzece Wiśle w liczbie od 1,0/10 l do 38,9/10 l. Oocysty *Cryptosporidium* obecne były w 50% próbek wody powierzchniowej z ujęć Zalewu Zegrzyńskiego i 47,6% próbek z Wisły, a ich liczba w obu przypadkach była zbliżona i wynosiła od 0,5 do 2,5 oocyst/10 l. Badania potwierdziły, że zastosowana metoda jest właściwa do wykrywania obecności pierwotniaków pasożytniczych w wodzie. Jej efektywność, szczególnie w przypadku próbek o dużej zawartości substancji organicznych i zawiesin, zależy od przygotowanych podpróbek i zmniejszenia szybkości płukania filtrów.

Wnioski. Metoda wykrywania *Cryptosporidium* sp. i *Giardia* sp. z zastosowaniem automatycznej stacji płuczkiej Filta-Max xpress może być wykorzystywana w rutynowych badaniach oceny mikrobiologicznej jakości wody. Stwierdzenie obecności *Cryptosporidium* sp. i *Giardia* sp. w próbkach wody pochodzącej z ujęć wody powierzchniowej wskazuje na niebezpieczeństwo przedostawania się ich do wody przeznaczonej do spożycia, dlatego badania pierwotniaków pasożytniczych powinny być włączone do monitoringu wody.

ABSTRACT

Background. The presence of parasitic protozoa in drinking water is mostly a result of improperly maintained the water treatment process. Currently, in Poland the testing of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water as a part of routine monitoring of water is not perform.

Adres do korespondencji: Renata Matuszewska, Zakład Higieny Środowiska, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, tel. +48 22 54 21 374, e-mail: rmatuszewska@pzh.gov.pl

Objective. The aim of this study was the optimization of the method of *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water according to the main principles of standard ISO 15553:2006 and using Filta-Max xpress automatic elution station.

Material and method. Preliminary tests were performed on the samples contaminated with oocysts and cysts of reference strains of both parasitic protozoa. Further studies were carried out on environmental samples of surface water sampled directly from the intakes of water (21 samples from Vistula River and 8 samples from Zegrzynski Lake). Filtration process and samples volume reducing were performed using an automatic elution system Filta-Max xpress. Next, samples were purified during immunomagnetic separation process (IMS). Isolated cysts and oocysts were stained with FITC and DAPI and then the microscopic observation using an epifluorescence microscope was carried out.

Results. Recovery of parasite protozoa in all contaminated water samples after 9-cycles elution process applied was mean 60.6% for *Cryptosporidium* oocysts and 36.1% for *Giardia* cysts. Studies on the environmental surface water samples showed the presence of both parasitic protozoa. Number of detected *Giardia* cysts ranged from 1.0/10 L up to 4.5/10 L in samples from Zegrzynski Lake and from 1.0/10 L up to 38.9 /10 L in samples from Vistula River. *Cryptosporidium* oocysts were present in 50% of samples from the Zegrzynski Lake and in 47.6% of samples from the Vistula River, and their number in both cases was similar and ranged from 0.5 up to 2.5 oocyst/10 L. The results show that applied procedure is appropriate for detection the presence of parasitic protozoan in water, but when water contains much amount of inorganic matter and suspended solids test method have to be modified like subsamples preparation and filtration process speed reduction.

Conclusions. The applied method with the modification using Filta-Max xpress system can be useful for the routine monitoring of water. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in all samples of water taken from the intakes of surface water shows the possibility of transferring of the protozoan cysts into the water intended for the consumption, therefore the testing of *Cryptosporidium* and *Giardia* should be included into the monitoring of water.

WSTĘP

Niektóre pierwotniaki pasożytnicze, w tym z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia*, mogą być przenoszone za pośrednictwem wody, co powoduje, że są jednym z czynników mogących wywoływać tzw. choroby wodozależne u ludzi [14, 16, 24, 25, 34]. Znaczenie tych organizmów jako czynników etiologicznych zarażeń pasożytniczych wzrosło pod koniec lat 70-tych wraz ze zwiększeniem liczby osób z zespołami obniżonej odporności m. in. wśród ludzi zarażonych wirusem HIV, chorych na nowotwory, po chemioterapii czy po zabiegach transplantacyjnych [1, 15, 21, 26, 32, 33, 34]. Wzrost znaczenia epidemiologicznego pierwotniaków pasożytniczych spowodował, że w latach 90. w krajach Europy Zachodniej zaczęto wskazywać na potrzebę oznaczania obecności tych organizmów w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi. Uznano, że pierwotniaki pasożytnicze powinny być istotnym dodatkowym elementem kontroli i nadzoru jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi, obok mikroorganizmów wskaźnikowych takich jak bakterie grupy coli, *Escherichia coli*, enterokoki czy clostridia redukujące siarczyny [8, 9, 17, 28, 32, 34]. Dużą przeszkodą w wprowadzeniu badań rutynowych w tym kierunku, był brak odpowiedniej metody. Największym problemem, z którymi musiały się zmierzyć laboratoria wykonujące badania w kierunku wykrywania obecności i oznaczania pierwotniaków pasożytniczych, stanowiło zagęszczenie próbki wody oraz uzyskanie jak największego odzysku oocyst i cyst tych organizmów, gdyż ich koncentracja w próbkach środowiskowych może być stosunkowo nieduża [3, 22]. W latach 1996-1998 Envi-

ronmental Protection Agency (EPA) opublikowała dwie metody oznaczania pierwotniaków pasożytniczych, które zostały zwalidowane pod koniec lat 90., a w 2001 i 2005 roku przeszły pozytywną weryfikację [30, 31]. W roku 2006 ukazała się norma ISO 15553:2006 Water quality – Isolation and identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water, bazująca na wcześniej opublikowanych metodach EPA i prezentująca założenia metodyczne wykrywania oraz izolacji form przetrwanych pierwotniaków pasożytniczych [11]. Metoda wg normy ISO, podobnie jak metody wg EPA, obejmuje trzy etapy badania: 1) zagęszczanie oparte na technice filtracji (FM), 2) oczyszczanie - separacja immunomagnetyczna (IMS), 3) wykrywanie pierwotniaków techniką immunofluorescencji (FA).

W rozporządzeniu Ministra Zdrowia w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi [23], wskazana jest konieczność wykonywania badań w kierunku *Cryptosporidium* sp. w wodzie pochodzącej z ujęć powierzchniowych lub mieszanych, w przypadku gdy w wodzie uzdatnionej, przeznaczonej do spożycia, zostanie wykryta obecność *Clostridium perfringens*. Jednak badania w tym zakresie, w ramach rutynowej kontroli wody przeznaczonej do spożycia nie są prowadzone przez służby sanitarnej w Polsce.

Celem badań była optymalizacja metody wykrywania oocyt *Cryptosporidium* i cyst *Giardia* ze środowiska wodnego przy zastosowaniu automatycznej stacji płuczającej Filta-Max xpress, do wyplukiwania pod ciśnieniem zatrzymanych na filtrach cząstek stałych, w tym poszukiwanych pierwotniaków oraz ocena przydatności tej metody do stosowania w badaniach rutynowych.

MATERIAŁ I METODA

Badania na materiałach referencyjnych

Próbki wody wodociągowej o objętości 20 l fortyfikowano referencyjną zawiesiną oocyst *Cryptosporidium* ($99 \pm 1,4$) i cyst *Giardia* ($99 \pm 1,6$) - Easy Seed (f-my BTF) a następnie badano wg założeń normy ISO 15553:2006. Wykonano oznaczenia 20 próbek kontaminowanych referencyjną zawiesiną oocyt/cyst pierwotniaków pasożytniczych.

Zagęszczanie: filtracja, elucja, wirowanie

Przygotowane próbki poddawano zagęszczaniu, poprzez filtrację przez specjalne filtry z poliuretanu o średnicy porów 1 μm , z prędkością ok. 2 l/min. Następnie, organizmy zatrzymane na filtrze były wypłukiwane roztworem buforu fosforanowego (PBS) z dodatkiem Tween 20, w automatycznej stacji płuczącej Filta-Max xpress (f-my IDEXX). Uzyskany w ten sposób eluat (około 400 ml) poddawano następnie wirowaniu przy względnej sile odśrodkowej 2010 x g, (2900 obrotów / min) w stożkowych gilzach, w wyniku czego pierwotniaki pasożytnicze wraz z innymi cząstkami stałymi osadzone były w dolnej, wyprofilowanej części gilzy. Nadmiar supernatantu usuwano pozostawiając próbkę o objętości około 10 ml.

Oczyszczanie: metoda separacji immunomagnetycznej (IMS)

Technika IMS opiera się na zdolności tworzenia kompleksów antygen - przeciwciała, które oddzielane są od cząstek stałych przy pomocy pola magnetycznego i przemywania. Zagęszczona próbka, w postaci osadu, przenoszona jest do specjalnie profilowanych probówek (f-my DYNAL) przeznaczonych do separacji immunomagnetycznej. Do badanej próbki dodawane są specyficzne zestawy buforów oraz przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom zlokalizowanym w strukturach zewnętrznych oocyst *Cryptosporidium* i cyst *Giardia* (GV Combo f-my Invitrogen). W trakcie mieszania (1 godz. - 1,5 godz.) powstają kompleksy przeciwciała - cysta/oocysta, które następnie w polu magnetycznym oddzielane są z mieszaniny. Kolejne etapy polegają na dalszym oczyszczaniu utworzonych kompleksów przy stopniowym zmniejszaniu objętości próbki. Kompleksy rozbijano zakwaszając środowisko reakcji, a uzyskaną 50 μl próbkę umieszczano na szkiełku podstawowym w celu jej wybarwienia oraz wykonania preparatu mikroskopowego.

Wykrywanie – metoda epifluorecencji i obserwacji mikroskopowych

Obserwacje mikroskopowe pozwalają na potwierdzenie obecności i określenie liczby pierwotniaków

z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia* w badanej próbce wody. Preparaty mikroskopowe utrwalano za pomocą alkoholu etylowego, a następnie barwiono dwuetapowo, :

- FITC (f-my BTF)- barwnik fluorescencyjny, wiążący się z zewnętrznymi strukturami cyst/oocyst, obserwowana jest zielona fluorescencja w świetle o dł. fali 480 nm (światło niebieskie)
- DAPI (f-my Sigma)- barwnik wykazujący silne powinowactwo do DNA, szczególnie do regionów bogatych w wiązania A-T; widoczny wyznakowany materiał jądrowy, charakterystyczny dla oznaczanych organizmów w świetle o dł. fali 350 nm (UV).

Obserwacje preparatu i liczenie oocyst *Cryptosporidium* i cyst *Giardia* wykonywano pod mikroskopem epifluorescencyjnym (NIKON) zaopatrzonym w filtr UV oraz filtr światła niebieskiego. Dodatkowo wykonano obserwację specyficznych struktur komórkowych badanych organizmów z zastosowaniem kontrastu fazowego (DIC) w celu potwierdzenia obecności izolowanych pierwotniaków pasożytniczych.

Badania środowiskowe próbek wody powierzchniowej

Badania w kierunku wykrywania oocyst i cyst pierwotniaków pasożytniczych z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia* na próbkach środowiskowych wykonano według założeń metodycznych zawartych w normie ISO 15553:2006 i zastosowaniu na etapie zagęszczania automatycznej stacji płuczącej Filta-Max xpress. Do badań wybrano 2 ujęcia powierzchniowe wody przeznaczonej do spożycia, różniące się między sobą jakością oraz rodzajem ujmowanej wody. Próbki o objętości 20 l wody pobrano z ujęć zlokalizowanych na rzece Wiśle (21 próbek) i Zalewie Zegrzyńskim (8 próbek). Charakter próbek środowiskowych, na których prowadzono badania, a szczególnie duża ilość cząstek stałych zawieszonych w wodzie (rzeka Wisła), wymusił wprowadzenie zmian w stosunku do wcześniej prowadzonych badań na próbkach fortyfikowanych. Na etapie filtracji zmniejszono prędkość filtracji w zakresie 1,2-1,5 l/min, co usprawniło proces oraz w przypadku braku możliwości przefiltrowania całej próbki spowodowanym zapchaniem się porów filtra, dzielono ją na mniejsze podpróbki. Kolejna zmiana dotyczyła etapu po wirowaniu, kiedy to osad dzielony był na mniejsze podpróbki, które poddawano separacji immunomagnetycznej. W przypadku próbek o dużej zawartości osadu, poddanie jej w całości immunomagnetycznej separacji uniemożliwiało prawidłowe wyznakowanie oocyt/cyst pierwotniaków ze względu na interferencje tła (dane niepublikowane). Powyższe modyfikacje miały na celu zminimalizowanie wpływu krytycznych dla badania etapów (filtracja, IMS), które mogły spowodować obniżenie odzysku, a tym samym skuteczności wykrycia pierwotniaków pasożytniczych z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia* w badanych próbkach.

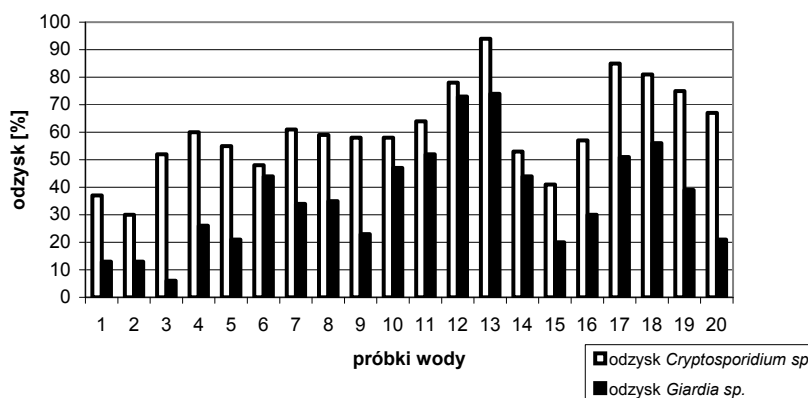
WYNIKI I Dyskusja

Badania wstępne, wykonane na 20 próbkach fortyfikowanych, pozwoliły na określenie odzysku oocyst *Cryptosporidium* i cyst *Giardia*. Próbkę wody były filtrowane przez poliuretanowe filtry zamknięte w specjalnych kapsułach, a proces elucji prowadzony był w automatycznej stacji płuczącej Filta-Max xpress, która pozwala na płukanie filtra w 9 cyklach. W przypadku oocyst *Cryptosporidium* sp. stwierdzono odzysk w zakresie od 30% do 94% (średnio 60,6%). Dla cyst *Giardia* sp. odnotowany odzysk był mniejszy i wynosił od 6% do 74% (średnio 36,1%). Duże wahania w odzysku wykrywanych pierwotniaków mogą być spowodowane, wieloetapową obróbką badanej próbki i związanymi z nią stratami. Wyniki badań odzysku przedstawiono na rycinie 1.

Należy podkreślić, że do połowy lat 90. tych metody stosowane do wykrywania pierwotniaków pasożytniczych w wodzie były mało precyzyjne i bardzo pracochłonne. Charakteryzowały się niskim odzyskiem, a badania dawały dużo wyników fałszywych zarówno pozytywnie jak i negatywnie. Najważniejsze zmiany zachodzące podczas udoskonalania tych metod, które wpłynęły na poprawę ich sprawności, dotyczyły m.in. procesu filtracji oraz elucji [35]. Wykazano, że próbki powinny być filtrowane z prędkością nie większą niż 2 l/min., gdyż zwiększenie prędkości może powodować nierównomierny przepływ wody przez kapsułę filtra, co znacznie zmniejsza wydajność procesu. Na wielkość odzysku oocyst/cyst z próbki ma również wpływ proces elucji. Badania wykazały, że każda dodatkowa elucja zwiększa odzysk o 5-15% dla *Giardia* i o 2-3% dla *Cryptosporidium* [13]. W przypadku zastosowania systemu elucji Filta-Max xpress, dla próbek o objętości 10-20 litrów średni odzysk oocyst *Cryptosporidium* wynosił 88,8% [19, 20]. Na etapie zagęszczania próbek, na odzysk oocyst/cyst mają również wpływ warunki wirowania eluatu. Duża frakcja oocyst/cyst pozostaje w su-

pernatancie po wirowaniu przy niskiej względnej sile odśrodkowej (RCF), a wzrost RCF wpływa na zwiększenie odzysku - zmniejszenie strat oocyst/cyst. Przy wzroście RCF od 1040 x g do 6700 x g zaobserwowano spadek strat z 25% do 11% dla *Giardia* i z 32% do 12% dla *Cryptosporidium* [13]. Na poprawę efektywności wykrywania pierwotniaków pasożytniczych w próbkach środowiskowych miało również wpływ zastosowanie techniki IMS. Dodanie znakowanych przeciwciał do badanej próbki umożliwiało identyfikację oocyst/cyst [19, 20]. Powstałe w ten sposób kompleksy pozwalają na izolację oocyst *Cryptosporidium* sp. i cyst *Giardia* sp. z dużej ilości osadów nieorganicznych obecnych w próbce środowiskowej. Przy czym na przebieg tego etapu badania ma kluczowe znaczenie usprawnienie wcześniejszych etapów oraz prowadzenie ich w odpowiednich warunkach. Zagęszczenie próbki poprzez filtrację, elucję i wirowanie, poprawiło skuteczne przyłączenie przeciwciał do poszukiwanych obiektów, a tym samym zredukowało wyniki fałszywie pozytywne i reakcje niespecyficzne [19, 20]. Na etapie IMS istotne znaczenie ma precyzyjne przeniesienie osadu uzyskanego w trakcie wirowania do próbek i równomierne wymieszanie go z buforami zawierającymi znakowane przeciwciała. Ostatnim punktem krytycznym tej metody badawczej, który może wpływać na ostateczny wynik analizy, jest przygotowanie i barwienie preparatu mikroskopowego. Poszczególne czynności wymagają dużej precyzji ze względu na małe objętości supernatantu (do 50 µl) zawierającego izolowane wcześniej komórki pierwotniaków pasożytniczych.

Określenie i analiza wysokości odzysku jest istotnym elementem pozwalającym na ocenę sprawności metody badawczej przed jej zastosowaniem do badań rutynowych. W piśmiennictwie jest wiele publikacji, które prezentują efektywność izolacji pierwotniaków pasożytniczych w oparciu o próbki kontaminowane materiałami wzorcowymi. W zależności od rodzaju zastosowanej metody i rodzaju próbek odzysk wahał się w zakresie od 0% do 43% dla oocyst *Cryptosporidium*



Ryc. 1 Wyniki odzysku form przetrwanych pierwotniaków pasożytniczych z próbek fortyfikowanych
Recovery of protozoan oocysts and cysts from contaminated samples

sp. i od 0% do 90% dla cyst *Giardia* sp. *LeChevallier* i wsp. [12] przeprowadzili wnikliwą analizę stosowanych metod opartych na immunofluorescencji i doszli do wniosku, że mają one wspólną charakterystykę w zakresie uzyskiwanych wyników. Niezależnie od stosowanej metody badawczej, sprzętu i odczynników laboratoryjnych, liczba oznaczanych cyst i oocyst jest zawsze mniejsza od liczby wzorcowej, którą próbki były kontaminowane. Straty w odzysku stwierdzano najczęściej na etapie zagęszczania próbki, włącznie z procesem filtracji oraz podczas separacji immunomagnetycznej [6, 7]. Z tego powodu najwięcej modyfikacji metody, mających na celu zminimalizowanie strat podczas izolacji pierwotniaków, dotyczy tych właśnie etapów badań. W 2003 r. przeprowadzono dokładną analizę skuteczności obu metod badawczych: 1622 i 1623 proponowanych przez EPA [18, 19, 20]. Badano odzysk obu metod z użyciem fortyfikowanych próbek wody surowej i wody uzdatnionej (wodociągowej). W przypadku wody uzdatnionej odzysk w stosunku do oocyst i cyst wynosił $48.4 \pm 11,8\%$. W przypadku wody surowej odzysk w przypadku oocyst *Cryptosporidium* wynosił od 19,5% do 54,5%, natomiast w przypadku cyst *Giardia* wynosił 46,7% do 70%. Prowadzone porównawcze badania międzylaboratoryjne w USA i Kanadzie, wykazały dużą różnicę w wynikach uzyskanych przez poszczególne laboratoria. Odzyski w oznaczeniach *Cryptosporidium* wynosił od 0 do 43%, natomiast *Giardia* od 0 do 90% [5]. Huang i wsp. [10] wprowadzili zmiany w roztworach stosowanych podczas oczyszczania cyst i oocyst pierwotniaków polegające na zastosowaniu zamiast buforu PBS wodnego roztworu sacharozy, co wpłynęło na wzrost odzysku tych mikroorganizmów w próbkach fortyfikowanych. Znaczne różnice wyników badań oraz stosunkowo niski odzysk metody prezentowany przez laboratoria referencyjne świadczą o tym, że metoda izolacji pierwotniaków pasożytniczych może narażać wiele problemów. Wieloetapowość metody oraz występowanie kilku punktów krytycznych jest powodem znacznych strat na etapie izolacji, co może skutkować uzyskiwaniem przez laboratoria wyników fałszywie ujemnych.

W przeprowadzonych badaniach środowiskowych, w większości badanych próbek wody powierzchniowej, pobranych na ujęciach wody przeznaczonej do spożycia, stwierdzono obecność pierwotniaków pasożytniczych z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia*. Cysty *Giardia* sp. występowały częściej i w liczbie znacznie przewyższającej oznaczaną liczbę oocyst *Cryptosporidium* sp. W próbkach wody pobranej z Wisły obecność pierwotniaków pasożytniczych z rodzaju *Giardia* sp. stwierdzono, we wszystkich badanych próbkach wody (100%), natomiast oocysty *Cryptosporidium* wykryto tylko w 48% próbek. Wyższej liczbie pierwotniaków w wodzie sprzyja duża liczba zawiesiny organicznej

i nieorganicznej, a także przedostawanie się do wód powierzchniowych zanieczyszczeń wynikających z bytowej lub rolniczej działalności człowieka, w tym fekalnych zanieczyszczeń kanalizacyjnych [2, 12, 28]. Dlatego też wyższą koncentrację oocyst/cyst pierwotniaków pasożytniczych odnotowano w przypadku próbek wody pobranej z Wisły podczas trwania wysokiego stanu wody. Wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Występowanie oocyst *Cryptosporidium* i cyst *Giardia* w próbkach wody pobranych z Wisły podczas wysokiego i niskiego stanu wody
Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water samples from Vistula River during high and low water level

L.p.	Liczba oocyst/cyst / litr podczas wysokiego stanu wody		Liczba oocyst/cyst / litr podczas niskiego stanu wody	
	<i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>Giardia</i> sp.	<i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>Giardia</i> sp.
1.	0	1,10	0,05	0,55
2.	0,25	0,25	0	0,35
3.	0,05	1,00	0	0,10
4.	0,11	1,33	0	0,20
5.	0	0,89	0	0,30
6.	0,11	3,56	0	0,70
7.	0,11	1,44	0,15	0,15
8.	0,11	2,33	0	0,30
9.	0	0,89	0,05	0,20
10.	0	3,89	0	0,35
11.	0,11	1,00	---	---

Największą liczbę pierwotniaków odnotowano w próbkach pobranych podczas wysokiego stanu wody, wywołanego falą powodziową. We wszystkich próbkach wody pobranej w tym czasie stwierdzono obecność cyst *Giardia* sp. w liczbie od 0,25 cyst/l do 3,89 cyst/l. Pierwotniaki z rodzaju *Cryptosporidium* obecne były w blisko 64% badanych próbek w liczbie od 0,05 oocyst/l do 0,25 oocyst/l. W próbkach wody pobranych po obniżeniu się stanu wody rzeki Wisły wykrywano mniejszą liczbę oocyst/cyst pierwotniaków pasożytniczych. Obecność oocyst *Cryptosporidium* sp. stwierdzono tylko w 33% badanych próbkach wody, w liczbie od 0,05 oocyst/l do 0,15 oocyst/l. Wszystkie próbki zawierały cysty *Giardia* sp. (od 0,1 cyst/l do 0,7 cyst/l), podobnie jak w przypadku próbek pobieranych podczas wysokiego stanu wody. Znacznie wyższe wartości uzyskane podczas wysokiego stanu rzeki związane były z dużym ładunkiem organicznym, który przedostał się do jej wód wraz z wodami opadowymi spływającymi z pól w pobliżu Wisły i jej dopływów. Dodatkowym elementem wpływającym na zwiększenie koncentracji pierwotniaków pasożytniczych w badanych próbkach wody była zmiana nasilenia nurtu rzeki, który spowodował poruszenie się osadów dennych, zawierających

skumulowane cząstki stałe, w tym cysty i oocysty pierwotniaków. Po obniżeniu się poziomu wody i zmniejszeniu prędkości nurtu, wykrywana liczba pierwotniaków pasożytniczych w próbkach wody z Wisły uległa obniżeniu. Obecność oocyst *Cryptosporidium* sp. w próbkach wody pobranych z Wisły wykazały również badania przeprowadzone przez *Sińskiego* i wsp. [25], w których zastosowano manualną stację Filta-Max, o mniejszej liczbie cykli filtracji.

Również w próbkach wody pobranej z ujęcia opartego na Zalewie Zegrzyńskim stwierdzono obecność pierwotniaków pasożytniczych. Wszystkie próbki z tego ujęcia zawierały cysty *Giardia* w liczbie od 0,10 cysty/l do 0,45 cysty/l. Oocysty *Cryptosporidium* stwierdzono tylko w 50% badanych próbek, a ich liczba wahała się od 0,05 oocysty/l do 0,20 oocysty/l. Wyniki przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Występowanie oocyst *Cryptosporidium* i cyst *Giardia* w próbkach wody pobranych na Zalewie Zegrzyńskim
Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water samples from Zegrzyński Lake

L.p.	Liczba oocyst/cyst / litr	
	oocysty <i>Cryptosporidium</i> sp.	cysty <i>Giardia</i> sp.
1.	0	0,25
2.	0	0,25
3.	0	0,15
4.	0,05	0,05
5.	0,10	0,30
6.	0,20	0,45
7.	0,05	0,20
8.	0	0,10

Istotnym elementem, charakterystycznym dla ujęcia na Zalewie Zegrzyńskim jest opaskowa kanalizacja ściekowa w miejscowościach leżących w jego bezpośrednim sąsiedztwie. Zmniejsza to prawdopodobieństwo przedostawania się nieczystości pochodzących z bytowej działalności człowieka do wód Zalewu, a tym samym zmniejsza prawdopodobieństwo występowania w tych wodach pierwotniaków pasożytniczych. Jednocześnie próbki pochodzące z tego ujęcia wykazywały zdecydowanie mniejszą mętność niż próbki pobierane z rzeki Wisły, zarówno przy wysokim jak i niskim stanie wody. Z tego też powodu próbek pobranych z Zalewu Zegrzyńskiego nie dzielono, zarówno na etapie filtracji jak i późniejszych etapach badania. Jak podają niektórzy autorzy istnieje korelacja między mętnością, a wykrywaniem pierwotniaków pasożytniczych w wodzie. Dane z piśmiennictwa wskazują, że przy mętności 0,5 NTU uzyskuje się największy odzysk oocyst *Cryptosporidium* [28, 29]. Powyżej 0,5 NTU maleje odzysk oocyst szczególnie w zakresie 10-40 NTU. Zostało to potwierdzone zarówno dla badań standardowych opartych na założeniach normy ISO 15553:2006 oraz metod

EPA, jak i metod wykorzystujących techniki biologii molekularnej [4, 27].

W przypadku zastosowanej metody wykrywania i identyfikacji oocyt/cyst pierwotniaków pasożytniczych w próbkach środowiskowych z użyciem automatycznej stacji do elucji próbek Filta-Max xpress, uzyskane wyniki badań wskazują, że zastosowana metoda jest odpowiednia do badań rutynowych próbek środowiskowych wody. Jednocześnie skuteczność wykrywania obecności pierwotniaków pasożytniczych można zwiększyć, w przypadku próbek bogatych w osady, zawiesiny organiczne itp., dzieląc badany materiał na podpróbki, na każdym z istotnych etapów badania.

WNIOSKI

1. Wykazano, że odzysk metody wykrywania *Cryptosporidium* i *Giardia* przy użyciu automatycznej stacji filtracyjnej Filta-Max xpress jest odpowiedni, a zastosowana metoda może być wykorzystana do rutynowej kontroli wód powierzchniowych, na których usytuowane są ujęcia wody przeznaczonej do spożycia.
2. Zastosowanie 9-krotnego procesu elucji, przygotowanie podróbek oraz zmniejszenie szybkości płukania filtrów podniosły efektywność wykrywania pierwotniaków pasożytniczych w próbkach wody.
3. Stwierdzenie obecności *Cryptosporidium* sp. i *Giardia* sp. w wodzie z ujęć wody powierzchniowej wskazuje na istnienie niebezpieczeństwa przedostawania się ich do wody przeznaczonej do spożycia. Uzasadniona jest zatem konieczność włączenia tych badań do monitoringu wody.

PIŚMIENNICTWO

1. Barwick R.S., Levy D.A., Craun G.F., Beach M.J., Calderon R.L.: Surveillance of waterborne disease outbreaks – United States. 1997-1998. MMWR 2000, 49, 1-35
2. Bukhari Z.R., Mccuin M., Fricker C. R., Clancy J. L.: Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* from source water samples of various turbidities. Appl. Environ. Microbiol. 1998, 64, 4495–4499
3. Carey C.M., Lee H., Trevors J.T.: Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. Wat. Res. 2004, 38, 818-862
4. Chih-Yuan Chang, Chihpin Huang, Jill R. Pan And Bi-Ju Wu.: Modification of immunomagnetic separation procedures for analysis of *Cryptosporidium* at spiked oocysts and turbid sample conditions. J. Environ. Eng. Management. 2007, 17, 333-338
5. Clancy J.L.: Performance evaluation of Canadian laboratories-recovery and enumeration of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts from water samples. A report

- submitted to Health Canada by Clancy Environmental Consultants, Inc., St. Albans, VT, 1996.
6. Feng, Y.Y., Ong, S.L., Hu, J.Y., Song, L.F., Tan, X.L.: Effect of particles on the recovery of *Cryptosporidium* oocysts from source water samples of various turbidities. Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69, 1898-1903
 7. Francy D.S., Simmons O.D., Ware M.W., Granger E.J., Sobsey M.D., Schaefer F.W.: Effects of seeding procedures and water quality on recovery of *Cryptosporidium* oocysts from stream water by using U.S. Environmental Protection Agency Method 1623. Appl. Environ. Microbiol. 2004, 70, 4118-4128
 8. Harwood V.J., Levine A.D., Scott T.M., Chivukula V., Lukasik J., Farrah S.R., Rose J.B.: Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. Appl. Environ. Microbiol. 2005, 71, 3163 – 3170
 9. Horman A., Rimhanen-Finne R., Maunula L., Bonsdorff C.H., Torvela N., Heikinheimo A., Hanninen M.L.: *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., Noroviruses and indicators organisms in surface water in Southwestern Finland 2000-2001. Appl. Environ. Microbiol. 2004, 70, 87-95
 10. Huang L, An CX, Zhang SM, Ning CS, Zhang LX.: Modified method for purifying *Cryptosporidium* oocysts. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi. 2010, 28, 79-80
 11. ISO 15553:2006 Water quality – Isolation and identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water
 12. Lechevallier M. W., Norton W. D., Lee R. G.: Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. Appl. Environ. Microbiol. 1991, 57, 2610-2616
 13. LeChevallier, M.W., Norton, W.D., Siegel, J.E., Abbaszadegan, M.: Evaluation of the immunofluorescence procedure for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. Appl. Environ. Microbiol. 1995, 61, 690-697
 14. Majewska A.C., Kosinski Z., Werner A., Sulima P., Nowosad P.: Pasożytnicze pierwotniaki jelitowe: nowe wodnopochoodne zagrożenia zdrowia publicznego. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego 2001, Wyd. II Warszawa
 15. Marshall M.M., Naumovitz D., Ortega Y., Sterling Ch.R.: Waterborne Protozoan Pathogens. Clin. Microbiol. Rev. 1997, 10, 67-85
 16. Matuszewska R.: Pierwotniaki pasożytnicze z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia*. Część I. Występowanie w środowisku wodnym i zagrożenia zdrowotne Roczn. Panstw. Zakł. Hig. 2007, 58,3,569-577
 17. Matuszewska R., Szcotko M., Bartosik M., Krogulska B.: Występowanie pierwotniaków z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia* w wodzie powierzchniowej ujmowanej przez wybrane zakłady wodociągowe. Ochrona Środowiska 2011, 33, 3, 67-69
 18. McCuin R.M., Clancy J.L.: Methods the recovery, isolation and detection of *Cryptosporidium* oocyst in wastewaters. J. Microbiol. Method. 2005, 63, 73-88
 19. McCuin R. M., Clancy J. L.: Modifications to United States Environmental Protection Agency Methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69, 267-274
 20. McCuin, R.M. Bukhari Z., Sobrinho J., Clancy J.L.: Recovery of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from source water concentrates using immunomagnetic separation. J. Microbiol. Methods 2001, 45, 69–76
 21. Meisel J.L., Perera D.R., Meligro C., Rubin C.E.: Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. Gastroenterology 1976, 70, 1156
 22. Quintero-Betancourt W., Gennaccaro A.L., Scott T.M., Rose J.B.: Assesment of methods for detection of infectious *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in reclaimed effluents. Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69, 5380-5388
 23. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. Dz. U. 2007, Nr 61, poz. 417. z późn. zm.
 24. Siński E.: Environmental contamination with protozoa parasite infective stages: biology and risk assessment. Acta Microbiol. Polon. 2003, 52 (Suppl.) , 97-107.
 25. Siński E., Bajer A., Toczyłowska B.: Ryzyko skażenia wód naturalnych w Polsce pasożytami *Cryptosporidium* spp.. Mat. Konf. “Aktualne zagadnienia w uzdatnianiu i dystrybucji wody” Politechnika Śląska. Szczyrk 2007, ss.233-240
 26. Smith H. V.: Environmental aspects of *Cryptosporidium* species: a review. J. R. Soc. Med. 1990, 83, 629–631
 27. Sturbaum G.D., Klonicki P.T., Marshall M.M., Jost B.H., Clay B.L., Charles R.: Immunomagnetic separation (IMS)-fluorescent antibody detection and IMS-PCR detection of seeded *Cryptosporidium parvum* oocysts in natural waters and their limitations. Sterling Appl. Environ. Microbiol. 2002, 68, 2991–2996
 28. Toczyłowska B.: Rola wskaźników pomocniczych w ocenie zagrożenia zdrowia ludzi obecnością oocyst *Cryptosporidium* w wodzie. Ochrona Środowiska 2007, 29, 3, 25-28.
 29. Toczyłowska B.: Skuteczność uzdatniania wody pod kątem ochrony zdrowia ludzi przed pasożytami *Cryptosporidium*. Instal 2011, 12, 56-60
 30. US EPA Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration /IMS/FA. EPA 2005
 31. US EPA Methods 1622: *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA.EPA 2005
 32. WHO Guidelines for drinking water quality. WHO Geneva 2004, 1st addendum to 3rd ed. Vol.1,
 33. WHO Guidelines for drinking water quality. WHO Geneva 2011, 4th ed.
 34. WHO Risk assessment of *Cryptosporidium* in drinking-water. WHO Geneva 2009
 35. Wohlsen T., Bates J., Gray B., Katouli M.: Evaluation of five membrane filtration methods for recovery of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from water samples. Appl. Environ. Microbiol. 2004, 70, 2318-2322.

Otrzymano: 09.04.2012

Zaakceptowano do druku: 03.09.2012

