

## Biologia, epidemiologia i diagnostyka chorobotwórczych pierwotniaków przenoszonych za pośrednictwem wody

## Biology, epidemiology and diagnostics of pathogenic waterborne protozoan parasites

Agata Leońska-Duniec, Małgorzata Adamska

Katedra Genetyki, Uniwersytet Szczeciński, Al. Piastów 40B, 71-065 Szczecin; E-mail: agataleonska@op.pl

**ABSTRACT.** *Cryptosporidium*, *Giardia intestinalis*, *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli* and microsporidia are the most important and common pathogens found in humans and many other species of vertebrates. In humans, mainly in immunocompromised patients, children, pregnant women and elderly people, they are the most frequently identified protozoan parasites causing gastrointestinal disease worldwide. These pathogens have several transmission routes, including anthroponotic and zoonotic transmission. What is more, in many cases of epidemics caused by mentioned pathogens the major cause of infection was contaminated with these organisms water and food. In spite of many existing regulations of clearing and making use of drinking water supplies and recreational water, cosmopolitan protozoan parasites are still the danger of public health. These organisms are responsible for many waterborne outbreaks worldwide. Light microscopy and immunofluorescence assay have been used to identify these organisms in most laboratories. However, these traditional techniques have major limitations in the specific diagnosis, these methods are not sensitive enough to detect cysts or oocysts in environmental samples, so the new molecular tools must be applied. Recently, PCR-based techniques have been developed for detection and genetic characterization of the different species and population variants of protozoan parasites is central to the prevention, surveillance and control of gastrointestinal diseases. In this review were characterized biology, epidemiology and the progress in technology for detection and surveillance of the most important waterborne protozoan parasites.

**Key words:** protozoan parasites, biology, epidemiology, methods for detection

### Wstęp

Woda jest głównym źródłem przenoszenia pasożytniczych pierwotniaków jelitowych, które ze względu na chorobotwórczość stanowią potencjalne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Do niedawna uważano, że obowiązujące procesy uzdatniania wody przeznaczonej do spożycia w zadowalającym stopniu eliminują obecność tych patogenów, tymczasem formy inwazyjne większości pierwotniaków posiadają bardzo wysoką oporność na rutynowo stosowane środki chemiczne [1,2]. W związku z tym na świecie stale rośnie liczba epidemii chorób wywołanych przez te patogeny, związanych z korzystaniem zarówno z wody pitnej, jak i ze zbiorników rekreacyjnych. Ze względu na starzenie się wielu

społeczeństw oraz rosnącą liczbę osób z wrodzonym lub z nabytym obniżeniem odporności (np. na skutek infekcji wirusem HIV, po transplantacji lub poddanych chemioterapii przeciwnowotworowej) rośnie rola pierwotniaków, które mogą być przyczyną infekcji zagrażających życiu. Co więcej, zmiana trybu życia powodująca wzrost liczby osób podróżujących oraz żyjących się w tzw. punktach żywienia zbiorowego, nie zawsze przestrzegających zasad higieny, również sprzyja rozprzestrzenianiu chorób pierwotniaczych [3].

Do dnia dzisiejszego największą epidemię kryptosporydiozy odnotowano w Milwaukee (USA) wiosną 1993 roku, gdzie przyczyną zarażenia ludności było zanieczyszczenie ujęcia wodnego na jeziorze Michigan ściekami komunalnymi zawierają-

cymi oocysty *Cryptosporidium parvum* [4]. Tragedia ta przyczyniła się do ogólnoświatowego zainteresowania lekarzy, parazytologów, a także opinii publicznej zagadnieniem wodnopochoodnych epidemii wywołanych przez pierwotniaki [1,3].

Wykrywanie *Cryptosporidium*, uznawanego za patogen wskaźnikowy dla celów oszacowania obecności innych pierwotniaków przenoszonych przez wodę, zostało zaliczone do priorytetów ochrony zdrowia publicznego na świecie. Znalazło to odzwierciedlenie w zaleceniach Światowej Organizacji Zdrowia [5] oraz dyrektywach Unii Europejskiej [6,7]. Pomimo realnego zagrożenia ze strony tych patogenów jedynie Stany Zjednoczone [8], Wielka Brytania [9] i Irlandia [10] wprowadziły przepisy dotyczące tego zagadnienia. Badania prób wody przeprowadzone w Polsce wykazały, że na terenie kraju istnieje realne zagrożenie zarażeniem pierwotniakami ze względu na znaczny stopień skażenia środowiska tymi patogenami [1,11–13]. Znaczenie tego problemu doceniono wprowadzając do rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 (DzU nr 61, poz. 417) w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi wytyczną, żeby w przypadku stwierdzenia obecności w wodzie bakterii *Clostridium perfringens* przebadać daną próbę także w kierunku obecności pierwotniaków pasożytniczych. Nie określono jednak sposobu badania wody oraz ilości form inwazyjnych w wodzie pitnej stanowiącej zagrożenie zdrowia publicznego [2].

Celem prezentowanej pracy jest scharakteryzowanie biologii, epidemiologii oraz diagnostyki najczęściej spotykanych w naszej strefie klimatycznej pasożytniczych pierwotniaków jelitowych przenoszonych za pośrednictwem wody: *Cryptosporidium* sp., *Giardia intestinalis*, *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli* oraz mikrosporidia.

### ***Cryptosporidium***

W 1910 roku, Tyzzer zaproponował nazwę *Cryptosporidium* dla pasożytniczego pierwotniaka należącego do rzędu Coccidia, którego wyizolował z układu pokarmowego myszy laboratoryjnej. Dopiero w 1976 roku dwa niezależne zespoły zaobserwowały korelacje między występowaniem tego patogenu u ludzi i przewlekłymi biegunkami [14,15]. Od tego czasu opisano występowanie u ryb, gadów, ptaków i ssaków ponad dwudziestu gatunków *Cryptosporidium* [16,17], jednak oficjalnie wyróżnia się szesnaście gatunków i 33 genotypy [3]. Przyczyną kryptosporydiozy u ludzi są zazwyczaj gatunki

*C. parvum* (dawniej *C. parvum* genotyp 2) i *C. hominis* (dawniej *C. parvum* genotyp 1) [18], natomiast *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. felis*, *C. canis*, *C. andersoni*, *C. suis* oraz *C. baileyi* stanowią niebezpieczeństwo jedynie dla osób o obniżonej odporności [19–21].

Formy inwazyjne *Cryptosporidium* – oocysty zawierające sporozoity, dostają się do organizmu żywiciela poprzez spożycie zanieczyszczonej odchodami wody pitnej, połknięcie wody z naturalnych i sztucznych zbiorników rekreacyjnych, skażonego oocystami pokarmu oraz poprzez kontakt z zarażonymi ludźmi oraz zwierzętami [1,22,23]. Ważną rolę w rozprzestrzenianiu oocyst pełnią muchy domowe i inne muchy synantropijne [24]. Szacuje się, że u zdrowych ludzi dawka inwazyjna wynosi około 10 oocyst *Cryptosporidium*, zaś u osób z obniżoną odpornością już jedna może spowodować kryptosporydiozę [5]. Kompletny cykl życiowy tego pierwotniaka zachodzi w komórkach nabłonka przewodu pokarmowego (rzadziej układu oddechowego) jednego żywiciela. Uwolnione w jelicie cienkim sporozoity, zostają otoczone przez enterocyty dwiema błonami tworząc wodniczkę, przekształcając się w trofozoity. Kilka dni po zarażeniu trofozoity w procesie schizogonii uwalniają zawierające po 8 merozoitów meronty I rzędu, które zarażają sąsiadujące komórki. Te stadia mogą rozwinąć się w meronty II rzędu, zawierające 4 merozoity, które zapoczątkują etap rozmnażania płciowego. Z części z nich powstają makrogametocyty i mikrogametocyty, a następnie odpowiadające im mikrogamety i makrogamety. Gamety łączą się, powstaje zygota, która wytwarza specjalną otoczkę tworząc oocystę. U *Cryptosporidium* powstają dwa typy oocyst: cienkościenne i grubościenne. Dwadzieścia procent form inwazyjnych posiada cienką otoczkę, szybko pęka, a uwolnione z nich sporozoity atakują enterocyty żywiciela, powodując dalszy rozwój inwazji. Pozostałe oocysty o grubej otoczce, posiadające wysoką oporność na zmiany warunków środowiska oraz czynniki chemiczne, są wydalane z kałem żywiciela do środowiska zewnętrznego [23]. Te cechy w połączeniu z niewielkimi rozmiarami, niską dawką inwazyjną, dużą liczbą form dyspersyjnych wydalanych z kałem i szerokim kręgiem żywicieli sprawiają, że pierwotniaki te realnie zagrażają zdrowiu publicznemu [1].

Pierwotniaki *Cryptosporidium* mogą stać się przyczyną choroby manifestującej się niespecyficznymi objawami, przypominającymi te towarzyszące grypie jelitowej. Podczas kryptosporydiozy występuje obfita i wodnista biegunka, bóle brzucha, nud-

ności i wymioty, podwyższona temperatura ciała, upośledzenie wchłaniania substancji pokarmowych, silne odwodnienie oraz ogólne osłabienie. Długotrwałe zaburzenia ze strony układu pokarmowego prowadzą do znacznej utraty masy ciała [1,22,23]. W świetle dotychczasowych wyników badań nie można wykluczyć udziału tego pasożyta w patogenezie raka jelita grubego [25]. W zarażeniu narządów oddechowych przeważa znacznie podwyższona temperatura ciała, duszności, kaszel [23]. Wystąpienie poszczególnych objawów oraz ich nasilenie zależą od stanu układu odpornościowego danego organizmu. W przypadku kompetentnych immunologicznie dorosłych, zarażenie przebiega zazwyczaj łagodnie, wygasając samoistnie po 1–2 tygodniach. U dzieci do 5 roku życia, ludzi starszych, kobiet w ciąży oraz osób z nabytym lub wrodzonym obniżeniem odporności infekcja ma ostry przebieg [1,22,23].

Podstawową metodą diagnostyczną stosowaną w praktyce klinicznej jest obserwacja mikroskopowa rozmazów ze świeżego lub zagęszczonego formaliną bądź metodą Sheather'a kału, poddanego następnie działaniu wybranych barwników kwasopornych, najczęściej metodą Ziehl-Neelsen'a. Dostępne są również komercyjne zestawy umożliwiające wykrywanie *Cryptosporidium* metodami immunoenzymatycznymi (ELISA) oraz metodami fluorescencji bezpośredniej (DFA) [22,23].

Większość metod diagnostycznych używanych rutynowo w praktyce klinicznej ma ograniczone zastosowanie w odniesieniu do wykrywania *Cryptosporidium* w próbach środowiskowych. W celu ujednoczenia i udoskonalenia monitoringu form inwazyjnych *Cryptosporidium* w wodzie pitnej i rekreacyjnej, Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (United States Environmental Protection Agency) opracowała Metodę 1622 (dotyczącą *Cryptosporidium*), a następnie Metodę 1623 (dotyczącą *Cryptosporidium* i *Giardia*), które określają sposoby filtracji, odzysku, zagęszczania, oczyszczania i wykrywania pasożytniczych pierwotniaków jelitowych.

Do wykrywania form inwazyjnych omawianych pasożytów w próbach środowiskowych wykorzystuje się zazwyczaj techniki mikroskopowe, immunologiczne oraz metody cytometrii przepływowej, które nie pozwalają jednak na identyfikację gatunku, genotypu, pochodzenia czy też potencjału chorobotwórczego oocyst. Z tego powodu uzasadnione jest poszukiwanie metod diagnostycznych bazujących na wykrywaniu materiału genetycznego wod-

nych pierwotniaków, które pozwalają uzyskać te istotne informacje [26–29]. Zaproponowano kilka protokołów wykrywania tych pierwotniaków z wykorzystaniem technik molekularnych, przeważnie w oparciu o łańcuchową reakcję polimerazy (PCR). Produkty amplifikacji mogą być sekwencjonowane lub cięte wybranym enzymem restrykcyjnym (RFLP), co umożliwia rozpoznanie gatunku czy genotypu [30]. W analizie podobieństwa szczepów wykorzystuje się również metodę losowej amplifikacji polimorficznych fragmentów DNA (RAPD) [31]. Inne techniki charakteryzują się zwiększoną czułością reakcji (nested PCR) lub pozwalają na jednoczesną detekcję wielu gatunków pierwotniaków (multiplex PCR) [16,32]. Dodatkowo metoda PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) daje możliwość monitorowania ilości produktu DNA w poszczególnych cyklach reakcji. Technika ta umożliwia precyzyjne określenie liczby oocyst w badanej próbce, co jest istotne przy określaniu intensywności zarażenia [26–29]. Ponadto real-time PCR pozwala na multipleksowe wykrywanie wielu gatunków pierwotniaków [33], natomiast real-time PCR z zastosowaniem odwrotnej transkryptazy, gdzie matrycą jest mRNA, umożliwia oszacowanie ekspresji wybranych genów w czasie różnych etapów infekcji [26]. Rzadziej wykorzystuje się techniki hybrydyzacyjne, takie jak fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH) oraz nowoczesne metody genomiki porównawczej, oparte na wykorzystaniu mikromacierzy oligonukleotydowych [27,34].

### *Giardia*

Rodzaj *Giardia* został odkryty przez Lambla w 1859 roku, jednak już Leeuwenhoek w 1681 roku zauważył w rozmazie kału pasożyty podobne do tego pierwotniaka [35]. Obecnie wyróżnia się 6 gatunków tych wiciowców pasożytujących u płazów, gadów, ptaków oraz ssaków, natomiast chorobotwórczy dla ludzi jest tylko jeden – *G. intestinalis* (genotyp AI, AII oraz B), zwany również *G. duodenalis* czy *G. lamblia* [36,37].

*G. lamblia* jest najpospolitszym pasożytem związanym z infekcjami jelitowymi. Do organizmu żywiciela dostaje się najczęściej drogą pokarmową poprzez połknięcie cyst pierwotniaka wraz z zanieczyszczoną odchodami wodą lub żywnością. Udowodniono również, że infekcja może mieć charakter antropozoonozy, ponieważ człowiek może się zarażać szczepami *Giardia* pochodzącymi od zwierząt hodowlanych i dzikich [1,22,23]. Postacią inwazyj-

ną są cysty, które w dwunastnicy ulegają ekscystacji, uwalniając dwa trofozoity przyczepiające się do błony śluzowej jelita. Ulegają one dalszym podziałom, prowadząc do powstania licznej populacji trofozoitów, zdolnych do dalszej inwazji jelita cienkiego, rzadziej dróg żółciowych i przewodów wyprowadzających trzustki. Następnie w procesie encystacji trofozoity ulegają przekształceniu w odporne na warunki środowiska i środki chemiczne cysty, które są wydalane wraz z kałem żywiciela do gleby i wody [23].

Giardioza cechuje się dużą zmiennością objawów klinicznych oraz zróżnicowanym okresem trwania choroby, co jest zależne od stanu układu odpornościowego danego organizmu. Infekcja może trwać krótko i spontanicznie wygasać lub przechodzić w postać przewlekłą, odporną na leczenie. Badania dowodzą, że u 20–84% ludzi zarażenie przebiega bezobjawowo [1], natomiast u pozostałych osób w pierwszym stadium choroby występują nudności, wymioty, biegunki, następnie obserwuje się naprzemienne biegunki i zaparcia, bóle brzucha, nudności, brak łaknienia, a także bóle głowy, szybkie męczenie się, stany podgorączkowe. U niektórych osób mogą wystąpić zmiany typu alergicznego obejmujące skórę. Utrzymujące się przez dłuższy czas zarażenie może doprowadzić do zmniejszenia masy ciała, połączonego z zanikiem mięśni [1,22,23].

Diagnostyka kliniczna giardiozy, podobnie jak w przypadku *Cryptosporidium*, polega głównie na wykrywaniu form przetrwalnikowych lub trofozoitów w preparatach bezpośrednich z treści dwunastnicy. Do wykrywania niewielkiej ilości cyst w próbie kału stosuje się także badania serologiczne w oparciu o testy immunofluorescencji, opracowano również testy oparte na odczynach immunoenzymatycznych [22,23].

W odniesieniu do wykrywania *Giardia* w próbach środowiskowych, podobnie jak w przypadku *Cryptosporidium*, Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych opracowała Metodę 1623 (dotyczącą *Cryptosporidium* i *Giardia*), opierającą się na mikroskopowym rozpoznaniu pierwotniaków, jednak nadal poszukuje się znacznie czulszych i bardziej specyficznych metod molekularnych [26,27]. W związku z tym, że *Giardia* jest najwcześniej opisanym i równocześnie najpospolitszym pasożytem związanym z inwazjami jelitowymi, podejmowano liczne próby wykorzystania technik molekularnych do wykrywania tych patogenów w materiale od pacjentów; była to głównie reakcja PCR

i pokrewne jej techniki (nested PCR, RAPD, PCR-RFLP, multiplex PCR, real-time PCR) [26,33,37]. Wykorzystywano także techniki hybrydizacyjne, takie jak hybrydizacja fluorescencyjna *in situ* (FISH) oraz nowoczesne metody genomiki porównawczej, związane z wykorzystaniem mikromacierzy oligonukleotydowych [34].

### *Cyclospora cayetanensis*

Pierwotniak *Cyclospora cayetanensis*, należący do rzędu Coccidia, został identyfikowany jako nowy gatunek pasożytny wewnątrzkomórkowo w jelicie cienkim człowieka dopiero w 1994 roku [38]. Wcześniej opisywany był jako *Blastocystis hominis*, organizm podobny do sinic, bądź był mylony z *Cryptosporidium muris* [1].

Oocysty *C. cayetanensis* dostają się do organizmu człowieka przez spożycie zanieczyszczonej odchodami wody, również chlorowanej. Wykazano także, że przyczyną epidemii może być spożywanie surowych owoców i warzyw. Wyklucza się jednak bezpośrednią transmisję form inwazyjnych na drodze fekalno-oralnej, ponieważ oocysty dojrzewają i stają się inwazyjne w środowisku zewnętrznym [1,3,23]. Udział zwierząt w szerzeniu zarażenia *C. cayetanensis* wśród ludzi nie został jeszcze w pełni poznany [1]. Cykl życiowy tych pierwotniaków jest podobny do rozwoju *Cryptosporidium* [22,23].

Pierwotniaki *C. cayetanensis* mogą powodować chorobę charakteryzującą się niespecyficznymi objawami jelitowymi, przypominającymi te towarzyszące kryptosporydiozie. Najczęściej w momencie zarażenia można zaobserwować uporczywe wodniste biegunki, nudności i wymioty, bóle brzucha, mięśni, stawów, stany zapalne jelit oraz miejscowe zniszczenia enterocytów [1,3,22]. W przypadku dorosłych, kompetentnych immunologicznie, infekcja przebiega łagodnie samoistnie wygasając po 2–3 tygodniach, natomiast u osób z obniżoną odpornością zarażenie może trwać miesiącami, ma ostry przebieg i często występują nawroty [1].

Rutynowa diagnostyka cyklosporozy opiera się zazwyczaj o badania koproscopowe oraz obserwację mikroskopową rozmazów kału barwionych metodą Ziehl-Neelsena lub innymi barwnikami kwasoopornymi. Oocysty można także wykrywać w preparatach z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego [22,39]. Zaproponowano również kilka protokołów wykrywania *C. cayetanensis* w próbach klinicznych i środowiskowych (w tym głównie wody) z wyko-

rzystaniem metod molekularnych, głównie w oparciu o reakcję PCR i jej modyfikacje (nested PCR, RAPD, PCR-RFLP, multiplex PCR, real-time PCR) [22,40,41].

### *Isospora belli*

Pierwotniaki z grupy *Isospora*, zaliczane do rzędu Coccidia, zostały po raz pierwszy opisane jako czynnik przewlekłych biegunek w 1915 roku. Jedy- nym znanym gatunkiem zagrażającym człowiekowi jest *Isospora belli*, którego taksonomię i nomenklaturę wprowadził Wenyon w 1923 roku [22,42].

*I. belli* dostaje się do organizmu człowieka głów- nie drogą pokarmową poprzez połknięcie oocyst pierwotniaka wraz z zanieczyszczoną odchodami wodą lub żywnością. Cykl życiowy pasożyta prze- biega w jelicie cienkim człowieka i przypomina roz- wój innych pierwotniaków zaliczanych do kokcy- diów [22,39,42].

Pierwotniaki *I. belli* mogą stać się przyczyną choroby tzw. izosporozu przebiegającej podobnie jak w przypadku zarażeń *Cryptosporidium* i *C. cayetanensis*. Najczęściej występuje przewlekła biegunka, która może trwać do 12 miesięcy. Inne symptomy to brak apetytu, utrata masy ciała, bóle brzucha oraz podwyższona temperatura. Pierwot- niaki te stanowią szczególne zagrożenie dla osób z nabytą lub wrodzoną obniżoną odpornością [22,39,42,43].

Podstawowymi metodami diagnostycznymi są badania koproscopowe oraz wykrywanie mikrosko- powe oocyst w świeżym kale, jednak ich identyfika- cja jest trudna, ponieważ są prawie przezroczyste. Z tego powodu pomocne w detekcji oocyst w pró- bach kału jest barwienie kwasowe. Formy inwazyj- ne można także wykrywać w preparatach z wyko- rzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego [22,39,42]. Nie opracowano dotychczas testów se- rologicznych pozwalających na wykrywanie tego pasożyta [22]. Natomiast zaproponowano kilka me- tod molekularnych opartych o reakcję PCR i jej mo- dyfikacje (nested PCR, RAPD, PCR-RFLP, multi- plex PCR, real-time PCR) [22,43,44]. Istniejące protokoły dotyczą głównie wykrywania *I. belli* w badaniach klinicznych natomiast niewiele z nich odnosi się do prób środowiskowych.

### Mikrosporidia

Termin mikrosporidia obejmuje obligatoryjnie wewnątrzkomórkowe pierwotniaki pasożytujące za-

równo u stawonogów, jak i kręgowców. Stanowisko systematyczne tych organizmów jest niejasne, obec- nie zalicza się je do pierwotniaków [45], choć we- dług niektórych reprezentują grzyby [46]. Pierwszy gatunek zaliczany do mikrosporidiów, *Nosema bombycis*, został opisany w 1857 przez Nageli. Obecnie termin ten obejmuje ponad 1200 gatunków, z których 14 może wywoływać inwazje oportuni- styczne u osób z niedoborami immunologicznymi [45,47]. Od chwili pierwszego udokumentowanego przypadku mikrosporydiozy w 1985 roku, za nie- bezpieczne dla zdrowia publicznego uznano cztery najpospolitsze gatunki: *Encephalitozoon intestina- lis*, *Encephalitozoon hellem*, *Encephalitozoon cuni- culi* oraz *Enterocytozoon bieneusi* [45].

Mikrosporidia dostają się do organizmu żywicie- la najczęściej drogą pokarmową przez spożycie za- nieczyszczonej sporami tych organizmów wody pit- nej, korzystania ze zbiorników rekreacyjnych lub rzadziej drogą inhalacyjną [22,48]. Stwierdzono, że rezerwuar pierwotniaka i źródło zanieczyszczenia środowiska, głównie gleby i wody, stanowią zwie- rzęta zarówno udomowione, jak i dzikie, co stwarza duże możliwości zarażenia się przez ludzi [22,49]. Formą inwazyjną jest spora posiadająca chitynową otoczkę, dzięki której jest bardzo oporna na działa- nie czynników środowiskowych, oraz drożną nić biegunową, przez którą sporoplazma dostaje się do komórki organizmu żywiciela. Następnie mikro- sporidia rozmnażają się przez podział, lub też jądro ulega wielokrotnym podziałom prowadzących do powstania merogonii. Kolejnym procesem jest sporogonia, w efekcie której powstają spory. Mogą one zajmować dalsze komórki, lub jako formy dys- persyjne opuszczają ustrój żywiciela, stanowiąc źró- dło zarażenia dla innych organizmów [39,49].

Mikrosporidia powodują przeważnie choroby przewodu pokarmowego. Do niedawna były naj- częstszą przyczyną przewlekłych biegunek u cho- rych na AIDS, jednak ze względu na brak swoisto- ści tkankowej tych organizmów, u osób z obniżoną odpornością dodatkowo wykrywa się je w wątrobie, przewodach żółciowych, układzie oddechowym, drogach moczowych, nerkach, mięśniach, gałce ocznej oraz w ośrodkowym układzie nerwowym [22,39,47]. U osób immunokompetentnych zakaże- nia przebiegają bezobjawowo lub występują łagod- ne symptomy, które samoistnie ustępują, natomiast u osób z niedoborami immunologicznymi choroba ma znacznie cięższy, gwałtowny przebieg, prowa- dzący nawet do zgonu [22].

Ze względu na małe rozmiary i trudno barwiące

się spory, wykrywanie mikroskopowe mikrosporidiów sprawia wiele trudności. Zazwyczaj stosuje się barwienia rozmazów z kału, osadów moczu, rzadziej wymazów i zeszkobin spojówki i błony śluzowej oka z użyciem chromotropu lub barwników fluorescencyjnych. Niekiedy wykorzystuje się biopsję jelita. W przypadku diagnostyki mikrosporidiów bardzo ważna jest identyfikacja gatunku, ponieważ różnią się one wrażliwością na leki [39,49]. Z tego powodu ważne jest stosowanie metod molekularnych, zarówno do prób klinicznych, jaki i środowiskowych, pozwalających uzyskać te istotne informacje [50]. Istnieją protokoły dotyczące wykorzystania metod opartych o wykrywanie patogenów na podstawie obecności ich materiału genetycznego w materiale od pacjentów, była to głównie reakcja PCR i pokrewne jej techniki, natomiast niewiele z nich odnosi się do prób środowiskowych [47,50].

## Podsumowanie

Udoskonalanie technik wykrywania pasożytniczych pierwotniaków jelitowych w próbach wody umożliwiło poznanie problemu, który do niedawna był lekceważony przez instytucje państwowe i opinię publiczną. Zagrożenie ze strony tych patogenów jest jednak istotne, ponieważ z powodu swoich biologicznych właściwości i utrzymującego się rezerwuaru zoonotycznego są bardzo rozpowszechnione w środowisku [1,13,22]. W celu zminimalizowania ryzyka zarażenia ludności tymi patogenami należy zwrócić szczególną uwagę społeczeństwa i instytucji państwowych na profilaktykę, diagnostykę oraz na metody badań i uzdatniania wody [3,22,39]. Z danych literaturowych wynika, że monitoring obecności form dyspersyjnych pierwotniaków w wodzie pitnej i rekreacyjnej jest najlepszym środkiem zapobiegania wodnopocho-dnym epidemiom wywołanym przez pasożytnicze pierwotniaki [1]. W tym celu Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych opracowała Metodę 1622, a następnie Metodę 1623, jednakże w większości państw, również w Polsce, w prowadzonych rutynowo standardowych badaniach oceny czystości wód nie sprawdza się obecności tych pierwotniaków. Co więcej, metody te odnoszą się jedynie do *Cryptosporidium* i *Giardia*, natomiast oficjalny monitoring występowania pozostałych pierwotniaków nie został nawet opracowany. W odniesieniu do wykrywania pierwotniaków w próbach wody większość metod diagnostycznych używanych rutynowo w praktyce klinicznej ma ograniczone zastosowanie. Po-

szukiwania mikroskopowe mogą być zawodne ze względu na małe ilości form dyspersyjnych w wodzie, natomiast metody serologiczne znajdują zastosowanie tylko w przypadku niektórych przedstawicieli pierwotniaków pasożytniczych przenoszonych za pośrednictwem wody. Z tego powodu tak duże znaczenie ma poszukiwanie nowych, znacznie czulszych i bardziej specyficznych metod molekularnych, które pozwalają na wykrycie obecności DNA pierwotniaka nawet przy małym zagęszczeniu patogenów w środowisku. Istnieją liczne protokoły wykrywania tych patogenów z wykorzystaniem metod molekularnych, głównie w oparciu o łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) i jej modyfikacje, przy czym wybór odpowiedniej techniki czy markera molekularnego zależy od informacji, jakie chcemy uzyskać na podstawie analizy. Opracowywanie nowych metod opartych na wykrywaniu materiału genetycznego daje nadzieję na ograniczenie ryzyka nabycia chorób spowodowanych przez patogeny przenoszone za pośrednictwem wody.

## Literatura

- [1] Majewska A.C., Kosiński Z., Werner A., Sulima P., Nowosad P. 2001. Pasożytnicze pierwotniaki jelitowe: nowe wodnopocho-dne zagrożenie zdrowia publicznego. Wydanie 2. Zakład Graficzny UW, Warszawa.
- [2] Toczyłowska B. 2007. Rola wskaźników pomocniczych w ocenie zagrożenia zdrowia ludzi obecnością oocyst *Cryptosporidium* w wodzie. *Ochrona Środowisk* 29: 25-28.
- [3] Dorny P., Praet N., Deckers N., Gabriel S. 2009. Emerging food-borne parasites. *Veterinary Parasitology* 163: 196-206.
- [4] Mac Kenzie 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. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *The New England Journal of Medicine* 331: 161-167.
- [5] Guidelines for drinking-water quality. First Addendum to Third Edition. Vol. 1 Recommendations, WHO, 2006.
- [6] Dyrektywa 98/83/WE z 3 listopada 1998 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (DzU L 330 z 5 grudnia 1998).
- [7] Dyrektywa 2003/99/WE z 17 listopada 2003 r. w sprawie monitorowania chorób odzwierzęcych i odzwierzęcych czynników chorobotwórczych (DzU L 325 z 12-12-2003).
- [8] U.S. EPA National Primary Drinking Water Regulations: Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule, 2006, 40 CRF Part 9, 141 and 142.

- [9] Drinking Water Inspectorate: The Water Supply (Water Quality) Regulations 2000, SI No. 3184 England, The Water Supply (Water Quality) Regulations 2001, SI No. 3911 (W. 323) Wales.
- [10] EPA Office of Environmental Enforcement European Communities (Drinking Water) Regulations, 2000 (S.I. 439 of 2000). A Handbook on Implementation for Sanitary Authorities, Ireland.
- [11] Sulima P., Werner A., Majewska A.C. 2000. Occurrence of *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* and *Cyclospora* oocysts in surface water pools in Poznań district. *Acta Parasitologica* 45: 212.
- [12] Bajer A. 2008. *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. infections in humans, animals and the environment in Poland. *Parasitology Research* 104: 1-17.
- [13] Bajer A., Bednarska M., Siński E. 2009. Dwadzieścia lat badań nad *Cryptosporidium* spp. i *Giardia* spp. w Polsce. *Wiadomości Parazytologiczne* 55: 301-304.
- [14] Nime F.A., Burek J.D., Page D.L., Holscher M.A., Yardlet J.H. 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70: 592-598.
- [15] Current W.L., Garcia L.S. 1991. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews* 4: 325-358.
- [16] Xiao L., Morgan U.M., Limor J., Escalante A., Arrowood M., Shulaw W., Thompson R.C., Fayer R., Lal A.A. 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3386-3391.
- [17] Xiao L., Fayer R., Ryan U., Upton S.J. 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 72-97.
- [18] Morgan-Ryan U.M., Fall A., Ward L.A., Hijjawi N., Sulaiman I., Fayer R., Thompson R.C., Olson M., Lal A., Xiao L. 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 49: 433-440.
- [19] Cama V.A., Bern C., Roberts J., Cabrera L., Sterling C.R., Ortega Y., Gilman R.H., Xiao L. 2008. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerging Infectious Diseases* 14: 1567-1574.
- [20] Gonçalves E.M., Araújo R.S., Orban M., Matté G.R., Matté M.H., Corbett C.E. 2008. Protocol for DNA extraction of *Cryptosporidium* spp. oocysts in fecal samples. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 50: 165-167.
- [21] Robinson G., Elwin K., Chalmers R.M. 2008. Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhea. *Emerging Infectious Diseases* 14: 1800-1802.
- [22] Marshall M.M., Naumovitz D., Ortega Y., Sterling C.R. 1997. Waterborne protozoan pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* 10: 68-82.
- [23] Kadłubowski R., Kurnatowska A. 1999. Zarys parazytologii lekarskiej. Wydanie 7. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa: 112-116, 161-165.
- [24] Racewicz M., Kruminis-Łozowska W., Gabre R.M., Stańczak J. 2009. Występowanie *Cryptosporidium* spp. u muchówek synantropijnych na wybranych stanowiskach miejskich i wiejskich. *Wiadomości Parazytologiczne* 55: 231-236.
- [25] Sulzyc-Bielicka V., Kuźna-Grygiel W., Kołodziejczyk L., Bielicki D., Kładny J., Stepień-Korzonek M., Telatyńska-Smieszek B. 2007. Cryptosporidiosis in patients with colorectal cancer. *The Journal of Parasitology* 93: 722-724.
- [26] Caccio S.M. 2003. Molecular techniques to detect and identify protozoan parasites in the environment. *Acta Microbiologica Polonica* 52: 23-34.
- [27] Jex A.R., Smith H.V., Monis P.T., Campbell B.E., Gasser R.B. 2008. *Cryptosporidium* – Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnology Advances* 26: 304-317.
- [28] Monis P.T., Giglio S., Keegan A.R., Thompson R.C. 2005. Emerging technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites. *Trends in Parasitology* 21: 340-346.
- [29] Skotarczak B. 2009. Methods for parasitic protozoans detection in the environmental samples. *Parasite* 16: 1-8.
- [30] Waldron L.S., Ferrari B.C., Gillings M.R., Power M.L. 2009. Terminal restriction fragment length polymorphism for identification of *Cryptosporidium* species in human feces. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 108-112.
- [31] Morgan U.M., Xiao L., Fayer R., Graczyk T.K., Lal A.A., Deplazes P., Thompson R.C. 1999. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* isolates from captive reptiles using 18S rDNA sequence data and random amplified polymorphic DNA analysis. *The Journal of Parasitology* 85: 525-530.
- [32] Lindergard G., Nydam D.V., Wade S.E., Schaaf S.L., Mohammed H.O. 2003. A novel multiplex polymerase chain reaction approach for detection of four human infective *Cryptosporidium* isolates: *Cryptosporidium parvum*, types H and C, *Cryptosporidium canis*, and *Cryptosporidium felis* in fecal and soil samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 15: 262-267.
- [33] Haque R., Roy S., Siddique A., Mondal U., Rahman S.M., Mondal D., Houpt E., Petri W.A. Jr. 2007. Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium* spp. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76: 713-717.
- [34] Wang Z., Vora G.J., Stenger D.A. 2004. Detection and genotyping of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium pa-*

- rvum* by oligonucleotide microarray. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 3262-3271.
- [35] Filce F.P. 1952. Studies on the cytology and life story of a *Giardia* from the laboratory rat. *University of California Publications in Zoology* 57: 53-146.
- [36] Monis P.T., Thompson R.C.A. 2003. *Cryptosporidium* and *Giardia* zoonoses: fact or fiction? *Infection, Genetics and Evolution* 3: 233-244.
- [37] Sousa M.C., Morais J.B., Machado J.E., Poiaraes-da-Silva J. 2006. Genotyping of *Giardia lamblia* human isolates from Portugal by PCR-RFLP and sequencing. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 53: 174-176.
- [38] Ortega Y.R., Gilman R.H., Sterling C.R. 1994. A new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from humans. *The Journal of Parasitology* 80: 625-629.
- [39] Wesołowska M., Gąsiorowski J., Jankowski S. 2005. Pierwotniaki oportunistyczne występujące u osób z niedoborami immunologicznymi. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 14: 349-355.
- [40] Shields J.M., Olson B.H. 2003. PCR-restriction fragment length polymorphism method for detection of *Cyclospora cayetanensis* in environmental waters without microscopic confirmation. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4662-4669.
- [41] Lalonde L.F., Gajadhar A.A. 2008. Highly sensitive and specific PCR assay for reliable detection of *Cyclospora cayetanensis* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 4354-4358.
- [42] Lindsay D., Dubey J.P., Blagburn B.L. 1997. Biology of *Isospora* spp. from humans, nonhuman primates, and domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews* 10: 19-34.
- [43] Müller A., Bialek R., Fätkenheuer G., Salzberger B., Diehl V., Franzen C. 2000. Detection of *Isospora belli* by polymerase chain reaction using primers based on small-subunit ribosomal RNA sequences. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 19: 631-634.
- [44] Hove R.J., van Lieshout L., Brienen E.A., Perez M.A., Verweij J.J. 2008. Real-time polymerase chain reaction for detection of *Isospora belli* in stool samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 61: 280-283.
- [45] Graczyk T.K., Sunderland D., Tamang L., Shields T.M., Lucy F.E., Breyse P.N. 2007. Quantitative evaluation of the impact of bather density on levels of human-virulent microsporidian spores in recreational water. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 4095-4099.
- [46] Lom J. 2002. A catalogue of described genera and species of microsporidians parasitic in fish. *Systematic Parasitology* 53: 81-99.
- [47] Dong S.N., Shen Z.Y., Xu L., Zhu F. 2010. Sequence and phylogenetic analysis of SSU rRNA gene of five microsporidia. *Current Microbiology* 60: 30-37.
- [48] Słodkiewicz-Kowalska A., Graczyk T.K., Tamang L., Jedrzejewski S., Nowosad A., Zduniak P., Solarczyk P., Girouard A.S., Majewska A.C. 2006. Microsporidian species known to infect humans are present in aquatic birds: implications for transmission via water? *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4540-4544.
- [49] Didier E.S., Didier P.J., Snowden K.F., Shadduck J.A. 2000. Microsporidiosis in mammals. *Microbes and Infection* 2: 709-720.
- [50] Chabchoub N., Abdelmalek R., Mellouli F., Kanoun F., Thellier M., Bouratbine A., Aoun K. 2009. Genetic identification of intestinal microsporidia species in immunocompromised patients in Tunisia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 80: 24-27.

Wpłynęło 21 kwietnia 2010

Zaakceptowano 30 maja 2010