

Molekularne badania inwazji *Cryptosporidium* spp.*)

ANNA BAJER, MAŁGORZATA BEDNARSKA, EDWARD SIŃSKI

Zakład Parazytologii Wydziału Biologii UW, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Bajer A., Bednarska M., Siński E.

Molecular studies of *Cryptosporidium* spp. infections

Summary

Cryptosporidium spp. are apicomplexan parasites that infect the gastrointestinal and/or respiratory tract of a wide range of mammals (*C. parvum*, *C. hominis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. wrairi*, *C. andersoni*, *C. muris*), birds (*C. meleagridis*, *C. baileyi*, *C. galli*), reptiles (*C. serpentis*, *C. saurophilum*), and fish (*C. molnari*). *C. parvum* is a parasite of cattle causing major global public and veterinary health problems. Since the mid-1980s, the introduction of new molecular techniques based on the amplification of nucleic acid, has provided clinicians and epidemiologists with highly sensitive and specific assays for detecting and identifying pathogens. The paper briefly reviews the advantages and disadvantages of some molecular assays based on polymerase chain reaction (PCR) and fluorescence in situ hybridization (FISH) presently used for detecting *Cryptosporidium* spp.

Keywords: *Cryptosporidium* spp., PCR techniques, FISH

Cryptosporidium jest obligatoryjnym wewnątrzkomórkowym pasożytem ludzi i ponad 150 gatunków ssaków (12, 29). Pierwotniak zasiedla komórki nabłonka jelita cienkiego i innych nabłonków, np. wyścielających drogi oddechowe, wywołując kryptosporidiozę. Szybkie, bezpłciowe namnażanie przez podział zwane schizogonią, charakterystyczne dla pasożytów z grupy *Apicomplexa*, doprowadza do masowej inwazji, prowadzącej do ostrej biegunki u zarażonych ludzi i zwierząt (36, 37). Kryptosporidioza może ulec samowyleczeniu, czasem jednak przekształca się w chroniczną infekcję, powodującą wyniszczenie organizmu a nawet zagrożenie życia. Na zarażenie pierwotniakiem są szczególnie podatne osobniki z niedoborami immunologicznymi, np. młode zwierząt w czasie pierwszych 2-3 tyg. życia, z nie w pełni rozwiniętym układem odpornościowym, a wśród ludzi – osoby po leczeniu immunosupresyjnym, zarażeni wirusem HIV, dzieci i ludzie w podeszłym wieku (4, 9, 28).

Pasożyt został po raz pierwszy wykryty i opisany u myszy domowej (40, 41), szybko okazało się jednak, że jest powszechnie spotykany u młodych zwierząt gospodarczych – cieląt, jagniąt i źrebiąt (11). Badania środowiskowe na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat wykazały, że na całym świecie pierwotniak dysponuje bardzo szerokim rezerwuarem zoonotycznym, w który włączone są m.in. naczelnne, przeżuwacze, drapieżne i gryzonie (2, 12). Za większość zarażeń wśród ludzi i zwierząt odpowiedzialny jest gatunek *C. parvum*, w jego obrębie istnieje jednak kilka

specyficznych szczepów, mniej lub bardziej specyficznych w stosunku do żywicieli. Najbardziej rozpowszechniony genotyp C (calf), zwany też genotypem 2, jest najczęściej spotykany u przeżuwaczy i ludzi z terenów rolniczych (7, 17). W związku z szerokim rezerwuarem pasożyta, badania epidemiologiczne skupiają się na rozpoznawaniu źródeł skażenia środowiska i dróg transmisji pasożyta do ludzi i zwierząt. Klasyczne metody wykrywania pasożyta, oparte na wybarwianiu form dyspersyjnych (oocyst) obecnych w kale zarażonych zwierząt (np. barwienie rozmazów kałowych metodą Ziehl-Neelsena (15)) nie pozwalają ani na różnicowanie gatunków i szczepów, ani na śledzenie dróg rozprzestrzeniania. Do badań takich używa się obecnie metod opartych na analizie DNA lub RNA, np. łańcuchową reakcją polimerazy (PCR), czyli namnożenie *in vitro* i analizę wybranego fragmentu genomu pasożyta. Podstawową korzyścią wynikającą ze stosowania metod molekularnych jest możliwość porównywania pochodzenia różnych izolatów pasożyta, np. od osób zarażonych w czasie wodnopochoďnej epidemii, od bydła wypasanego przy ujęciu wody pitnej czy ze ścieków komunalnych. Na tej podstawie jest możliwe wnioskowanie o źródłach skażenia i śledzenie dróg krążenia w środowisku.

PCR jako metoda diagnostyczna. Czułość tej techniki jest bardzo wysoka, pozwala w sprzyjających warunkach wykryć DNA pochodzące z pojedynczej komórki. Druga istotna zaleta tej techniki to specyficzność – zapis DNA porównywany bywa często do molekularnego odcisku palca. PCR z powodzeniem stosuje się do identyfikacji pasożytniczych pierwotniaków, np. zarodźca malarii (*Plasmodium* spp.), pi-

*) Badania finansowane częściowo z grantu KBN nr 6PO4C09721 oraz z grantu NATO nr CLG 979765.

Tab. 1. Charakterystyka uznanych obecnie gatunków *Cryptosporidium**

Gatunek pasożyta	Właściwy żywiciel	Lokalizacja**	Średnie wymiary oocyst (µm)	Potencjał zarażenia niespecyficznego żywiciela	
				Immuno-kompeteni	Immuno-supresjonowani
<i>C. hominis</i>	człowiek	SI	5,2 × 4,9	+	+
<i>C. parvum</i>	mysz domowa	SI	5,0 × 4,5	+	+
<i>C. felis</i>	kot domowy	SI	4,6 × 4,0	+	+
<i>C. canis</i>	pies domowy	SI	5,0 × 4,7	+	+
<i>C. wrairi</i>	świnka morska	SI	5,4 × 4,6	-	-
<i>C. muris</i>	mysz domowa	ST	8,4 × 6,3	-	+
<i>C. andersoni</i>	bydło	AB	7,4 × 5,5	-	-
<i>C. meleagridis</i>	indyk	SI	5,2 × 4,6	+	+
<i>C. baileyi</i>	kurczak	BF, CL	6,2 × 4,6	-	-
<i>C. galli</i>	ptaki	CL	6,0 × 4,5	-	-
<i>C. serpentis</i>	węże	ST	6,2 × 5,3	-	-
<i>C. saurophilum</i>	jaszczurka	SI	5,0 × 4,7	-	-
<i>C. molnari</i>	ryba	ST, SI	4,3 × 3,3	-	-

Objaśnienia: * wg Xiao i wsp. 2004, z pewnymi modyfikacjami autorów; ** AB – trawieniec, BF – bursa Fabrycjusza, CL – kloaka, ST – żołądek, SI – jelito cienkie

roplazm (*Babesia spp.*) czy patogennych ameb (*Entamoeba histolytica*) (1, 8, 27).

W okresie ostatnich 12 lat pojawiło się wiele prac dotyczących wykorzystania PCR do identyfikacji zarażeń *Cryptosporidium spp.* Przykłady kilku technik różniących się czułością i specyficznością przedstawiono w pracy Rochelle i wsp. (34).

Wykorzystanie PCR do genotypowania *Cryptosporidium*. PCR pozostaje jednak jednym z najważniejszych narzędzi do rozróżniania gatunków i szczepów *Cryptosporidium*. Do metod najczęściej obecnie stosowanych należą:

– PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism – analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych),

– PCR-fingerprinting, „odcisk palca”, zwana też RAPD (random amplified polymorphic DNA),

– PCR – sekwencjonowanie, czyli określenie kolejności zasad w DNA.

We wszystkich przypadkach reakcja PCR jest wykorzystana do amplifikacji DNA, a w dalszej kolejności produkt reakcji jest cięty enzymami restrykcyjnymi (ad. 1) lub sekwencjonowany (ad. 3). Metody te wykorzystują różnice w sekwencji produktu. RAPD polega natomiast na zastosowaniu kilku niespecyficzných par starterów amplifikujących polimorficzne regiony DNA genomowego i dających produkty o różnej długości dla analizowanych gatunków/genogatunków pasożyta, co obrazuje charakterystyczny układ prążków na żelu. Porównanie czułości i specyficzności kilku metod przedstawiają badania Sulaimana i wsp. (39). Genotypowanie posiada wiele zalet, z których najważniejszą jest sięgnięcie do samego źródła różnic

między gatunkami i/lub genogatunkami – genomu oraz nieograniczone metody różnicowania (ograniczone jedynie wielkością genomu). Należy jednak pamiętać, że metody te pozwalają wykluczyć pewne źródła skażeń, ale nie dają 100% potwierdzenia identyczności badanych izolatów.

Obecnie, na podstawie genotypowania różnych gatunków i szczepów *Cryptosporidium*, uznano 13 gatunków, z których 7 pasożytuje u ssaków, 3 u ptaków, 2 u gadów i jeden u ryb. Listę tych gatunków, lokalizacje i charakterystykę zawarto w tabeli 1. Postulowane jest także wyodrębnienie z *C. parvum* kilku nowych gatunków dla szczepów izolowanych od świń, myszy domowych, torbaczy czy małą i łasic (18-23, 25, 35, 38, 44). Na podstawie analizy wielu genów udowodniono występo-

wanie w populacji ludzkiej dwóch gatunków *Cryptosporidium*: *C. hominis* (dawny genotyp 1) (26) i szczepu „C” *C. parvum* (dawny genotyp 2). *C. hominis* jest odpowiedzialny za epidemie kryptosporidiozy zwłaszcza w środowiskach miejskich; szpitalach, szkołach, przedszkolach i żłobkach. Gatunek ten jest inwazyjny także dla osób z prawidłowo działającym układem odpornościowym i utrzymuje się jedynie w środowisku antroponotycznym, gdyż nie jest infekcyjny dla zwierząt. Genotyp „C” *C. parvum* natomiast jest wspólny dla ludzi i zwierząt (bydło, owce, kozy, konie, świnię, myszy domowe) na całym świecie i odpowiedzialny bywa za wodnopochoodne epidemie kryptosporidiozy na terenach rolniczych oraz blisko połowę zarażeń u nosicieli wirusa HIV (7, 17, 20, 24, 30, 43, 45).

Dociekania epidemiologiczne komplikuje fakt, że niektóre gatunki zwierząt mogą być zarażone kilkoma gatunkami i genogatunkami *Cryptosporidium*, np. u świń oprócz zarażeń specyficznym dla tych zwierząt szczepem *C. parvum* stwierdzano też zarażenia genotypem „C” *C. parvum*, infekcyjnym dla ludzi. Podobnie w przypadku myszy domowych oprócz zarażeń *C. muris* i specyficznym genotypem *C. parvum* wykazano też zarażenia szczepem „C” *C. parvum* (18, 21, 23).

Określanie żywotności i inwazyjności oocyst poprzez wykrywanie rRNA. FISH (fluorescent *in situ* hybridization) to skrót oznaczający hybrydyzację znakowanej fluorescencyjnie oligonukleotydowej sondy do określonego „celu” w komórce, którym jest odcinek kwasu nukleinowego komplementarny do sekwencji sondy. Znakowanie odbywa się *in situ*, czyli w obrębie danej komórki/danego mikroorganizmu, dzięki

czemu wybarwiają się wewnętrzne struktury komórki, np. organella zawierające rRNA. rRNA jest częścią „celem” hybrydyzacji ze względu na dużą liczbę kopii, krótki okres półtrwania po śmierci komórki, a także dobre warunki przyłączania sond dzięki pojedynczym niciom. Z kolei poprzez odpowiedni dobór wysoko specyficznych sond można rozróżniać nawet blisko spokrewnione gatunki pasożytów. Technika FISH jest coraz szerzej stosowana jako szybka, czuła i specyficzna metoda pozwalająca na oszacowanie żywotności, a przez to także potencjału inwazyjności patogennych mikroorganizmów. Oligonukleotydowe sondy zostały zaprojektowane i były stosowane z sukcesem w przypadku *C. parvum* i *Giardia intestinalis* (13, 42).

Badania molekularne izolatów *Cryptosporidium*.

Celem badań było określenie: (a) gatunku i genotypów izolatów *Cryptosporidium* uzyskanych od bydła, które wykorzystywane są w Zakładzie Parazytologii UW do pasażu na myszach szczepu C57BL/6, (b) czy w populacjach z terenu Mazurskiego Parku Krajobrazowego występują „wspólne” dla bydła i drobnych gryzoni (mysz leśna, normica ruda, nornik zwyczajny) genotypy pasożyta, (c) jaki jest udział żywotnych, potencjalnie inwazyjnych oocyst w próbkach kału pochodzących bezpośrednio od bydła i od myszy doświadczalnych zarażonych izolatem bydlęcym.

Material i metody

Izolaty. Izolaty oocyst (n = 4) pochodziły od kilkudniowych cieląt z objawami biegunki, z fermy hodowlanej w Wielkopolsce, w której ekstensywność zarażenia sięgała 40% (5). Próbkę kału zostały zebrane w 1999 roku i oznaczone w kierunku *Cryptosporidium* korzystając z barwienia metodą Ziehl-Neelsena (15). Próbki były przechowywane w 2,5% roztworze dwuchromianu potasu w temp. +4°C lub zamrożone w temp. -20°C. Część oocyst przechowywanych w dwuchromianie została użyta do doświadczalnych zarażeń myszy szczepu C57BL/6, z których następnie zebrano i zamrożono próbki kału pozytywne w kierunku *C. parvum*. Do porównania żywotności oocyst przed i po pasażu na myszach C57BL/6 skorzystano z izolatu od cieląt, otrzymanego dzięki uprzejmości prof. Anny Majewskiej z Katedry i Zakładu Biologii i Parazytologii Lekarskiej AM w Poznaniu.

W czasie badań środowiskowych w latach 1999-2000 pozyskano próbki kału od gryzoni, które zasiedlały obszary należące uprzednio do PGRów i wykorzystywane przed 12 laty ekstensywnie pod uprawy i do wypasu bydła (6).

Izolacja DNA. DNA izolowano z obu rodzajów próbek (bezpośrednio z prób od bydła i z prób od myszy po pasażu) metodą da Silva i wsp. (10). Dodatkowo, DNA izolowano z prób kałowych myszy laboratoryjnych zarażonych 3 grupami izolatów od drobnych gryzoni (6).

PCR. Do reakcji PCR zastosowano startery opracowane przez Spano i wsp. (38) oraz Pedraza-Diaz i wsp. (32). Opisany w ostatniej pracy nested-PCR

opiera się na dwuetapowym namnażaniu fragmentu genu COWP (*Cryptosporidium* Oocyst Wall Protein – białko ściany oocyst *Cryptosporidium*) i jest specyficzny dla rodzaju *Cryptosporidium*.

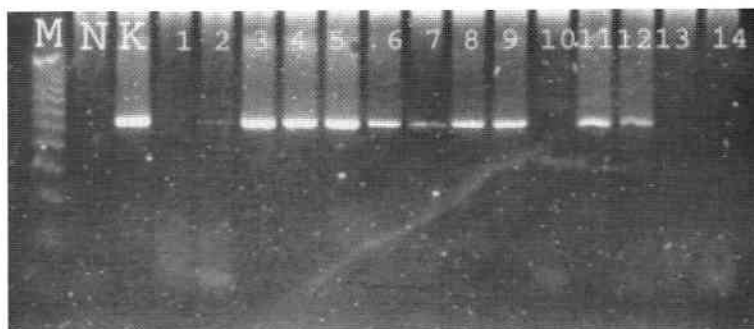
Dodatkowo izolat pochodzący od bydła został przesłany do dr Normana Pieniżka (Centers for Disease Control – CDC, Atlanta, USA), gdzie przeprowadzono amplifikację i analizę fragmentu genu 18S rRNA wg protokołu Pieniżek i wsp. (33).

Genotypowanie. Genotypowanie *Cryptosporidium* zostało wykonane przez dr Simone Caccio (Laboratory of Parasitology, Istituto Superiore di Sanita, Rzym, Włochy) poprzez sekwencjonowanie produktów reakcji nested-PCR na COWP. Otrzymane sekwencje zostały porównane z sekwencjami *Cryptosporidium* spp. w GenBank. Produkt reakcji na 18S rDNA został zsekwencjonowany i porównany z sekwencjami w GenBank.

Określanie żywotności oocyst – FISH. Próbkę kałową o masie 1-5 g zostały zageszczone poprzez wstępną homogenizację w 15 ml PBS o pH 7,4, sedymentację w próbkach stożkowych przez 12 godzin w temp. +4°C i przefiltrowanie odpowiedniej frakcji przez filtry celulozowe (technika CAM wg. (14)). W celu permabilizacji oocyst stosowano 10 min inkubację w acetonie, w temp. pokojowej. Do hybrydyzacji zastosowano sondy Cry-1, Giar-4 i Giar-6. Inkubację przeprowadzano przez 1 godz. w temp. +48°C (13, 42). Do wykrywania oocyst/cyst stosowano monoklonalne przeciwciała (test immunofluorescencji pośredniej MerIFluor *Cryptosporidium*/*Giardia*). Próbkę oglądano pod mikroskopem fluorescencyjnym pod pow. 400 × przy długości fali 490 nm.

Wyniki i omówienie

PCR. Obecność DNA *Cryptosporidium* sp. stwierdzono w izolacie od bydła, w próbkach kału myszy laboratoryjnych po pasażu izolatu bydlęcego oraz u trzech gatunków badanych gryzoni. Rozdział elektroforetyczny produktów nested-PCR, o wielkości około 550 pz, przedstawiony jest na rycinie 1. Ampli-



Ryc. 1. Przykładowe produkty amplifikacji (nested-PCR wg Pedraza-Diaz i wsp. 2001) fragmentu genu COWP (550 pz); DNA matrycowe izolowano z kału myszy C57BL/6 zarażonych poszczególnymi izolatami od gryzoni (Ma – *M. arvalis*; Af – *A. flavicollis*; Oz – piżmak *Ondatra zibethicus*) – oraz od cielęcia. M – wzorzec masy molekularnej; N – kontrola negatywna; K – kontrola pozytywna; 1 – Ma15 (neg.); 2 – Ma16 (neg.); 3 – Af4 (poz.); 4 – Af5 (poz.); 5 – Af6 (poz.); 6 – Af7 (poz.); 7 – Af8 (poz.); 8 – Af9 (poz.); 9 – Af10 (poz.); 10 – Af11 (neg.); 11 – Af12 (poz.); 12 – cielę (poz.); 13 – Oz a (neg.); 14 – Oz b (neg.)

fikacja przy użyciu nested-PCR na genie COWP sprawdziła się jako czuła metoda do diagnostyki zarażeń w próbach środowiskowych.

Genotypowanie. W czasie genotypowania *Cryptosporidium* sp. otrzymano dwie różne sekwencje, z których jedna była charakterystyczna dla izolatu bydłęcego, a druga wspólna dla szczepów od wolno żyjących gryzoni.

Sekwencja genu COWP otrzymana dla izolatów pasożyta od bydła, zarówno bezpośrednio, jak i po pasażu na myszach, była komplementarna do szczepu „C” *C. parvum*. Przynależność badanych izolatów do tego genotypu potwierdziła także analiza sekwencji genu 18S rRNA, wykonana w CDC. Wobec tego wszystkie izolaty od bydła zostały określone jako *C. parvum* genotyp 2 (bydłęcy). Dzięki temu potwierdzono znaczenie bydła jako głównego rezerwuaru szczepu pasożyta inwazyjnego dla ludzi w Polsce. Można też więc sądzić, że przy tak znacznej prevalencji pasożyta u cieląt (5) na terenie kraju, także w Polsce ten genotyp może być główną przyczyną kryptosporidiozy u ludzi na terenach użytkowanych rolniczo. Ponadto synantropijne myszy domowe zamieszkujące obory, stajnie czy stodoły mogą odgrywać istotną rolę w transmisji i jako rezerwuariusz groźnego dla ludzi genotypu C.

Odłączyły się od trzecz gatunków gryzoni. Wszystkie sekwencje były identyczne. Korzystając z programu BLAST przeszukano bazy danych w celu porównania sekwencji dla różnych gatunków i izolatów *Cryptosporidium*. Najwyższą homologię sekwencji (99,8% zgodności, identyczne 538 z 539 nukleotydów) otrzymano dla izolatu *C. parvum* specyficznego dla myszy domowych. Potwierdzono w ten sposób zarażenie *C. parvum* u trzech wolno żyjących gatunków i wykazano pewną specyficzność tych izolatów. Sekwencje zostały zdeponowane w GenBank pod numerami dostępu AJ489215 (dla *C. glareolus*), AJ489216 (dla *A. flavicollis*), i AJ489217 (dla *M. arvalis*) (3).

Wydaje się więc, że w badanych populacjach gryzoni zamieszkujących tereny, które od 12 lat nie są użytkowane rolniczo, nie występuje genotyp 2, powszechny u cieląt. Z drugiej strony przebadano zaledwie kilkanaście izolatów od gryzoni, istnieje więc nadal możliwość występowania innych genotypów i gatunków pasożyta u tych żywicieli. Ponadto, w ostatnich badaniach, na podstawie analizy filogenetycznej sekwencji genu COWP uznanych gatunków i genogrup *Cryptosporidium* (45) przedstawili duże pokrewieństwo genotypu *C. parvum* od myszy domowych do genotypu 2 *C. parvum*. Na podstawie tak dużego podobieństwa autorzy stwierdzają znaczne potencjalne zagrożenie, jakie stanowią dla zdrowia publicznego wszystkie blisko spokrewnione genotypy *C. parvum*. Przez analogię, na podstawie wysokiej zgodności sekwencji fragmentu genu COWP pochodzącej od pasożytów od wolno żyjących gryzoni i sekwencji tego genu od pasożytów od myszy domowej,

można wnioskować o realnym zagrożeniu, jakie może stanowić ten genotyp dla zdrowia ludzi i zwierząt. Może być to szczególnie ważne dla ludzi z grup ryzyka, z obniżoną odpornością, u których stwierdzono do tej pory zarażenie 4 różnymi gatunkami i 3 genogrupami *Cryptosporidium* (16, 31-33, 45).

FISH. Stosując technikę fluorescencyjnej hybrydizacji *in situ* (FISH) wykazano znacznie wyższy odsetek żywotnych oocyst *C. parvum* w próbkach kału pozyskanych bezpośrednio od cielęcia (84%) w porównaniu z odsetkiem żywotnych oocyst w próbkach od myszy C57BL/6 po pasażu (53%). Może to wskazywać na gorsze dostosowanie pasożyta do niespecyficznego żywiciela, jakim jest mysz laboratoryjna, oraz na możliwy mechanizm eliminacji niespecyficznego genotypów z wolno żyjących populacji.

Piśmiennictwo

1. Acuna-Soto R., Samuelson J., De Giromali P., Zarate L., Millan-Velasco F., Schoolnick G., Wirth D.: Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993, 48, 58-70.
2. Bajer A., Bednarska M., Pawelczyk A., Behnke J. M., Gilbert F. S., Siński E.: Prevalence and abundance of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* spp. in wild rural rodents from the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitol.* 2002, 125, 21-34.
3. Bajer A., Caccio S., Bednarska M., Behnke J. M., Pieniazek N. J., Siński E.: Preliminary molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents from Poland. *J. Parasitol.* 2003, 89, 1053-1055.
4. Ballal M., Prabhu T., Chandran A., Shivananda P. G.: *Cryptosporidium* and *Isospora belli* diarrhoea in immunocompromised hosts. *Indian J. Cancer* 1999, 36, 38-42.
5. Bednarska M., Bajer A., Siński E.: Calves as a potential reservoir of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* sp. *Ann. Agric. Environ. Med.* 1998, 5, 135-138.
6. Bednarska M., Bajer A., Kuliś K., Siński E.: Biological characterisation of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents from Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2003, 10, 163-169.
7. Caccio S., Pinter E., Fantini R., Mezzaroma I., Pozio E.: Human infection with *Cryptosporidium felis*: case report and literature review. *Emerg. Infect. Dis.* 2002, 8, 86-86.
8. Caccio S., Camma C., De Santis P., Severini C.: Molecular diagnosis of *Piroplasma* infections. VIII European Multicolloquium of Parasitology. *Acta Parasitol.* 2000, 45, 189.
9. Cegielski J. P., Ortega Y. R., Mckee S., Madden J. F., Gaido L., Schwartz D. A., Manji K., Jorgensen A. F., Miller S. E., Pulipaka U. P., Msengi A. E., Mwakyusa D. H., Sterling C. R., Reller L. B.: *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon* and *Cyclospora* infections in pediatric and adult patients with diarrhea in Tanzania. *Clin. Infect. Dis.* 1999, 28, 314-321.
10. Da Silva A. J., Bornay-Llinares F. J., Moura I. N. S., Slemenda S. B., Tuttle J. L., Pieniazek N. J.: Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens. *Molec. Diag.* 1999, 4, 57-64.
11. De Graaf D. C., Vanopdenbosch E., Ortega-Mora L. M., Abbassi H., Peeters J. E.: A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int. J. Parasitol.* 1999, 29, 1269-1287.
12. Fayer R., Morgan U., Upton S. J.: Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* 2000, 30, 1305-1322.
13. Graczyk T. K., Grimes B. H., Knight R., Da Silva A. J., Pieniazek N. J., Veal D. A.: Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* carried by synanthropic flies by combined fluorescent *in situ* hybridization and a monoclonal antibody. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003, 68, 228-232.
14. Graczyk T. K., Fayer R., Cranfield M. R., Owen R.: *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from water by the membrane filter dissolution method retain their infectivity. *J. Parasitol.* 1997, 83, 111-114.
15. Henriksen S., Pohlenz J.: Staining of cryptosporidia by modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet. Scand.* 1981, 22, 594-596.
16. Katsumata T., Hosea D., Ranuh I. G., Uga S., Yanagi T., Kohno S.: Short report: possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000, 62, 70-72.
17. McLauchlin J., Pedraza-Diaz S., Amar-Hoeteneder C., Nichols G. L.: Genetic characterisation of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with

- diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37, 3153-3158.
18. Morgan U. M., Sargent K. D., Deplazes P., Forbes D. A., Spano F., Hertzberg H., Elliot A., Thompson R. C.: Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitol.* 1998, 117, 31-37.
 19. Morgan U. M., Buddle J. R., Armson A., Elliot A., Thompson R. C.: Molecular and biological characterisation of *Cryptosporidium* in pigs. *Australian Vet. J.* 1999a, 77, 44-47.
 20. Morgan U. M., Deplazes P., Forbes D. A., Spano F., Hertzberg H., Sargent K. D., Elliot A., Thompson R. C.: Sequence and PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacers of the rDNA repeat unit in isolates of *Cryptosporidium* from different hosts. *Parasitol.* 1999b, 118, 49-58.
 21. Morgan U. M., Xiao L., Fayer R., Lal A. A., Thompson R. C.: Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. *Int. J. Parasitol.* 1999c, 29, 1733-1751.
 22. Morgan U. M., Monis P. T., Fayer R., Deplazes P., Thompson R. C.: Phylogenetic relationship among isolates of *Cryptosporidium*: evidence for several new species. *J. Parasitol.* 1999d, 85, 1126-1133.
 23. Morgan U. M., Sturdee A. P., Singleton G., Gomez M. S., Gracenea M., Torres J., Hamilton S. G., Woodside D. P., Thompson R. C.: The *Cryptosporidium* „mouse” genotype is conserved across geographic areas. *J. Clin. Microbiol.* 1999e, 37, 1302-1305.
 24. Morgan U. M., Weber R., Xiao L., Sulaiman I., Thompson R. C., Ndiritu W., Lal A., Moore A., Deplazes P.: Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. *J. Clin. Microbiol.* 2000a, 38, 1180-1183.
 25. Morgan U. M., Xiao L., Monis P., Fall A., Irwin P. J., Fayer R., Denholm K. M., Limor J., Lal A., Thompson R. C.: *Cryptosporidium* spp. in domestic dogs: the „dog” genotype. *App. Environ. Microbiol.* 2000b, 66, 2220-2223.
 26. Morgan-Ryan U. M., Fall A., Ward L. A., Hijjawi N., Sulaiman I., Fayer R., Thompson R. C., Olson M., Lal A., Xiao L.: *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J. Eucar. Microbiol.* 2003, 49, 433-440.
 27. Myjak P., Pietkiewicz H., Pieniazek N. J., Nahorski W.: Usefulness of PCR for diagnosis of malaria. *Acta Parasitol.* 2000, 45, 189.
 28. Neill M. A., Rice S. K., Ahmad N. V., Flanigan T. R.: Cryptosporidiosis: an unrecognised cause of diarrhoea in elderly hospitalised patients. *Clin. Infect. Dis.* 1996, 22, 168-170.
 29. O'Donoghue P. J.: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int. J. Parasitol.* 1995, 25, 139-195.
 30. Ong C. S., Eisler D. L., Goh S. H., Tomblin J., Awad-El-Kariem F. M., Beard C. B., Xiao L., Sulaiman I., Lal A., Fyfe M., King A., Bowie W. R., Isaak-Renton J. L.: Molecular epidemiology of cryptosporidiosis outbreaks and transmission in British Columbia, Canada. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999, 61, 63-69.
 31. Pedraza-Diaz S., Amar C., McLaughlin J.: The identification and characterisation of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. *FEMS Microbiol. Letters* 2000, 189, 189-194.
 32. Pedraza-Diaz S., Amar C., Nichols G. L., McLaughlin J.: Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. *Emerg. Infect. Dis.* 2001, 7, 49-56.
 33. Pieniazek N. J., Bornay-Llinares F. J., Slemenda S. B., Da Silva A. J., Moura I. N. S., Arrowood M. J., Ditrich O., Addiss D. G.: New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. *Emerg. Infect. Dis.* 1999, 5, 1-6.
 34. Rochelle P. A., De Leon R., Stewart M. H., Wolfe R. L.: Comparison of primers and optimisation of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. *App. Environ. Microbiol.* 1997, 63, 106-114.
 35. Sargent K. D., Morgan U. M., Elliot A., Thompson R. C.: Morphological and genetic characterisation of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats. *Vet. Parasitol.* 1998, 77, 221-227.
 36. Siński E.: *Cryptosporidium* sp.: epidemiologia, źródła i drogi zarażeń. *Klinika Chorób Zakaźnych i Zakażenia Szpitalne* 1999, 3, 83-87.
 37. Siński E.: Kryptosporidioza u ludzi: epidemiologia, drogi zarażenia i patogenezna. *Przegląd Epidemiol.* 2000, 54, 239-246.
 38. Spano F., Putignani L., McLaughlin J., Casemore D. P., Crisanti A.: PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol. Letters* 1997, 150, 209-217.
 39. Sulaiman I. M., Xiao L., Lal A. A.: Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. *App. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 4431-4435.
 40. Tyzzer E. E.: A sporozoan found in the peptic glands of common mouse. *Proc. Soc. Experiment. Biol. Med.* 1907, 5, 12-13.
 41. Tyzzer E. E.: *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkund.* 1912, 26, 394-412.
 42. Vesey G., Ashbolt N., Fricker E. J., Deere D., Williams K. L., Veal D. A., Dorsch M.: The use of a ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe for fluorescent labelling of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J. App. Microbiol.* 1998, 85, 429-440.
 43. Xiao L., Escalante L., Yang C., Sulaiman I., Escalante A., Montali R. J., Fayer R., Lal A. A.: Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on small-subunit rRNA gene locus. *App. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 1578-1583.
 44. Xiao L., Morgan U. M., Fayer R., Thompson R. C., Lal A. A.: *Cryptosporidium* systematic and implications for public health. *Parasitol. Today* 2000, 16, 287-292.
 45. Xiao L., Fayer R., Ryan U., Upton S. J.: *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004, 17, 72-97.

Adres autora: dr Anna Bajera, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

❖❖❖❖ RECENZJE I BIBLIOGRAFIA ❖❖❖❖

Autorzy: A. Litwińczuk, Z. Litwińczuk, J. Borkowska, M. Florek: Surowce zwierzęce – ocena i wykorzystanie.

Wydawca: Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 2004, str. 512, cena 50,- PLN u wydawcy, ISBN 83-09-01783-9.

Książka jest opracowanym zespołowo podręcznikiem dla studentów kierunku zootechnicznego, towaroznawstwa, technologii żywności i żywienia człowieka. Treść przedstawiona została w 11 rozdziałach, w których omówiono surowce i produkty pozyskiwane od zwierząt.

