

OCENA UŻYTECZNOŚCI METOD WYKRYWANIA *CRYPTOSPORIDIUM* W KALE LUDZI I ZWIERZĄT¹

ANNA WERNER, PAWEŁ SULIMA I ANNA C. MAJEWSKA

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Akademia Medyczna im. Karola
Marcinkowskiego, ul Fredry 10, 61-701 Poznań; E-mail: awerner@amp.edu.pl

ABSTRACT. Evaluation of usefulness of different methods for detection of *Cryptosporidium* in human and animal stool samples. There are many methods for detection of *Cryptosporidium* oocysts. Most of them (more than 20) enable the microscopic detection of *Cryptosporidium* oocysts in faecal smears. Such a great variability of diagnostic methods may lead to confusion as far as the choice of an appropriate technique by a given laboratory is concerned. This study evaluated the diagnostic usefulness of *Cryptosporidium* oocysts and coproantigen detection methods in the diagnosis of cryptosporidiosis in human (266 stool specimen) and animals (205 from cattle, 160 from sheep, 30 from horses, 80 from cats, 227 from dogs and 11 from wild animals). The total number of human and animal stool specimens processed was 266 and 713, respectively. In this study the usefulness of several diagnostic methods was compared. The following techniques were taken into account: wet mounts, hematoxylin staining, four different specific methods (modified Zeihl-Neelsen, Kinyoun's, safranin-methylene blue, as well as carbol-methyl violet and tartrazynie) and commercially available kit based on enzyme-linked immunoassay (ProspecT(r) *Cryptosporidium* Microplate Assay). The final number of positive specimens was 123. Out of them 77 were positive in all specific methods. The oocysts found in stool specimens were measured. Humans were infected with *C. parvum* and animals with *C. parvum*, *C. andersoni* or *C. felis*. The statistical analysis has shown that EIA test was a better than microscopy method for identification of *Cryptosporidium* in faecal samples in human and wild animal. Sensitivity and specificity are important factors for the choice of a proper diagnostic method for *Cryptosporidium* detection, however other factors such as cost, simplicity and ease of interpretation of results are also important considerations.

Key words: animals, *Cryptosporidium*, diagnostic methods, immunoassay, man.

WSTĘP

Kokcydia z rodzaju *Cryptosporidium* są szeroko rozpowszechnionymi pierwotniakami pasożytującymi u ludzi, głównie z obniżoną sprawnością układu immunologicznego (Sloper i wsp. 1982; Ungar i wsp. 1986) i u wielu gatunków zwierząt. Według współczesnych danych spośród 12 gatunków *Cryptosporidium* najszerszym kręgiem żywicielskim, obejmującym ponad 152 gatunki ssaków, charakteryzuje się *C. parvum* (Fayer i wsp. 2000). Częste występowanie kryptosporydiozy

¹Praca wykonana w ramach międzynarodowego projektu badawczego finansowanego przez II Polsko-Amerykański Wspólny Fundusz im. Marii Skłodowskiej-Curie, nr MZ/NIH-96-288

u zwierząt stanowi rezerwuuar i źródło zarażenia dla człowieka (Current 1989). Zoonotyczna transmisja dotyczy szczególnie osób mających bezpośredni kontakt ze zwierzętami, m. in.: hodowców bydła, lekarzy weterynaryjnych, osób uprawiających jazdę konną, właścicieli psów i kotów oraz osób wizytujących farmy. Szacunkowe dane wskazują, iż rocznie około 200-500 milionów osób zaraża się *Cryptosporidium*. Dane te mogą być znacznie zaniżone ze względu na fakt, że w wielu laboratoriach nie stosuje się specyficznych metod umożliwiających wykrywanie tego pasożyta. Rozwój metod diagnostycznych (mikroskopowych, immunologicznych i molekularnych), który nastąpił w ostatnich latach pozwolił na wykrywanie kryptosporydiozy u ludzi i zwierząt na podstawie stwierdzenia oocyst, wykrycia antygenu lub DNA pasożyta w kale. Duża różnorodność metod diagnostycznych (do tej pory opisano około 20 metod barwienia) może jednak nastręczyć trudności w wyborze metody odpowiedniej dla danego laboratorium. Wybór ten powinien opierać się nie tylko na ocenie swoistości i czułości danej metody, ale także na czasochłonności, łatwości jej wykonania oraz kosztach badań. Dodatkową komplikacją w wyborze najlepszej metody jest niejednorodność konsystencji i składu kału, która zależy m. in. od stanu zdrowia, flory jelitowej oraz diety żywiciela. Toteż celem niniejszej pracy było porównanie użyteczności mikroskopowego wykrywania oocyst, swoistego koproantygeny oraz DNA w kale różnych gatunków żywicieli, a także porównanie stosowanych metod pod względem czasochłonności i kosztów odczynników.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badań stanowiło 979 prób kału uzyskanych od ludzi (266 prób) i zwierząt (713 prób). Próby pochodzące od ludzi pobrano od osób z grup podwyższonego ryzyka zarażenia tzn. z zaburzeniami ze strony układu pokarmowego o nieznannej etiologii (192 próby), zakażonych wirusem HIV (51 prób), mających kontakt ze zwierzętami i/lub ich odchodami (23 próby). Natomiast grupę zwierząt, od których pobierano próby do badań, stanowiły zwierzęta domowe (205 prób od bydła, 160 prób od owiec, 30 prób od koni, 80 prób od kotów, 277 prób od psów) i łowne (1 próba od jelenia szlachetnego, 1 próba od jenota, 2 próby od danieli, 7 prób od dzików). Materiał do badań otrzymano z 4 gospodarstwach rolnych, Centrum Wyszkożenia Jeździeckiego, Schroniska dla Zwierząt Bezdomnych, Kliniki Weterynaryjnej, a pozostałe dostarczyli właściciele zwierząt lub uzyskano je z odbytu zwierząt bezpośrednio po odstrzale. Większość prób (98%) wykorzystanych do badań stanowiły stolce uformowane, pozostałe próby obejmowały wypróżnienia biegunkowe lub luźne.

Metody mikroskopowe. Świeże próby kału emulgowano i badano równocześnie stosując dwie metody badania bezpośredniego rozmazu kału (w roztworach NaCl i IKI) oraz pięć metod barwienia utrwalonych rozmazów kału: barwienie he-

matoksyliną żelazistą, barwienie safraniną i błękitem metylenowym (Anonim 1991), barwienie fioletem anilino-karbolowo-metylowym i tartrazyną (Miláček i Vítovec 1985) oraz dwie metody barwienia acid-fast: zmodyfikowaną metodą Ziehl-Neelsena (Anonim 1991) i zmodyfikowaną metodą Kinyouna (Garcia i Bruckner 1997). Preparaty do barwienia wykonywano w formie cienkiego rozmazu (5,0 cm x 2,4 cm) i po wybarwieniu przeglądano mikroskopowo pod 1000-krotnym powiększeniem. W celu określenia gatunku *Cryptosporidium* na podstawie cech morfometrycznych w każdej próbie pozytywnej mierzono długość i szerokość oocyst, a także obliczano wskaźnik kształtu (długość oocyst/szerokość oocyst).

Metody immunologiczne. Każdą próbę kału badano także za pomocą testu diagnostycznego ProSpecT[®] *Cryptosporidium* Microplate Assay, wykrywającego koproantygen *Cryptosporidium* (CSA). Próby kału badano zgodnie z zaleceniami producenta. Do badań wykorzystano testy następujących serii: 970700, 970752, 970800, 970990, 980354, 980463, 980520, 980770, 980807, 990205, 990402. Aby sprawdzić swoistość komercyjnego testu immunoenzymatycznego zbadano 157 prób kału od ludzi i zwierząt zawierających inne gatunki pierwotniaków jelitowych.

Metody molekularne. W celu potwierdzenia mikroskopowej i/lub immunoenzymatycznej identyfikacji *Cryptosporidium* zbadano losowo wybrane 22 próby kału uzyskane od zwierząt wykorzystując technikę PCR. DNA pasożyta izolowano bezpośrednio z prób kału stosując metodę opracowaną przez da Silva i wsp. (1999). DNA *Cryptosporidium* wykrywano przy pomocy techniki PCR stosując parę starterów CPBDIAGF/CPBDIAGR (Johanson i wsp. 1995). Produkt amplifikacji porównywano z markerem (M5, DNA Gdańsk lub standard 100 pz, Gibco BRL) oraz kontrolą pozytywną.

Analiza statystyczna. Analizę porównawczą uzyskanych wyników badań oparto na dokładnym teście Fischera (Stanisz 1998).

WYNIKI

Oocysty i/lub swoisty koproantygen *Cryptosporidium* stwierdzono w 19 próbach kału spośród 266 prób (7,14%) uzyskanych od ludzi (Tabela 1). Koproantygen i oocysty tego pasożyta wykryto jedynie w pięciu próbach kału. W przypadku czterech prób wszystkie stosowane metody diagnostyczne były tak samo czułe, natomiast w jednej próbie kału, uzyskanej od 3-letniej dziewczynki, nie wykryto oocyst *Cryptosporidium* w rozmazie barwionym safraniną i błękitem metylenowym. Intensywność inwazji w pozytywnych próbach była niska; w preparatach stwierdzono tylko pojedyncze oocysty *Cryptosporidium*. W pozostałych 14 próbach stwierdzono tylko koproantygen CSA. Próby, w których wykryto zarówno oocysty, jak i koproantygen były z reguły wypróżnieniami biegunkowymi lub luźnymi. Natomiast większość prób, w których stwierdzono jedynie swoisty koproantygen *Cryptosporidium* stanowiły stolce uformowane. Ponieważ mikroskopowe przeglą-

danie rozmazów bezpośrednich w roztworze soli fizjologicznej lub IKI oraz preparatów barwionych hematoksyliną nie pozwoliło na wykrycie oocyst *Cryptosporidium*, metody te pominięto w analizie statystycznej, a także nie uwzględniono ich w Tabeli 1. Dane morfometryczne oocyst wykrytych w kale ludzi (średnia wielkość oocyst 4,3 x 4,0 μm ; SD \pm 0,3 x 0,1 μm ; wskaźnik kształtu 1,1). wskazują, iż osoby te były najprawdopodobniej zarażone *C. parvum*.

Tabela 1. Występowanie oocyst i koproantygeny CSA *Cryptosporidium* w badanych próbach

Żywiciel	Liczba prób	Liczba prób pozytywnych	Liczba prób pozytywnych wykryta za pomocą specyficznych metod					Test EIA
			Wg Ziehl-Neelsena	Wg Kinyouna	Rozmazy barwione			
					Safraniną i błękitem-metylenowym	Fioletem anilino-karbolowo-metylowym i tartrazyną		
Ludzie	266	19	4	4	4	4	4	
			1	1	0	1	1	
			0	0	0	0	14	
Bydło	205	59	39	39	39	39	39	
			6	6	0	6	6	
			1	0	1	1	1	
			1	1	0	0	1	
			1	0	0	0	1	
			1	1	1	1	0	
			2	0	0	0	0	
0	0	0	0	8				
Owce	160	17	15	15	15	15	15	
			1	1	1	1	0	
			0	0	0	0	1	
Konie	30	12	5	5	5	5	5	
			0	1	0	1	1	
			0	0	0	0	6	
Psy	227	3	0	0	0	0	3	
Koty	80	4	4	4	4	4	4	
Zwierzęta łowne	11	9	1	1	0	0	1	
			2	0	0	0	2	
RAZEM	979	123	84	79	70	78	119	

Wśród 205 prób uzyskanych od bydła zarażenie *Cryptosporidium* stwierdzono u 59 zwierząt (28,8%). Obecność oocyst oraz swoistego koproantygeny wykazano w 48 próbach kału (Tabela 1), przy czym w 9 próbach kału, przy stwierdzeniu obecności koproantygeny, nie wykryto oocyst w rozmazach barwionych safraniną i błękitem metylenowym (8 prób) i/lub w preparatach barwionych metodą Kinyouna (2 próby), a także w dwóch rozmazach barwionych fioletem anilino-karbolowo-

metylenowym i tartrazyną. Oprócz tego w kale pobranym od trzech cieląt wykryto jedynie oocysty *Cryptosporidium*; a w 8 próbach kału stwierdzono wyłącznie obecność koproantygeny. Oocysty *Cryptosporidium* stwierdzane w rozmazach ludzkiego kału, a także zwierząt były lepiej widoczne w preparatach barwionych metodami acid-fast (zmodyfikowaną metodą według Ziehl-Neelsena oraz według Kinyouna), a także w rozmazach barwionych safraniną i błękitem metylenowym niż w preparatach barwionych fioletem anilino-karbolowo-metylowym i tartrazyną. Wyniki pomiarów morfometrycznych oocyst stwierdzonych w kale bydła wskazują na to, iż najprawdopodobniej większość zwierząt (39) była zarażona *C. andersoni* (średnia wielkość oocyst $6,6 \times 5,2 \mu\text{m}$; SD $(0,6 \times 0,3)$ (m, wskaźnik kształtu 1,3), a dwanaście *C. parvum* (średnia wielkość oocyst $4,5 \times 4,1 \mu\text{m}$; SD $(0,4 \times 0,3)$ (m; wskaźnik kształtu 1,1).

Ogółem obecność *Cryptosporidium* stwierdzono w 17 próbach kału (10,6%) spośród 160 prób pobranych od owiec. W 15 próbach kału wykryto koproantygen oraz oocysty *Cryptosporidium* w rozmazach barwionych czterema metodami specyficznego barwienia (Tabela 1). Natomiast w pozostałych dwóch próbach kału wykazano obecność albo koproantygeny albo oocyst tego pasożyta. Analiza morfometryczna oocyst wykrytych w kale owiec wskazuje, iż zwierzęta te były zarażone *C. parvum* (średnia wielkość oocyst $4,4 \times 4,1 \mu\text{m}$; SD $\pm 0,4 \times 0,2 \mu\text{m}$; a wskaźnik kształtu 1,0).

Po zbadaniu pojedynczych prób kału od 30 koni zarażenie *Cryptosporidium* stwierdzono u 12 zwierząt (40%). W pięciu przypadkach stwierdzono obecność zarówno oocyst w preparatach barwionych czterema specyficznymi metodami, jak i koproantygeny (Tabela 1). Natomiast w jednej próbie zidentyfikowano koproantygen CSA, a także oocysty tylko w preparatach barwionych metodą Kinyouna oraz fioletem anilino-karbolowo-metylowym i tartrazyną. Ponadto, w sześciu próbach kału stwierdzono jedynie obecność koproantygeny *Cryptosporidium*. Morfometryczna analiza wielkości oocyst wykazała, iż najprawdopodobniej wszystkie konie były zarażone *C. parvum* (średnia wielkość oocyst $4,3 \times 4,0 \mu\text{m}$; SD $\pm 0,3 \times 0,3 \mu\text{m}$; wskaźnik kształtu 1,0).

W żadnej z 227 zbadanych prób kału od psów nie stwierdzono obecności oocyst *Cryptosporidium* (Tabela 1). Tylko w trzech próbach kału o luźnej konsystencji wykryto koproantygen tego pasożyta (1,3%).

Spośród 80 prób kału od pobranych od kotów *Cryptosporidium* stwierdzono w 4 próbach (5%). W próbach tych wykazano obecność zarówno oocyst, w preparatach barwionych wszystkimi metodami specyficznego barwienia, jak i koproantygeny (Tabela 1). Wyniki pomiarów wielkości oocyst pozwalają zakładać, iż wszystkie koty były prawdopodobnie zarażone *C. felis* (średnia wielkość oocyst $4,5 \times 3,8 \mu\text{m}$; SD $\pm 0,4 \times 0,2 \mu\text{m}$; wskaźnik kształtu 1,1).

Kryptosporydiozę stwierdzono u 9 zwierząt łownych (6 dzików, 2 danieli i jelenia szlachetnego) z 11 badanych. W sześciu próbach (5 od dzików i 1 od daniela)

wykryto tylko swoisty koproantygen CSA (Tabela 1). Ponadto, w jednej próbie kału pobranej od daniela stwierdzono koproantygen oraz oocysty w preparatach barwionych metodami acid fast. Natomiast dwie próby kału (od jelenia i dzika) były pozytywne tylko w rozmazach barwionych metodą Ziehl-Neelsena oraz w teście immunoenzymatycznym. Intensywność inwazji u zarażonych zwierząt była bardzo niska. Zasięg wielkości oocyst wykrytych w kale jelenia i daniela wchodzi w zakres rozmiarów oocyst *C. parvum*. Natomiast oocysta znaleziona w preparacie kału dzika miała mniejsze wymiary (4,0 x 4,0), co wskazywałoby na *C. felis*.

Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała, że wykrywanie koproantygeny CSA w kale ludzi i zwierząt łownych było bardziej czułą metodą niż wykrywanie oocyst w rozmazach kału – stwierdzono statystycznie istotne zależności ($p < 0,005$). Natomiast nie wykazano statystycznie istotnych różnic ($p > 0,005$), gdy porównywano czułość wszystkich metod diagnostycznych zastosowanych do wykrywania inwazji *Cryptosporidium* u bydła, koni, owiec, kotów i psów.

Tabela 2. Obecność oocyst, koproantygeny oraz DNA *Cryptosporidium* w losowo wybranych próbach kału od zwierząt

Nr próby	Żywiciel	Obecność		
		oocyst	koproantygeny	DNA
40	owca	+	+	+
88	owca	+	+	+
1	owca	+	+	+
2	owca	-	-	-
3	owca	-	-	-
4	owca	-	-	-
5	owca	-	-	-
6	owca	-	-	-
7	owca	+	+	+
8	owca	-	-	-
9	owca	-	-	-
10	owca	-	-	-
442	cielę	+	+	+
443	cielę	+	+	+
603	cielę	+	+	+
611	cielę	+	+	+
612	cielę	+	+	+
613	cielę	+	+	+
9	dzik	+*	+	-
10	dzik	-	+	-
5	daniel	+*	+	-
26	pies	-	+	-

Objaśnienia: * w rozmazach kału stwierdzano tylko pojedyncze oocysty.

Oceniając swoistość testu immunoenzymatycznego zbadano 157 prób kału od ludzi i zwierząt, w których stwierdzono obecność różnych gatunków pierwotnia-

ków jelitowych (*Blastocystis* sp., *Dientamoeba fragilis*, *Eimeria* sp., *Entamoeba bovis*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba polecki*, *Giardia intestinalis*, *Iodamoeba bütschlii*, *Isospora* sp.). Wszystkie badane próby były negatywne w teście EIA. Warto jednak w tym miejscu nadmienić, że przy pomocy testu ProSpecT w niniejszych badaniach wykrywano koproantygen *C. parvum*, *C. andersoni* i *C. felis*.

Całkowitą zgodność wyników badań mikroskopowych, immunologicznych i molekularnych stwierdzono w odniesieniu do 18 prób kału z 22 losowo wybranych (Tabela 2). Obecność oocyst, koproantygeny i DNA *Cryptosporidium* wykazano w 10 próbach uzyskanych od 6 cieląt i 4 owiec. Natomiast 8 prób kału od owiec dało wynik ujemny przy wykorzystaniu wszystkich trzech metod diagnostycznych. Występowanie zarówno oocyst, jak i koproantygeny CSA, przy braku produktu amplifikacji DNA *Cryptosporidium*, stwierdzono w kale dzika i daniela. Należy podkreślić, że w obu tych próbach liczba oocyst pasożyta była bardzo mała (w całym rozmazie z kału dzika wykryto tylko 1 oocystę, a u daniela 5 oocyst). Natomiast w próbach uzyskanych od psa oraz dzika wykazano wyłącznie obecność koproantygeny *Cryptosporidium*.

Porównanie czterech metod specyficznego barwienia oraz testu EIA pod względem czasochłonności i kosztów odczynników wykazało, iż komercyjny test immunoenzymatyczny jest najbardziej kosztowną i czasochłonną metodą (Tabela 3). Natomiast spośród metod specyficznego barwienia najdroższą i najbardziej czasochłonną metodą jest barwienie fioletem anilino-karbolowo-metylowym i tartrazyną. W przypadku pozostałych metod koszty i czasochłonność są porównywalne.

Tabela 3. Porównanie czterech barwień rozmazów kału w kierunku *Cryptosporidium* oraz testu immunoenzymatycznego pod względem czasochłonności i kosztów

Wartość/ jedną próbę	Metody				EIA
	Wg Ziehl- Neelsena	Wg Kinyouna	Safraniną i błękitem metylenowym	Fioletem anilino- karbolowo-metylowym i tartrazyną	
Czas (minuty)	70	90	60	100	120
Koszt (zł)	4,6	3,8	3,8	8,4	44,5

DYSKUSJA

W niniejszej pracy porównywano przydatność metod mikroskopowych i testu immunoenzymatycznego w identyfikacji *Cryptosporidium* w kale ludzi i różnych gatunków zwierząt. Uzyskane wyniki potwierdziły nieprzydatność rutynowych metod mikroskopowych stosowanych w diagnostyce pierwotniaków jelitowych w identyfikacji oocyst *Cryptosporidium*. Przy pomocy komercyjnego testu EIA wy-

kryto o 73,7% więcej przypadków kryptosporydiozy u ludzi i o 66,7% więcej u zwierząt łownych niż w przypadku mikroskopowego przeglądu rozmazów kału barwionych specyficznymi metodami. Stwierdzenie obecności koproantygeny CSA przy jednoczesnym braku oocyst nie jest zaskakujące, ponieważ antygen CSA jest wydzielany przez endogenne stadia pasożyta podczas namnażania. Zatem należy się spodziewać, że koproantygen CSA będzie obecny w kale nawet przy braku obecności oocyst pasożyta. Zdecydowana większość prób kału od ludzi i wszystkie próby od zwierząt, w których wykryto jedynie koproantygen, stanowiły wypróżnienia uformowane. Natomiast zarówno oocysty, jak i koproantygen CSA wykryto w biegunkowych lub luźnych próbach kału uzyskanych od ludzi. Takiej zależności nie stwierdzono w przypadku badania prób kału od różnych gatunków zwierząt.

Należy podkreślić, że stolce biegunkowe i luźne zawierają z reguły dużą liczbę oocyst pasożyta i wówczas metody mikroskopowe są w pełni satysfakcjonujące. Jednakże, kiedy kał ma prawidłową konsystencję, decyzja o wyborze odpowiedniej metody diagnostycznej staje się bardzo istotna, ponieważ takie wypróżnienia zawierają z reguły małą liczbę oocyst. Ponadto, wraz z procesem wygasania inwazji liczba oocyst *Cryptosporidium* w kale spada, a w przypadkach bezobjawowego zarażenia jest znikoma (Casemore i wsp. 1997). W takich sytuacjach metody mikroskopowe mogą być zawodne ze względu na swoją niską czułość. Weber i współpracownicy (1991) wykazali, iż 50 tysięcy oocyst/gram kału stanowi granicę ich wykrywalności. Oprócz tego, główną przeszkodą w stosowaniu metod mikroskopowych jest przerywane wydalanie oocyst z kałem. Zatem w tych przypadkach wykorzystanie testu immunoenzymatycznego staje się bardziej racjonalne, pod warunkiem, że wybrany test będzie charakteryzował się wysoką czułością i specyficznością.

Wykrywanie koproantygeny *Cryptosporidium* w kale ludzi przy zastosowaniu różnych wersji testu immunoenzymatycznego opisano tylko w kilku pracach. Ignatius i współpracownicy (1997) w swoich badaniach potwierdzili fakt, iż test ProSpecT był bardziej czuły, niż pozostałe zastosowane przez nich komercyjne testy immunoenzymatyczne (Merlin Diagnostika i Novum Diagnostica). Z kolei Kehl i wsp. (1995) porównywali czułość dwóch testów immunoenzymatycznych (ProSpecT *Cryptosporidium* i Color Vue *Cryptosporidium*) i stwierdzili, że oba testy immunoenzymatyczne były tak samo czułe (94,5%). Jednak autorzy cytowanej pracy podkreślają, że wykrywanie koproantygeny przy pomocy testu Color Vue było bardziej pracochłonne niż przy wykorzystaniu testu ProSpecT. Graczyk i współpracownicy (1996), którzy wykorzystali immunoenzymatyczny test ProSpecT *Cryptosporidium* Rapid Assay i dwa testy IFA w wykrywaniu 8 gatunków i 30 izolatów *Cryptosporidium* (w nielicznych próbach kału uzyskanych od ludzi i różnych gatunków zwierząt) stwierdzili, iż wszystkie testy wykazywały wysoką specyficzność i czułość (100%) jedynie w wykrywaniu izolatów o wysokim potencjale zarażenia ludzi (*C. parvum*). Jednakże nasze badania wykazały, że test ProSpecT był tak sa-

mo czuły jak metody specyficznego barwienia rozmazów kału w wykrywaniu *C. andersoni* (gatunek wcześniej uważany za *C. muris* – Lindsay i wsp. 2000), *C. felis* oraz izolatów *C. parvum* w kale bydła, koni i owiec, a także umożliwił wykrycie koproantygeny w kale psów, dzików, danieli i jelenia szlachetnego. Ponadto test EIA był także przydatny w identyfikacji kryptosporydiozy u zwierząt hodowanych w Poznańskim Ogrodzie Zoologicznym (Majewska i wsp. 1997). Niepełna zgodność wyników uzyskanych przy wykorzystaniu testu immunoenzymatycznego ProSpecT w tej pracy i w badaniach prowadzonych przez Graczyka i współpracowników (1996) może wiązać się z faktem, że amerykańscy badacze stosowali mniej czuły test ProSpecT Rapid Assay (granica wykrywalności 160 ng/ml, podczas gdy test ProSpecT Microplate Assay wykrywa już 20 ng/ml antygeny). Znaczną czułość testu ProSpecT Microplate Assay potwierdzili także Ignatius i współpracownicy (1997), którzy w swoich badaniach wykazali, iż test ten umożliwiał wykrywanie koproantygeny jeszcze przy rozcieńczeniu 1:10 000. Z drugiej strony nie wiadomo, czy różnice w wykrywaniu koproantygeny w kale bydła, w pracy Graczyka i współpracowników (1996) i w niniejszej badaniach, są wynikiem zmienności antygenowej izolatów *Cryptosporidium* (Nichols i wsp. 1991; Nina i wsp. 1992) występujących w różnych rejonach geograficznych, czy też mniejszą czułością testu ProSpecT Rapid Assay. Niemniej fakt występowania wspólnego antygeny CSA u większości gatunków *Cryptosporidium* umożliwia wykorzystanie testu ProSpecT Microplate Assay w praktyce weterynaryjnej. Jednak z drugiej strony określenie gatunku *Cryptosporidium* jest niezwykle istotne, ze względu na różną specyficzność żywicielską gatunków pasożyta, dociekania epidemiologiczne, czy oszacowanie ryzyka zarażenia ludzi.

Nasze badania potwierdziły całkowitą swoistość (100%) testu immunoenzymatycznego. Podobną właściwość testu ProSpecT wykazali w swoich badaniach także Dagan i współpracownicy (1995) oraz Graczyk i współpracownicy (1996). Listę gatunków pierwotniaków jelitowych nie wykazujących reakcji krzyżowej w tym teście, w niniejszych badaniach uzupełniono o dwa gatunki pełzaków – *Entamoeba bovis* i *E. polecki*. Na uwagę zasługuje jednak fakt, że w tych badaniach stwierdzono brak możliwości różnicowania gatunku *Cryptosporidium* przy wykorzystaniu testu EIA, ponieważ przy pomocy tej metody wykrywano koproantygen CSA zarówno *C. andersoni*, *C. parvum*, jak i *C. felis*.

W niniejszej pracy wykazano, że wszystkie cztery metody specyficznego barwienia rozmazów kału były tak samo czułe w identyfikacji oocyst w kale ludzi i zwierząt. Niewielkie różnice w wykrywalności oocyst, były statystycznie nieistotne. Niezgodności wynikające z niewykrywania oocyst przy pomocy metod specyficznego barwienia, przy obecności antygeny CSA, można tłumaczyć małą intensywnością inwazji. Z drugiej strony, niemożność wykrycia koproantygeny CSA w próbach kału, w których stwierdzono stosunkowo dużą liczbę oocyst *Cryptosporidium* (próby od cieląt i owcy) świadczy raczej o inhibicji reakcji immunoenzyma-

tycznej poprzez nieokreślone składniki kału, niż o braku rozpoznania samego antygenu.

Przeprowadzona w tych badaniach analiza morfometryczna oocyst wykazała, iż najprawdopodobniej zwierzęta były zarażone 3 gatunkami *Cryptosporidium*. Jednakże identyfikacja gatunku *Cryptosporidium* na podstawie wielkości oocyst bywa zawodna, ponieważ oocysty niektórych gatunków mają podobne wymiary. Zatem dopiero wykorzystanie technik molekularnych może umożliwić prawidłowe rozpoznanie gatunku oraz genotypu tego pasożyta. Jednakże dużym ograniczeniem w stosowaniu tych metod jest wysoki koszt specjalistycznej aparatury i odczynników.

W niniejszych badaniach, w celu porównania prawidłowości identyfikacji *Cryptosporidium* przy pomocy metod mikroskopowych i testu EIA, 22 losowo wybrane próby kału od zwierząt badano przy wykorzystaniu techniki PCR. W 4 próbach wykazano niezgodność wyników uzyskanych przy użyciu ww. metod. Z jednej strony, dwie próby, w których wykryto oocysty i koproantygen lecz nie stwierdzono DNA, można uznać za fałszywie pozytywne, tym bardziej, że w obu badanych próbach nie wykazano obecności inhibitorów polimerazy. Z drugiej jednak strony, przy mało intensywnej inwazji, kiedy oocysty są nieregularnie rozprzestrzenione w kale, w małej ilości materiału, jaką pobiera się w celu izolacji DNA pasożyta, oocyst może nie być. Z kolei w dwóch pozostałych próbach kału (od dzika i psa) wykazano jedynie swoisty koproantygen CSA. Prób tych nie należy raczej uważać za fałszywie dodatnie, ponieważ brak oocyst w kale, wiąże się z brakiem możliwości uzyskania DNA. Tak więc, także technika PCR może być zawodna w przypadku słabo nasilonej inwazji lub z powodu przerywanego wydalania oocyst.

Z porównywanych w tych badaniach metod specyficznego barwienia najdroższą, a także najbardziej czasochłonną była metoda barwienia fioletem anilino-karbolowo-metylowym i tartrazyną. Stwierdzono także, iż wykrycie oocyst w preparatach barwionych metodami acid-fast było łatwiejsze, niż w preparatach barwionych fioletem anilino-karbolowo-metylowym i tartrazyną. Ponadto wykazano, że barwienie safraniną i błękitem metylenowym jest trudniejsze do wykonania, ponieważ wymaga podgrzewania preparatu nad palnikiem, co wpływa także na wydłużenie czasu barwienia w przypadku badania licznych prób kału. Natomiast porównanie czterech metod specyficznego barwienia rozmazów kału oraz testu immunoenzymatycznego pod względem czasochłonności i kosztów odczynników wykazało, iż test EIA jest najbardziej kosztowną i czasochłonną metodą. Jednakże częściowe obniżenie kosztów można uzyskać badając równocześnie większą ilość prób kału. Z drugiej strony metoda ta jest mało pracochłonna i łatwa do wykonania, nawet dla osoby bez specjalnego przeszkolenia. Ponadto, laboratorium nie musi być wyposażone w drogi sprzęt (spektrofotometr), ponieważ stwierdzono całkowitą zgodność wizualnego i spektrofotometrycznego odczytu wyników testu EIA (Dagan i wsp. 1995, Majewska i wsp. 1999). Zaletami tego testu jest także możliwość wykorzy-

stania go w celach skringingowych, np. podczas epidemii kryptosporydiozy oraz wysoka czułość, szczególnie w przypadkach, gdy zarażenie było mało intensywne. Jednak pomimo swoich zalet test EIA, a także metody specyficznego barwienia nie mogą zastąpić rutynowych metod koproskopowego badania kału, których zaletą jest możliwość wykrywania innych gatunków pasożytniczych pierwotniaków jelitowych. Z drugiej jednak strony, metody stosowane w rutynowej diagnostyce nie pozwalają na wykrycie oocyst *Cryptosporidium*.

Prawidłowa interpretacja wyników badań kału zależy od pełnej informacji. To też negatywne wyniki badań laboratoryjnych na obecność pasożytów jelitowych, w których nie wymieniono stosowanych metod, są mało wiarygodne i mogą wprowadzać w błąd, ponieważ każda metoda diagnostyczna ma swoje wady i zalety.

Wybór odpowiedniej metody diagnostycznej powinien być dostosowany do potrzeb danego laboratorium. Decyzja ta powinna być oparta na wielu czynnikach włączając w to: koszty odczynników, liczbę wyszkolonego personelu, liczbę badanych prób, wyposażenie oraz wielkość laboratorium, a także czasochłonność, pracochłonność i łatwość wykonania testu.

LITERATURA

- Anonim. 1991. Basic laboratory methods in medical parasitology. WHO, Geneva, 18.
- Casemore D.P., Wright S.E., Coop R.L. 1997. Cryptosporidiosis – human and animal epidemiology. In: *Cryptosporidium and cryptosporidiosis* (Ed. R. Fayer). CRC Press, Boca Raton: 65-92.
- Current W.L. 1989. Cryptosporidiosis. In: *New strategies in parasitology*. (Ed. K.P.W.J. Mc Adam) K.P.W.J., Churchill Livingstone. Edinburgh, London, Melbourne, New York.
- Dagan R., Fraser D., El-On J., Kassis I., Deckelbaum R., Turner S. 1995. Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of *Cryptosporidium* spp. in stool specimens from infants and young children in field studies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 52: 134-138.
- Da Silva A.J., Bornay-Linares F.J., Moura I.N.S., Slemenda S.B., Tuttle J.L., Pieniazek N.J. 1999. Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens. *Molecular Diagnostic* 4: 57-64.
- Garcia L., Bruckner D.A. 1997. In: *Diagnostic Medical Parasitology*. ASM Press, Washington. D. C., 3rd ed: 638-641.
- Fayer R., Morgan U., Upton S.J. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology* 30: 1305-1322.
- Graczyk T.K., Cranfield M.R., Fayer R. 1996. Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (IFA) test kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts of species other than *Cryptosporidium parvum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 54: 274-279.
- Ignatius R., Eisenblätter M., Regnath T., Mansmann U., Futh U., Hahn H., Wagner J. 1997. Efficacy of different methods for detection of low *Cryptosporidium parvum* oocyst numbers or antigen concentrations in stool specimen. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 16: 732-736.
- Johanson D.W., Pieniazek N.J., Griffin D.W., Minser L., Rose J.B. 1995. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3849-3855.
- Kehl K.S., Cicirello H., Havens P.L. 1995. Comparison of four different methods for detection of

- Cryptosporidium* species. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 416-418.
- Lindsay D.S., Upton S.J., Owens D.S., Morgan U.M., Mead J.R. 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *Journal of Eucaryotic Microbiology* 47: 91-95.
- Majewska A.C., Kasprzak W., Werner A. 1997. Prevalence of *Cryptosporidium* in mammals housed in Poznań Zoological Garden, Poland. *Acta Parasitologica* 42: 195-198.
- Majewska A.C., Kasprzak W., Werner A., Kozakiewicz B. 1999. Investigations on cryptosporidiosis in humans and livestock from the same localities. *Acta Parasitologica* 44: 212-214.
- Miláček P., Vítovec J. 1985. Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitologica* 82: 50.
- Nichols G., Mclauchlin J., Samuel D. 1991. A technique for typing *Cryptosporidium* isolates. *Journal of Protozoology Research* 38: 237-240.
- Nina J.M.S., Mcdonald V., Deer R.M.A., Wright S.E., Dyson D.A., Chiodini P.L., Mcadam K.P.W.J. 1992. Comparative study of the antigenic composition of oocyst isolates of *Cryptosporidium parvum* from different hosts. *Parasite Immunology* 14: 227-232.
- Sloper K.S., Dourmashkin R.R., Bird R.B., Slavin G., Webster A.D.B. 1982. Chronic malabsorption due to cryptosporidiosis in a child with immunoglobulin deficiency. *Gut* 23: 80-82.
- Stanisz A. 1998. Przystępny kurs statystyki w oparciu o program STATISTICA na przykładach z medycyny. *Stat Soft Polska*, Kraków.
- Ungar B.L.P., Soave R., Fayer R., Nash T.E. 1986. Enzyme immunoassay detection of immunoglobulin M and G antibodies to *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunocompromised persons. *Journal of Infectious Diseases* 53: 570- 578,
- Weber R., Bryan R.T., Bishop H.S., Wahlquist S.P., Sullivan J.J., Juranek D.D. 1991. Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 1323-1327.

Zaakceptowano do druku 4 czerwca 2004