

MOŽNOSTI FILTRÁCIE OOCÝST *Cryptosporidium parvum* Z VODNÉHO PROSTREDIA PRE SYSTÉMY ON LINE STANOVENÍ

RNDr. Zuzana Velická, PhD., RNDr. Lívia Tóthová, PhD.

Výskumný ústav vodného hospodárstva, Nábr. L. Svobodu 5, 812 49 Bratislava, SR
tel.: 02/59343 415 (286), e-mail: velicka@vuvh.sk, tothova@vuvh.sk

Abstrakt

V minulosti sa sledoval výskyt oocýst *Cryptosporidium parvum* vo vodnom prostredí na Slovensku s ohľadom na ich možnú prítomnosť vo vodárenských nádržiach a podzemných zdrojoch pitných vôd. Výskumný ústav vodného hospodárstva je jedným z riešiteľov medzinárodného projektu DINAMICS, ktorý je zastrešovaný Európskou komisiou v rámci 6. rámcového programu. Tento projekt je zameraný na využitie nanotechnológií pre analýzu patogénnych mikroorganizmov, ktoré by mohli byť zneužitú v bioteroristických útokoch. Jedným z cieľových mikroorganizmov je aj *Cryptosporidium parvum*.

Pre klasické analýzy pre detekciu *Cryptosporidium parvum* sa využívajú náplňové filtre s vysokou kapacitou filtrovanej vody.

V rámci riešenia projektu DINAMICS sa pristúpilo k alternatívnym metódam filtrácie vzoriek vody z pohľadu on line analýz v prípade havarijných stavov. Pre takéto účely nie je vhodné využitie filtrácie veľkých objemov vzoriek, nakoľko sa predpokladá masívny výskyt sledovaných mikroorganizmov.

V tomto príspevku prezentujeme výsledky výťažnosti rôznych typov membránových filtrov pre účely predfiltrácie vody a následnej analýzy na úrovni nanotechnológií.

Charakteristika projektu DINAMICS

Medzinárodný projekt DINAMICS je zameraný na vývoj biologických nanosenzorov schopných detekcie patogénnych mikroorganizmov vo vodnom prostredí najmä s ohľadom na možné využitie týchto patogénnych mikroorganizmov v rámci bioteroristického útoku.

Hlavnými cieľmi riešenia tohto projektu sú:

- optimalizovať metódy vhodné pre odber vzoriek v prípade monitoringu aj v prípade havárie a vyvinúť postupy pre zakoncentrovanie vzoriek pre stanovenie patogénov, ktoré vyvolajú ochorenie aj pri veľmi nízkych infekčných dávkach ako je to v prípade *Cryptosporidium parvum* a *Giardia lamblia*,
- vytypovať miesta možného bioteroristického útoku u vybraných dodávateľov pitnej vody, vytypovanie bodov vo vodovodnej sieti dôležitých pre sledovanie kvality vody,
- odskúšanie viacerých materiálov pre použitie v nanotechnológii pri identifikácii patogénnych mikroorganizmov,
- vybratie druhov mikroorganizmov, ktoré by mohli ohroziť zdravie obyvateľstva prostredníctvom systémov zásobujúcich pitnou vodou,

- u vybraných druhov mikroorganizmov vytypovať úseky DNA, zhromaždiť zoznam génov vhodných pre bioinformačné metódy, vhodné na hybridizáciu a prípravu oligonukleotidových sond,
- pri sledovaných druhoch mikroorganizmov vyvinúť metódy pre účinnú lýzu buniek, odskúšať účinnosť a vhodnosť oligonukleotidových sond pomocou PCR reakcií,
- vypracovanie plánu pre priemyselné odskúšanie prototypu a validáciu, odskúšanie prototypu najskôr v laboratórnych podmienkach a v konečnej fáze aj v reálnom systéme.

Hlavným prínosom projektu bude využiteľné „lab-on-a-chip“ zariadenie na detekciu patogénov, využívajúce bodové rozpoznanie neznačenej DNA a jej následnú hybridizáciu. DINAMICS bude integrovať senzor na hybridizáciu DNA a signálny proces na silikónovom alebo polymérovom substráte. Detekcia bude založená na elektrickom signále a zachytenie signálu cez absorpciu UV žiarenia. Táto možnosť je založená na poznaní rôznej absorpcie UV žiarenia vyvolanej DNA. Takýto senzor by bolo možné využiť jednak v prípade havárií (medzi tieto je možné zaradiť aj bioterorizmus), jednak ako prostriedok systematického monitoringu vodovodnej siete, ktorý je neustále potrebný na zabezpečenie hygienicky nezávadnej vody pre obyvateľstvo a aj na celkové monitorovanie prostredia.

V tomto projekte využívame skúsenosti a výsledky získané z riešenia doktorandskej práce zameranej na sledovanie výskytu oocýst *Cryptosporidium parvum* a cýst *Giardia lamblia* vo vodnom prostredí na Slovensku.

Rozbor problematiky

Stanovenie patogénnych prvkov vo vodnom prostredí si vyžaduje sledovanie veľkého množstva testovanej vzorky vody, nakoľko sa jedná o parazity malých mikroskopických rozmerov, vyskytujúce sa vo vode v nízkej koncentrácii. Iná situácia nastáva samozrejme ak dochádza k havarijným situáciám, prípadne k rôznym živelným pohromám, ktoré zvyšujú riziko výskytu predmetných patogénov vo vode. Príkladom je zaznamenanie vysokého výskytu oocýst *Cryptosporidium parvum* v Českej republike, na lokalite Slezská Harta, kde bola zaznamenaná koncentrácia 7400 oocýst/100 l vody počas povodňovej situácie v roku 1997 [2].

Legislatíva týkajúca sa výskytu a sledovania patogénov vo vodnom prostredí na Slovensku sa vychádza z Direktívy 98/83/EC [1] a súčasne platného Nariadenia vlády 354/2006 [9]. Direktíva 98/83/EC pre kvalitu vody určenú pre ľudskú spotrebu označuje *Clostridium perfringens* ako indikátorový ukazovateľ pre vodu ovplyvnenú povrchovou vodou. Pozitívny výskyt *Clostridium perfringens* požaduje identifikáciu prítomnosti patogénnych mikroorganizmov, napr. *Cryptosporidium* (pozn. 2).

Stanovenie oocýst *Cryptosporidium parvum* a cýst *Giardia lamblia* vo vodnom prostredí sa uskutočňuje podľa súčasne platnej normy ISO 15553 [6]. Uvedená norma odporúča použitie koncentrácie na filtri Envirochek, prípadne Filta-Max. Podľa Dolejša [3] sa na základe publikovaných výsledkov ako najvhodnejšie filtre pre odber vzoriek na identifikáciu dvoch vybraných prvkov osvedčili filtre Envirochek (polypropylénová filtračná náplň v plastovom puzdre, odporúčaný prietok 2 l/min.) a Micro-Wynd (polypropylénová filtračná náplň v univerzálnom plastovom puzdre) obidva s veľkosťou pórov 1 µm. Výrobca uvádza výťažnosť pre filter Envirochek až 91 %. Uvedenými filtrami sa odporúča koncentrovať objemy vody nad 10 l.

Metodika spracovania vzoriek

Pri analýzách vzoriek vody v havarijných stavoch nie je možná a ani účelná filtrácia takýchto veľkých objemov. V takýchto extrémnych prípadoch sa predpokladá masívny výskyt trvalých štádií patogénnych organizmov, preto pre požadovanú identifikáciu patogénov je úplne postačujúca filtrácia menšieho objemu testovanej vzorky vody. Z tohto dôvodu sme testovali aj iné typy membránových filtrov pre účely prefiltrácie vzoriek vody a pre následné analýzy na úrovni nanotechnológií.

Vybrali sme si celkovo osem typov membránových filtrov:

- Gelman Sciences s veľkosťou pórov 0,8 μm a 0,45 μm
- Whatman s veľkosťou pórov 0,2 μm a 0,45 μm
- polykarbonát s veľkosťou pórov 0,2 μm a 0,45 μm
- Millipore s veľkosťou pórov 0,45 μm
- Nylon s veľkosťou pórov 0,2 μm .

Vzorky pitnej vody sme umelo kontaminovali reálnymi koncentráciami štandardného kmeňa oocýst *Cryptosporidium parvum*, od desiatky jedincov do sto jedincov v 10 ml. Vybrali sme zámerne nízke koncentrácie oocýst *Cryptosporidium parvum* nakoľko infekčná dávka sa pohybuje vo veľmi nízkych koncentráciách, podľa Dolejša a kol. je infekčná dávka pre človeka od 1 oocysty do 100 oocýst *C. parvum* [4]. Oocysty *Cryptosporidium parvum* sme získali z Parazitologického ústavu Českej akadémie vied v Českých Budějoviciach. Oocysty boli izolované z fekálií infikovaného hovädzieho dobytku trpiaceho kryptosporidiózou za použitia cézium chloridového gradientu na koncentráciu $1 \cdot 10^8$ oocýst/ml. Oocysty sme skladovali v redestilovanej vode (reverznou osmózou získanej vode) s prídavkom antibiotík a antimykotík pri 4 °C maximálne 6 mesiacov.

Cez každý vybraný membránový filter sme prefiltrovali vzorku destilovanej vody (Millipore) o objeme 10 ml, s rôznou inokuláciou oocýst *Cryptosporidium parvum* ($1,9 \cdot 10^3$ oocýst/10 ml, $1,9 \cdot 10^2$ oocýst/10 ml). Destilovanú vodu sme si vybrali preto, lebo neobsahuje žiadne nežiadúce komponenty, ktoré by mohli sťažovať samotnú filtráciu cez filter ako v prípade pitnej vody (abiosestón), prípadne iných kvapalných matric mlieko (tuky, bielkoviny) a jablková šťava (cukry, kvasinky) [12].

Po prefiltrovaní sme jednotlivé filtre farbili špecifickým farbením metylvioletou podľa Miláček a Vítovec [8] na zviditeľnenie oocýst *Cryptosporidium parvum*. Po farbení sme filtre vysušili a na podložnom sklíčku pozorovali pod olejovou imerziou pri zväčšení 10 x 100.

Výsledky a diskusia

Pri testovaní membránových filtrov sme celkovo zhodnotili osem typov filtrov, pričom jeden typ Nylon bol pre tieto účely testovania filtrácie vzoriek vody nevyhovujúci. Každý testovaný filter sme hodnotili dvakrát, čiže sme celkovo spracovali 20 membránových filtrov. Nevyhnutné je podotknúť, že predkladané výsledky zhrnuté v tab. 1 sú zatiaľ výsledkami predbežnými, nakoľko práce na danom projekte stále pokračujú a testovanie membránových filtrov pre účely prefiltrácie vzoriek vody budú i naďalej predmetom našich prác v nasledujúcom období.

Výsledky výťažnosti pre všetky typy testovaných filtrov uvádzame ako priemerné hodnoty z dvoch paralelných stanovení (Tab. 1). Filtre Gelman Science (0,45 μm) a Whatman (0,45 μm) sme testovali aj pri vyššej koncentrácii $1,9 \cdot 10^3$ oocýst/10 ml destilovanej vody. Pri tejto vyššej koncentrácii oocýst bola dosiahnutá pri

membránovom filtri od firmy Gelman Sciences (0,45 µm) dvojnásobne vyššia výťažnosť, až 45 %, v porovnaní s nižšou testovanou koncentráciou - $1,9 \cdot 10^2$ oocýst/10 ml destilovanej vody, kde sme zaznamenali 28 % výťažnosť. Veľmi nízke výťažnosti sme stanovili pri koncentrácii $1,9 \cdot 10^2$ oocýst/10 ml destilovanej vody na acetát nitrát celulóзовých filtroch Whatman (0,45 µm) len 4 % a na filtri s menšou pórovitosťou, Whatman (0,2 µm), len 9,5 %. Pri polykarbonátových filtroch s veľkosťou pórov 0,2 µm a 0,45 µm sme stanovili porovnateľnú pomerne vysokú výťažnosť 62 % a 67 %. Polykarbonátové filtre sú veľmi tenké a jemné, preto bolo potrebné s nimi pri jednotlivých krokoch farbenia pracovať opatrne. Filtrami Millipore, zloženými z acetát nitrát celulózy, sme získali najvyššie percento výťažnosti až 85 %.

Pri filtrácii inokulovanej destilovanej vody cez filtre Nylon (0,2 µm) nebola možná kvantifikácia oocýst *Cryptosporidium parvum*, nakoľko po špecifickom farbení farbivo metylvioleť prešlo do pórov filtra, čo spôsobilo tmavofialové sfarbenie filtra bez možnosti kvantifikácie oocýst olejovou imerziou. Tento filter nie je vhodný pre účely predfiltrácie vody a následnej analýzy na úrovni nanotechnológií, uvedeným spôsobom spracovania vzorky.

Tabuľka 1. Porovnanie výťažnosti oocýst *Cryptosporidium parvum* s príslušnou koncentráciou v modelovej vzorke destilovanej vody pre vybrané typy membránových filtrov

Typ testovaného filtra	A	B	C	D	E	F	G
Koncentrácia oocýst (oocysty/ 10 ml dest. vody)	výťažnosť (%)						
$1,9 \cdot 10^3$	-	45	-	22	-	-	-
$1,9 \cdot 10^2$	47	28	9,5	4	62	67	85

Vysvetlivky:

A - Gelman Sciences (priemer 25 mm, veľkosť pórov 0,8 µm)

B - Gelman Sciences (priemer 25 mm, veľkosť pórov 0,45 µm)

C - Whatman (priemer 47 mm, veľkosť pórov 0,2 µm)

D - Whatman (priemer 47 mm, veľkosť pórov 0,45 µm)

E - polykarbonát (veľkosť pórov 0,2 µm)

F - polykarbonát (veľkosť pórov 0,45 µm)

G - Millipore (veľkosť pórov 0,45 µm)

Výťažnosti dosiahnuté membránovými filtrami (Millipore, Whatman, polykarbonát a iné) sme porovnali aj s výťažnosťami získanými cartridge filtráciou na filtroch Micro-Wynd a Envirochek, ktorá bola cieľom inej štúdie. Výťažnosť oocýst z pitnej vody (s koncentráciou $4 \cdot 10^1$ - $4 \cdot 10^3$ oocýst/10 l) pri použití filtra Envirocheck sa pohybovala od 33 do 78 %, pri použití filtra Micro-Wynd od 33 do 68 %, čo sú porovnateľné výsledky aké sme dosiahli pri filtrácii cez sledované membránové filtre. Na základe našich výsledkov môžeme konštatovať, že na výťažnosť oocýst mal vplyv nielen spôsob separácie, ale aj zloženie kvapalnej fázy [12].

Rôznymi spôsobmi filtrácie a výťažnosťami stanovenia sa zaoberali aj iní autori vo svojich prácach [5, 13, 11, 7, 10]. Franco a kol. [5] spolu s kolegami sledovali podobne ako my efektívnosť stanovenia oocýst *Cryptosporidium parvum* a cýst *Giardia lamblia*, v prípade týchto autorov však vo vzorkách povrchových vôd, v rieke Atibaia v Brazílii.

Autori overovali dva typy metód stanovenia patogénov: membránovú filtráciu s následnou eluáciou filtra v 0,1 % Tween 80 (RM metóda), ktorou dosiahli vyššiu výťažnosť, v porovnaní s druhou použitou metódou stanovenia („the acetone-dissolution method“ - ADM metóda), pre *Cryptosporidium* 41,6 % a pre *Giardia* až 91,8 %. Pre RM metódu použili filtre podobne ako pri našej štúdií, Millipore, ale s väčšou veľkosťou pórov 3 μm . Druhou použitou metódou bola metóda riedenia acetónom („the acetone-dissolution method“) (ADM), ktorou získali výťažnosti pre *Cryptosporidium* 30,0 % a pre *Giardia* len 4,0 %. My sme používali tak isto filtre Millipore 0,45 μm , nakoľko veľkosť oocýst *Cryptosporidium parvum* je 2-6 μm , čo bolo predpokladom pre zachytenie oocýst na filtri. S použitými filtrami Millipore sme však pri stanovení oocýst *Cryptosporidium parvum* získali až dvojnásobne vyššiu výťažnosť (87 %) v porovnaní s výsledkami Franco a kol. (41,6 %), čo môžeme však pripisovať aj tomu, že my sme pracovali s destilovanou vodou menšieho objemu ako uvádzajú autori, ktorí filtrovali povrchovú vodu z rieky, kde je predpoklad vyššieho množstva rušivých faktorov, ako je napr. abiosestón, riasy, detrit a iné [5]. Výťažnosťou membránových filtrov pri sledovaní výskytu oocýst kryptosporídií a cýst giardií sa zaoberali aj iní autori [13]. Celkovo testovali päť filtrov: Pall Envirochek (EC), Envirochek pre väčšie objemy (EC-HV), membránové filtre Millipore, Sartorius membránové filtre (SMF) a filter Filta-Max (FM). Filtrovali destilovanú a povrchovú vodu o koncentrácii 10 oocýst a 10 cýst/1 liter. Najvyššiu výťažnosť dosiahli pri destilovanej vode filtráciou filtrom Filta-Max (oocysty 28.2 +/- 8, cysty 49.8 +/- 12.2). Autormi dosiahnutá výťažnosť je v porovnaní našimi výsledkami nižšia pri použití filtra Millipore. V prípade testovania filtrácie pitnej vody cez filter Pall Envirochek sa nami dosiahnutá výťažnosť pohybovala až v rozmedzí od 33 do 78 %, pričom my sme testovali vyššiu koncentráciu oocýst kryptosporídií ($4 \cdot 10^1$ - $4 \cdot 10^3$ oocýst/10 l), na väčšom objeme pitnej vody až 10 l v porovnaní s výsledkami Wohlsena a kol [13]. Iný typ filtra použili na univerzite v Japonsku [11]. Sledovali výskyt *Cryptosporidium parvum* v prírodných vzorkách vody použitím fluorescencie in situ na membránovom filtri. Na filtráciu používali hydrofilný polytetrafluoretylenový filter (FISH), ktorým získali až 98.8 +/- 0.4 % výťažnosť. Podľa Shepherd a Wyn-Jonesa celulózo-acetátovým filtrom (veľkosť pórov 1,2 μm) je možné dosiahnuť vysokú výťažnosť pre oocysty *Cryptosporidium parvum*, ktoré stanovovali v pitnej a povrchovej vode (nie je uvedené percentuálna výťažnosť). Shepherd a Wyn-Jones navyše tvrdia, že celulózo-nitrátový filter (veľkosť pórov 3,0 μm) nie je vhodný pre cysty *Giardia* [10]. Vysokú výťažnosť 70,5 % pre oocysty *Cryptosporidium parvum* na celulózo-acetátovom filtri dosiahli McCuin a kol. [7]. Naopak pri našich pokusoch bola výťažnosť práve na celulózo-acetátových filtroch Whatman najnižšia v porovnaní s ostatnými typmi membránových filtrov.

Záver

Z doterajších výsledkov testovania membránových filtrov pre účely prefiltrácie vzoriek vody a následnej analýzy na úrovni nanotechnológií sa ako najvhodnejšie zdajú byť filtre Millipore a polykarbonátové filtre, ktorými sa dosiahli najvyššie výťažnosti pri stanovení oocýst *Cryptosporidium parvum* v destilovanej vode.

V práci s membránovými filtrami sa naďalej pokračuje a výsledkom by malo byť porovnanie výťažnosti už nami otestovaných membránových filtrov (Millipore, Whatman a iné) a cartridge filtrov (Micro-Wynd a Envirochek) po zakoncentrovaní vzoriek vody inokulovaných oocystami kryptosporídií jednotlivými krokmi

centrifugácie pre účely predfiltrácie vody a následnej analýzy vzoriek na úrovni nanotechnológií .

PodĎakovanie

Práca bola vypracovaná za podpory projektu DINAMICS IP 026804-2.

Literatúra

1. COUNCIL DIRECTIVE 98/83/EC, 1998. Council Directive 98/83/EC of the quality of water intended for human consumption. Official Journal of the European Communities.
2. DITRICH, O., PUŽOVÁ, G., DOLEJŠ, P, MACHULA, T., 1998. Výskyt *Cryptosporidium parvum* ve vybraných zdrojích pitné vody. Sbor. "Slovenské a české parazitologické dny", Tále, s. 5.
3. DOLEJŠ, P., DITRICH, O., KALOUSKOVÁ, N., POSPÍŠILOVÁ, Z., MACHULA, T., 1997. Výskyt *Cryptosporidium parvum*, *Giardia intestinalis* a *Cyclospora cayetanensis* ve vybraných zdrojích a v upravené pitné vode. Závěrečná správa, Parazitologický ústav AV ČR, České Budějovice, EPO 0960986669, s. 7-14.
4. DOLEJŠ, P., DITRICH, O., MACHULA, T., KALOUSKOVÁ, N., PUŽOVÁ, G., 1999. Odstraňování *Cryptosporidium parvum* a *Giardia intestinalis* při úpravě pitných vod. Sbor. Konf. "Aktuální otázky vodárenské biologie", VŠCHT Praha, s. 78-82.
5. FRANCO, R. M. B., ROCHA-EBERHARDT, R., CASTUSIO NETO, R., 2001. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the atibaia river, Campinas, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 43: 107-109.
6. ISO 15553, 2003. Water quality – isolation and identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water.
7. MCCUIN, R.M., BUKHARI, Z., CLANCY, J.L., (2000). Recovery and viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia intestinalis* cysts using the membrane dissolution procedure. Can J. Microbiol., 46(8):700-707.
8. MILÁČEK, P., VÍTOVEC, J., 1985. Differential staining of *Cryptosporidium* by aniline carbomethylviolet and tetrazine in smears of faeces and scraping of intestinal mucosa. Folia Parasitol. (Prague), 32: 14-17.
9. Nariadenie vlády SR Z.z. č. 354/2006, ktorým sa ustanovujú požiadavky na vodu určenú na ľudskú spotrebu a kontrolu kvality vody určenej na ľudskú spotrebu.
10. SHEPHERD, K.M., WYN-JONES, A.P., (1996). An evaluation of methods for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. Appl. Environ. Microbiol., 62 (4): 1317-1320.
11. TAGUCHI, T., SHINOZAKI, Y., TAKEYAMA, H., HARAGUCHI, S., YOSHINO, M., KANEKO, M., ISHIMORI, Y., MATSUNAGA, T., 2006. Direct counting of *Cryptosporidium parvum* oocysts using fluorescence in situ hybridization on a membrane filter. J. Microbiol. Methods, 67 (2): 373-380.
12. VELICKÁ, Z., TÓTHOVÁ, L., PETRÍKOVÁ, J., 2006. Problémy kvantifikácie kryptosporídií z troch typov kvapalných matric. In: Pitná voda 2006. Sborník konference. 8. pokračování konferencí Pitná voda z údolních nádrží. Tábor, 5.6.-8.6. 2006. České Budějovice: W&ET Team, 2006. s. 39-44.
13. WOHLSEN, T., BATES, J., GRAY, B., KATOULI, M., 2004. Evaluation of five membrane filtration methods for recovery of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from water samples. Appl. Environ. Microbiol., 70 (4):2318-2322.