

Laboratory and Epidemiology Communications

Genotyping of *Giardia* Isolates from Humans in Japan Using the Small Subunit Ribosomal RNA and Glutamate Dehydrogenase Gene Sequences

Niichiro Abe*, Isao Kimata¹ and Masaharu Tokoro²

Department of Microbiology, Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, Osaka 543-0026,

¹Department of Protozoal Diseases, Graduate School of Medicine, Osaka City University, Osaka 545-8585 and

²Department of Parasitology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640

Communicated by Takuro Endo

(Accepted January 20, 2005)

The flagellate *Giardia intestinalis* (syn. *G. lamblia*, *G. duodenalis*) is a well-known intestinal parasite which causes enteric diseases in humans, livestock, and companion animals. Recent molecular studies have shown that *G. intestinalis* is composed of at least seven genetically distinct but morphologically identical assemblages (Assemblages A to G), and that most of these assemblages appear to have different host preferences, e.g., Assemblages C and D are found in dogs, Assemblage E in hoofed livestock, Assemblage F in cats, and Assemblage G in rats (1). Assemblage A, however, consists of isolates that can be classified into two genetic groups (1): genetic group A-I is isolated from a variety of animals including humans, while Assemblage A-II is isolated exclusively from humans. Assemblage B consists of a genetically diverse group of mostly human isolates, but some isolates from animals are included. Thus, the *G. intestinalis* isolates that have the potential for zoonotic transmission seem to be restricted within narrow genetic groups, specifically Assemblages A and B (1).

In Japan, giardiasis has been classified as a category V notifiable infectious disease in the National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases under the Law Concerning the Prevention of Infectious Diseases and Medical Care for Patients of Infections enacted in April of 1999. Although approximately one hundred cases of this infection were reported annually between 2000 and 2004 (<http://idsc.nih.gov.jp/iasr/virus/virus-e.html>), the molecular epidemiology of *Giardia* in Japan remains unclear. To date, only two human isolates have been genotyped as Assemblage B in Japan (2,3). In the present study, we genotyped three isolates of *G. intestinalis* from humans in Japan using both small subunit ribosomal RNA and glutamate dehydrogenase gene sequences.

The three isolates (GH-125, GH-126 and GH-135) examined in the present study were isolated from Japanese individuals: isolates GH-125 and GH-126 were from asymptomatic individuals living in Osaka, and GH-135 came from a diarrheal HIV-positive patient in Tokyo. *Giardia* cysts were purified from each fecal sample by the sucrose centrifugal flotation method (4), and the genomic DNA was extracted and purified following the method reported previously (4,5).

Giardia diagnostic fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with the following primer pairs targeting the different gene loci: RH11 and RH4 for the *Giardia* small subunit ribosomal RNA gene (SSUrDNA) (6) and GDH1 and GDH4 for the *Giardia* glutamate dehydrogenase gene (GDH) (7). PCR amplification of SSUrDNA was performed using LA Taq polymerase with 2X GC buffer I (LA Taq) (TaKaRa Shuzo Co., Ltd., Otsu, Japan), and amplification of GDH using Ex Taq polymerase with 10X Ex Taq buffer (Ex Taq) (TaKaRa Shuzo) as reported previously (5). Sequencing of the PCR products and phylogenetic analysis were performed following the methods reported previously (2,8). The partial sequences of the SSUrDNA and GDH of each isolate were deposited in the GenBank database under accession numbers AB195219-AB195224.

SSUrDNA and GDH were successfully amplified in all isolates examined in the present study (data not shown). Partial sequences of the SSUrDNA of GH-125 and GH-126 were found to be identical to those of BAH40C11 and BAC2 that are known to belong to Assemblage A. Similarly, GH-135 had a sequence identical to those of BAH-12 and Ad-28 in Assemblage B (Fig. 1A). More precisely, analysis of GDH partial sequences (592 bp) made it possible to distinguish GH-125, which had a sequence identical to those of Ad-2 and Bris-136, from GH-126 by 3 bp differences, even though they were both classified into the anthroponotic genotype Assemblage A-II (Fig. 1B). Again, the GDH partial sequence of GH-135 was almost identical to that of BAH-12 with 2 bp differences and was grouped into zoonotic Assemblage B (Fig. 1B).

Recently, two human isolates of *Giardia*, GH-156 and GH-158, were genotyped as Assemblage B by phylogenetic analysis using GDH partial sequences in Japan (2,3). In addition, three distinct genotypes, pertaining to Assemblages A-I, D and E, have been isolated from a ferret, dogs and calves, respectively (2,5,8). Genotypes of Assemblage A-I are known to have wider range of host species and have the potential to infect humans, while Assemblages D and E are known to be host-specific and non-infective to humans. Based on the results reported in the present experiment together with those reported elsewhere (2,3,8), there are three *Giardia* genotypes present in Japan that are either of zoonotic (Assemblage A-I and Assemblage B) or anthroponotic (Assemblage A-II) potential for human infection. Further genetic analysis of both human and animal isolates of this microbe is needed to gain greater insight into the molecular epidemiology of endemic *G. intestinalis* in Japan.

*Corresponding author: Mailing address: Department of Microbiology, Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan. Tel: +81-6-6771-3147, Fax: +81-6-6772-0676, E-mail: n.abe@iphes.city.osaka.jp

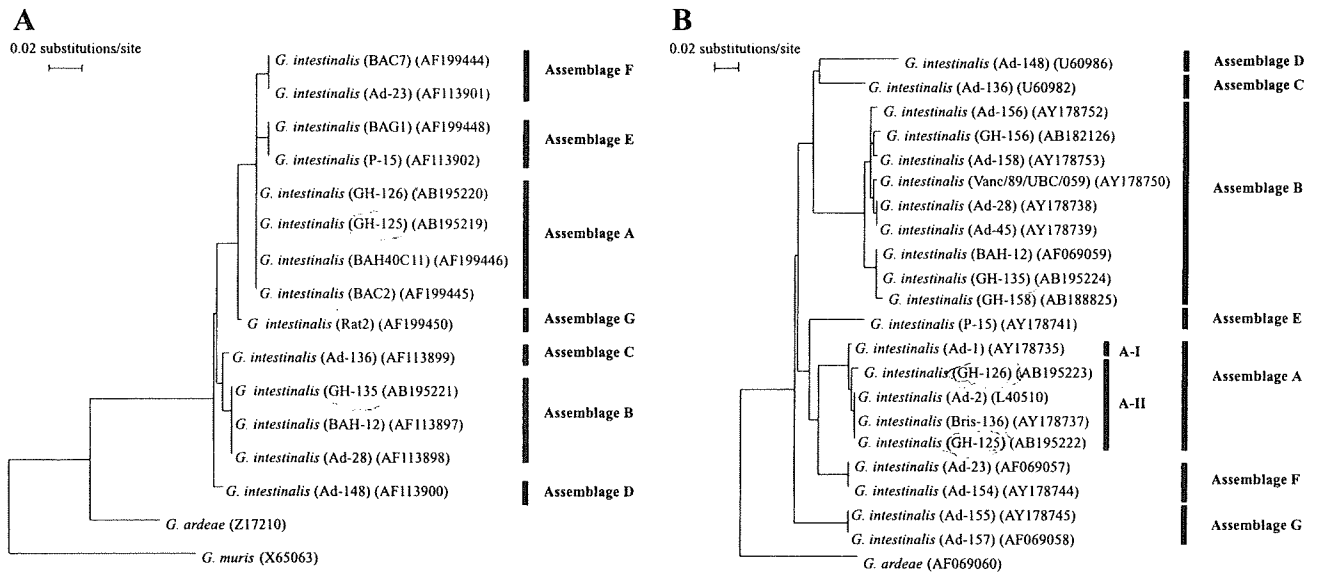


Fig. 1. Phylogenetic relationships of the isolates from humans examined in the present study to other *Giardia* spp. and *G. intestinalis* genotypes as inferred by neighbor-joining analysis, based on the nucleotide sequences of SSUrDNA (A) and GDH (B). Names of the isolates and accession numbers in GenBank are shown in parentheses.

REFERENCES

1. Monis, P. T. and Thompson, R. C. A. (2003): *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? *Infect. Genet. Evol.*, 3, 233-244.
2. Matsubayashi, M., Kimata, I. and Abe, N.: Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from a human and calf in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* (in press).
3. Abe, N., Nakamura, S. and Kimata, I. (2005): An imported case of mixed-infection with *Giardia* and *Cryptosporidium* parasites in Japan. *Seikatsu Eisei*, 49, 48-51.
4. Abe, N., Kimata, I. and Iseki, M. (2002): Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from a patient and a dog in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 64, 165-168.
5. Abe, N., Kimata, I. and Iseki, M. (2003): Identification

- of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of the PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. *J. Vet. Med. Sci.*, 65, 29-33.
6. Hopkins, R. M., Meloni, B. P., Groth, D. M., Wetherall, J. D., Reynoldson, J. A. and Thompson, R. C. A. (1997): Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J. Parasitol.*, 83, 44-51.
7. Homan, W. L., Gilsing, M., Bentala, H., Limper, L. and Knapen, F. (1998): Characterization of *Giardia duodenalis* by polymerase-chain-reaction fingerprinting. *Parasitol. Res.*, 84, 707-714.
8. Abe, N., Read, C., Thompson, R. C. A. and Iseki, M.: Zoonotic genotype of *Giardia intestinalis* detected in a ferret. *J. Parasitol.* (in press).

「報 文」

プロテインラベリング法で蛍光標識したクリプトスポリジウム
オーシストのオーシスト検出検査及び除去試験への適用

稲 田 康 志

大阪市水道局工務部水質試験所

木 俣 勲

大阪市立大学医学部医動物学教室助手

塩 出 貞 光

大阪市水道局工務部水質試験所主査

石 本 知 子

大阪市水道局工務部水質試験所

井 関 基 弘

金沢大学大学院医学系研究科
寄生虫感染症制御学教授・医博

要旨：クリプトスポリジウムオーシスト測定時の、測定用標本への陽性対照オーシストの混入による誤陽性の防止対策として、陽性対照オーシストを予め蛍光標識する方法について検討した。その結果、市販の Protein Labeling Kit を用いることで *C. parvum* オーシストを蛍光標識できることが分かった。また蛍光標識後、市販 FITC 蛍光抗体での 2 重染色が可能なることから、蛍光顕微鏡の励起フィルターを切り替えて観察することにより、陽性対照オーシストと試料中のオーシストの判定が可能となった。さらに蛍光標識後のオーシストを添加回収試験へ使用し、凝集沈澱・砂沓過でのオーシストの除去性について調査した。

キーワード：クリプトスポリジウム、蛍光染色、凝集・沈澱除去、急速砂沓過

分類項目：原虫 (120506)、凝集・沈澱 (120702)、沓過 (120703)

1. はじめに

平成 8 年に発生した水道水によるクリプトスポリジウム症の集団感染¹⁾以後、大阪市水道局では、厚生省（現：厚生労働省）が示した「水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法」²⁾（以下暫定試験法）を用いて、原水及び浄水中のクリプトスポリジウムを測定してきた。暫定試験法では、測定操作における蛍光色素の染色効果を確認すること、及び試料中のクリプトスポリジウムを間違いなく判定することを目的として陽性対照オーシストが使用されている。陽性対照オーシストは不活化されているため感染等の危険はないものの、測定時に必ず用いることから、筆者らは陽性対照オーシストが何らかの原因で測定用標本へ混入した場合に、測定結果が誤って陽性と判定されるおそれがあると考えてきた。操作ミス、又は以前に使用した陽性

対照オーシストの汚染などにより、陽性対照オーシストが測定用試料または検鏡用の標本に混入した場合でも、それらが陽性対照オーシストであることが容易に識別できれば、クリプトスポリジウムを含まない陰性の試料の判定を誤って陽性としてしまうことを防止できる。

そこで本研究では、クリプトスポリジウム試験における初の試みとして、たんぱく質を蛍光標識できるプロテインラベリングキットを用いたクリプトスポリジウムオーシストに対する蛍光標識、及び蛍光標識したオーシストの市販オーシスト検出用蛍光抗体との反応性について検討を行った。

次に凝集沈澱、及び砂沓過によるクリプトスポリジウムの除去実験を蛍光標識したオーシストを用いて行った。これまで報告されているクリプトスポリジウムオーシストを用いた凝集沈澱や砂沓過による除去の実験はほとんどが国外で行われた

ものであり、国内での報告例は見あたらない。国外で行われた最近の実験では、ジャーテスターや砂汙過カラムを用いた室内実験及びパイロットプラントを用いた報告例があり、それらの除去結果は硫酸バンドを用いた凝集沈澱処理^{3, 4)}では0.6 log~2.0log、急速砂汙過処理⁵⁾では1.6log~4.2 log、凝集沈澱-急速砂汙過処理^{3, 4, 6, 7)}では2.7 log~6.6log 以上であった。処理方法が同じであっても処理効果に比較的大きな差が認められる理由として、実験時における水温、pH 値、凝集剤注入率、原水濁度、汙材の粒径、汙層厚など様々な要因に影響されていると推定される。そこで、大阪市水道局の凝集沈澱、急速砂汙過におけるクリプトスポリジウムの基本的な処理能を知る目的で、凝集剤の注入率、凝集 pH 値を実際の凝集沈澱池と同条件としたジャーテスト及び実際の砂汙過池に使用している汙材を使用し、汙過速度を同じ条件にしたガラスカラムによる除去実験を行った。

2. クリプトスポリジウムオーシストの蛍光標識方法及び除去実験方法

2.1 オーシストの蛍光標識方法

蛍光標識を行ったオーシストは、ヒト由来の重症複合免疫不全マウスで継代維持している *C. parvum* HNJ-1 株を精製したものをを用い、蛍光標識用の試薬にはプロテインラベリングキット (Molecular Probes 社製) を用いた。標識方法は、オーシスト原液500 μ L に重炭酸緩衝液を50 μ L 添加後、蛍光標識色素の入ったバイアルへ移し替え、室温で1時間攪拌した。その後、結合しなかった蛍光色素を除去するためにリン酸緩衝生理食塩水 (以下 PBS) による遠心洗浄を、マイクロ冷却遠心分離器を用いて、3分間、5,300 \times g で5回繰り返し行い、最後に10%ホルマリン添加リン酸緩衝生理食塩水を加えて1 mL として不活化し、冷蔵保存した。この蛍光標識操作により得られたオーシスト数は0.5~2 \times 10⁶個/mL の範囲であった。

2.2 使用した蛍光色素の種類と蛍光標識されたオーシストの特性の確認

2.2.1 赤色蛍光標識

今回使用した蛍光標識色素を表-1に示した。陽性対照用オーシストは、赤色蛍光色の Texas-Red-

X 及び Alexa 594 (以下 TXR オーシスト、ALX 594オーシスト) で標識した。これらの蛍光はクリプトスポリジウム測定時の直接蛍光抗体染色に使用する FITC (緑色蛍光) と全く異なる色調である。また、検鏡時に使用する蛍光顕微鏡の励起フィルターは FITC では B 励起フィルターである。一方、赤色蛍光色素では G 励起フィルターと異なることから、二重染色した場合も容易に識別できる。これら二種類の蛍光標識オーシストを陽性対照オーシストとして用いるためには、FITC 染色における乾燥、メタノール処理、染色の過程及び DAPI 染色の染色、乾燥の過程において未標識オーシストと同じ挙動を示す必要がある。また、FITC 染色及び DAPI 染色後に、クリプトスポリジウムであることを確認するための、B 励起下での FITC 染色による緑色蛍光、及び UV 励起下での DAPI 染色による青色蛍光を呈することと、更には標識オーシストであることを確認するための G 励起下での赤色蛍光を呈する必要がある。これらのことを確認するために、TXR オーシスト、ALX 594オーシスト及び未標識オーシストの計3種類を別々のウエルスライド (Waterborne 社製 S100-3 Super Stick Slides) 上において50℃で1時間乾燥させ、FITC 染色及び DAPI 染色後、落射蛍光顕微鏡で通常の標本と染色状態に違いがないかを比較した。なお、FITC 染色には、Waterborne 社製 Aqua-Glo G/C、及び Biotechnology Frontier 社製 Easy-StainC&G の二種類を用いて、DAPI 染色との多重染色性を確認した。

2.2.2 緑色蛍光標識

前述の赤色蛍光は藻類の持つクロロフィルの自家蛍光と類似し、添加実験に使用した場合、藻類との判別が困難なことから、添加実験用オーシストは FITC と同様の緑色蛍光の Oregon Green 488

表-1 プロテインラベリングキットの概要

蛍光色	蛍光色素	励起/蛍光 (nm)	類似蛍光色素	用途
赤色	Texas-Red-X	595/615	—	測定時の陽性対照
暗赤色	Alexa 594	590/617	Texas Red	
緑色	Oregon Green 488	496/524	Fluorescein	添加回収実験
緑色	Alexa 488	495/519	Fluorescein	

及び Alexa 488 (以下 ORG オーシスト、ALX 488 オーシスト) を用いて標識した。

水道水を使用した添加実験では、標識オーシストの蛍光が塩素によって消失しないことが求められる。そこで、二種類の緑色蛍光オーシストを遊離塩素濃度が0.4mg/Lの水道水に加えて24時間室温で放置し、緑色蛍光の変化を調べた。

また、免疫磁気ビーズ法を用いた分離精製操作において標識オーシストが未標識オーシストと同じ挙動を示すこと、及び精製後も標識蛍光を保持していることを確認する必要がある。そこで、免疫磁気ビーズ捕集後のオーシスト解離に用いる0.1N 塩酸及び、添加実験後の処理水に残存するフロックの除去を目的として加える硝酸(1+10)による蛍光色の変化を調べた。また、緑色蛍光標識オーシスト(ALX 488)と未標識オーシストをそれぞれPBS10mL中に約100個添加し、図-1で示した方法でオーシストを回収して、数を比較した。なお、免疫磁気ビーズにはDYNAL社製Dynabeadsを用いた。

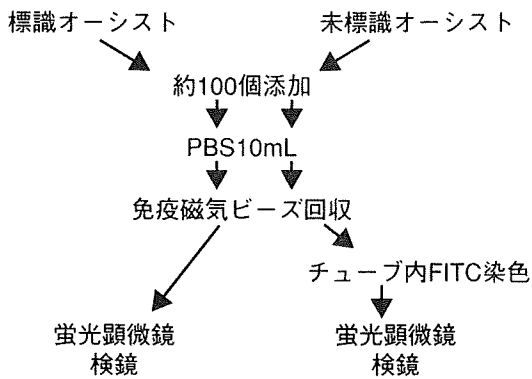


図-1 免疫磁気ビーズによる添加回収実験フロー

蛍光標識オーシストの計数についてはALX488オーシストの場合、シリコンスプレー処理により表面張力を強めた界線スライドガラスチャンバーにマイクロピペットを用いて検水50 μ Lを加え、落射蛍光顕微鏡を用い接眼レンズ10倍、対物レンズ20倍で行った。オーシスト数が多い場合は、50 μ L中に100個程度になるようにPBSを用いて希釈して計数した。

一方、未標識オーシストの添加数は、井上⁸⁾の

ビニールフレームスライド法で計数し、添加実験後に回収したオーシストは、オーシストとビーズを解離した後の塩酸溶液(50 μ L)をマイクロチューブに移し、そのマイクロチューブ内で1N水酸化ナトリウム溶液5 μ Lを用いて中和した後、FITC染色及び、計数を添加オーシストの場合と同様の方法で行った。

2.3 緑色蛍光オーシストを用いた凝集沈澱及び砂汙過による除去実験

2.3.1 添加オーシスト数の計数

凝集沈澱、または砂汙過の除去実験に添加したオーシスト数の計数は、緑色蛍光オーシストを5回マイクロピペットで同量採取し、それぞれ2.2.2に示した方法で行った。

2.3.2 凝集沈澱または砂汙過による除去実験後のオーシスト回収率の確認

凝集沈澱、または砂汙過による除去実験後のオーシストは、処理水中のフロックを取り除くため、硝酸(1+10)でpH値を3程度にした後、孔径3.0 μ m直径47mmのポリカーボネートフィルターで汙過濃縮した。その後、免疫磁気ビーズ法で分離精製し、2.2.2の方法で計数した。なお、この一連の操作における回収能を把握するため、ジャーテスト後の上澄水及び、砂汙過水に一定数の緑色蛍光標識オーシストを添加し、上記の方法でオーシストを回収し、回収率を求めた。この回収率を求める実験をそれぞれ5回行い、得られた回収率を用いて実験後に測定されたオーシスト数を次式により補正した。

$$\text{補正した実験後のオーシスト数} = \frac{\text{実験後のオーシスト数}}{\text{回収率}}$$

2.3.3 ジャーテスターを用いた凝集沈澱処理による除去実験

4個の1Lビーカーに原水1Lをそれぞれ採取し、2.3.1に示した方法により、1ビーカーあたり約 1×10^2 個または約 1×10^3 個となるように緑色蛍光オーシストを添加した後、攪拌翼(翼長60mm・幅16mm)2枚保有のジャーテスターを用いて、急速攪拌(回転数100rpm: G値207/sec)を1分間行いながら凝集剤を注入した。その後、緩

速攪拌 (回転数60rpm: G 値96/sec) を10分間行ってフロックを成長させた後、10分間静置してそれぞれのビーカーから上澄水を均等に合計で2.5L採取し、オーシスト数を計数した。このオーシスト数を、2.3.2に示した方法により補正して、凝集沈澱の除去効果を評価した。

凝集剤は、本市柴島浄水場で使用している硫酸アルミニウム (Al_2O_3 として8%) を精製水で希釈して、1%溶液としたものを用いた。凝集剤の注入率は原水の量に対して硫酸アルミニウムの原液に換算した注入率で示しており、本実験では実際の処理とほぼ同じ20ppm及び30ppmの注入率とした。試料水は柴島浄水場一津屋原水 (淀川河川水) を用いた。

2.3.4 砂濾過カラムを用いた濾過実験

実験に用いた砂濾過カラムの概要を図-2に示した。直径5cm、長さ70cmのガラス製カラムに7cm厚の砂利を充填し、その上部に柴島浄水場1系濾過池から採砂した有効径が0.5mm、均等係数1.35の濾過砂を層厚で30cm充填した。凝集沈澱水としてジャーテスト後の上澄水を10L調整し、

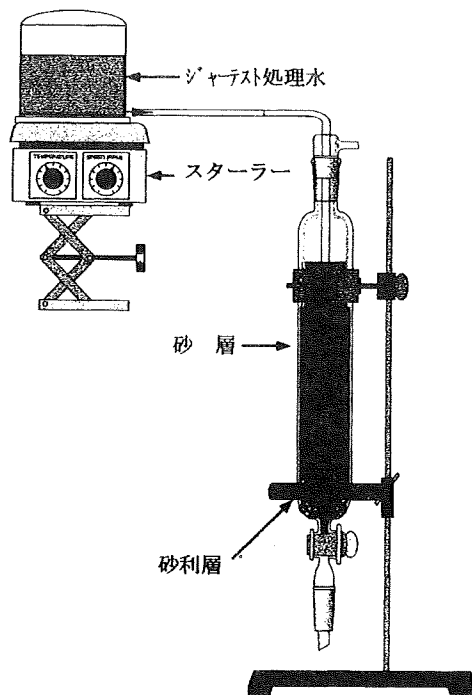


図-2 砂濾過カラムの概要

これを砂濾過カラムの流入水とした。全量10Lに対し、 1×10^3 個または 1×10^4 個の緑色蛍光オーシストを添加した後、スターラーで攪拌しながら、濾過速度が120m/日となるように砂濾過カラムに流入させた。そして濾過水10L中のオーシスト数を計数し、この値を2.3.2で求めた回収率により補正して濾過の除去効果を評価した。オーシスト数の計数は濾過水の全量である10Lを対象に行い、併せて濁度についても、濾過経過時間毎にレーザー微粒子カウンター (NP500T、日本電色工業社製) を用いて測定した。本実験の条件下では10Lのジャーテスト処理水の濾過に約1時間を要した。なお、濾過後、この砂カラムは水道水を用いて膨張率20%程度で8分間の逆流洗浄を行い、次の濾過実験に使用した。

3. 結果と考察

3.1 陽性対照用の赤色蛍光オーシストの確認

TXR オーシストとALX 594オーシストはFITC染色及びDAPI染色後もG励起下で赤色蛍光が観察され、赤色標識蛍光を保持していることを確認した。またB励起下でのFITC染色による緑色蛍光も、未標識オーシストを用いた場合と比較して違いはなかった。同様に、UV励起下においてもDAPI染色による青色蛍光の低下は見られなかった。なお、TXRオーシストとALX 594オーシストの蛍光は、強度には差がなかったものの、励起光照射に対する蛍光の低下はALX 594オーシストの方がTXRオーシストより少なく、ALX 594の優位性が認められた。

長期保存の影響を確認するために冷蔵庫内に6ヵ月間保存したPBS中のTXRオーシストとALX 594オーシストの蛍光強度は、共に変化が認められず、プロテインラベリングキットで蛍光標識したオーシストの蛍光色は6ヵ月間安定していることを確認した。

これらの結果から、クリプトスポリジウムオーシストの測定時に、ALX 594オーシストとG励起下での観察を組み合わせることでオーシストの赤色蛍光の発色を確認することにより、測定用標本中に観測されたオーシストが陽性対照オーシストの混入によるものかどうかを容易に判別することが可能になった。

3.2 添加回収試験用オーシストの緑色蛍光オーシストの確認

水道水に ORG 488オーシストと ALX 488オーシストを添加した実験では、蛍光色はいずれも変化せず、実験条件での遊離塩素による影響は認められなかった。一方、ALX 488オーシストと ORG 488オーシストに0.1N 塩酸または硝酸 (1+10) を加えたところ、ALX 488オーシストの蛍光強度は一定であったものの、ORG488オーシストの蛍光色は消失した。これは Alexa シリーズの色素が既存の色素より広範囲の pH で蛍光が安定であるためと考えられる。なお、FITC 染色したオーシストを水道水へ加えた場合、遊離塩素により緑色の蛍光色が消失し、0.1N 塩酸を加えた場合でも蛍光色が消失した。

次に、緑色標識オーシストと未標識オーシストの免疫磁気ビーズ法による回収結果を表-2に示した。ALX 488オーシストについては6回、未標識オーシストについては3回、回収率の確認実験を繰り返した結果、ALX 488オーシストの回収率は78.1%~99.8%、未標識オーシストの回収率は72.3%~85.5%で、平均80%程度の回収率が得られたことから、ALX 488オーシストの回収率と未標識オーシストの回収率に違いは認められず、免疫磁気ビーズにより蛍光標識オーシストが良好に回収できることが確認できた。また、6回繰り返した ALX 488オーシストの回収率の変動と、3回繰り返した未標識オーシストの回収率の変動はともに小さく、変動係数はそれぞれ12.4%、9.1%であった。

表-2 標識オーシストの免疫磁気ビーズによる回収結果

測定No	標識(ALX488)オーシスト		未標識オーシスト	
	添加個数	回収個数	添加個数	回収個数
1	99	92	105	71
2	84	83	88	84
3	93	72	98	83
4	81	68	100	-
5	99	76	95	-
6	97	68	103	-
平均	92.2	76.5	98.2	79.3
CV(%)	8.5	12.4	6.2	9.1
回収率(%)		83.0		80.8

なお、PBS 中の ALX 488オーシストについては、冷蔵庫中で6ヵ月間保存しても、その蛍光強度に変化がないことを確認した。

3.3 ジャーテスターを用いた凝集沈澱処理による除去実験

ジャーテスト上澄水からの免疫磁気ビーズ法による添加オーシストの回収結果を表-3に示した。添加オーシスト数は153個~177個で、添加操作による添加数のばらつきは比較的少なく、変動係数は5.2%であった。一方、回収したオーシスト数は61個~99個で、平均の回収率は47.7%、変動係数は21.8%であった。この計数時の検鏡では、界線スライドグラスチャンバー内に回収した0.1N 塩酸中での蛍光標識オーシストの判別は非常に容易であり、検鏡時間もスライドグラス1枚につき5分間程度であった。また、ジャーテスト処理水に硝酸 (1+10) を添加してフロックを取り除くことにより、ポリカーボネートフィルターによる試料水の汙過時間の短縮が可能になり、さらにスライドグラスチャンバー内の試料水の濁りが発生しないことから、従来の直接蛍光抗体染色する方法に比べてクリプトスポリジウムの計数が迅速かつ容易に行えることを確認した。

次に、ジャーテスターを用いた凝集沈澱による緑色蛍光オーシストの除去実験結果を表-4に示した。1L ビーカー4個に合計で約360個の緑色蛍光標識オーシストを添加して行う実験を5回繰り返した結果、実験毎に上澄水計2.5L 中に計数された蛍光標識オーシストは2個~4個で、5回の実験においてほぼ同じ結果が得られ、その平均は3.4個であった。この値を回収率で補正し、さらに計数した容量が全量4L に対して2.5L のみで

表-3 ジャーテスト上澄水への添加回収結果

測定No	添加オーシスト個数	回収オーシスト個数
1	163	93
2	168	61
3	177	99
4	153	63
5	165	78
平均	165.2	78.8
CV(%)	5.2	21.8
回収率(%)		47.7

表-4 ジャーテスターを用いた凝集沈澱処理におけるオーシスト除去率

測定No	添加 オーシスト個数	回収 オーシスト個数	回収率換算 オーシスト個数	添加 オーシスト個数	回収 オーシスト個数	回収率換算 オーシスト個数
1	352	4	13.4	3,920	49	164
2	316	3	10.1	3,480	32	107
3	372	4	13.4	3,320	44	148
4	388	4	13.4	3,440	30	101
5	384	2	6.7	3,320	46	154
平均	362	3.4	11.4	3,500	40.2	135
CV(%)	8.1		26.3	7.1		21.4
除去率(%)			96.9			96.1
除去率(log)			1.50			1.41

あったことから、1.6 (4L/2.5L) を乗じ、添加蛍光標識オーシスト数と比較して求めた除去率は96.9%であった。また、この除去率を log 除去率 (残存割合の逆数の対数) に換算した結果は、表-4に示すように1.50であった。添加オーシスト数を10倍に増やした実験では、上澄水中に計数されたオーシスト数は30個~49個で、平均値は40.2個であった。この時の除去率は96.1%で、log 除去率は1.41になり、添加オーシスト数が増加しても除去率はほぼ同じ様な結果が得られた。

Edzwaldら⁴⁾はパイロットプラントを用いた傾斜板沈澱池での *C. parvum* の除去率が0.6log~1.6logであったと報告している。また、Azusa Valley 水道会社のパイロットプラントで行われた実験³⁾では、硫酸バンドを用いた凝集沈澱処理による除去率が2.0logであったと報告されており、本実験で得られた除去率はこれらの結果と大きく異なるものであった。

3.4 砂濾過カラムを用いた濾過実験

砂濾過水からの免疫磁気ビーズ法による添加オーシストの回収結果を表-5に示した。5回測定した添加オーシスト数は93個~113個で、添加操作による添加数のばらつきは少なく、変動係数は8.3%であった。一方、砂濾過水に添加、回収後計数したオーシスト数は54個~78個で、平均の回収率は65.6%、変動係数は15.3%であった。

砂濾過カラムを用いた濾過実験での除去実験結果を表-6に示した。10Lのジャーテスト上澄水に、約1,000個の蛍光標識オーシストを添加して濾過する実験を5回繰り返した結果、濾過水中に計数

表-5 砂濾過水への添加回収結果

測定No	添加オーシスト個数	回収オーシスト個数
1	113	65
2	96	58
3	95	78
4	93	54
5	104	73
平均	100	65.6
CV(%)	8.3	15.3
回収率(%)		65.6

された蛍光標識オーシスト数は1個~5個で、その平均個数は3個であった。この値を回収率で補正し、添加オーシスト数と比較して求めた除去率は99.5%で、log 除去率は2.34であった。また、添加蛍光標識オーシスト数を10倍に増やした実験では、濾過水中に計数されたオーシスト数は35個~71個で、平均値は52.2個であった。この時の除去率は99.3%で、log 除去率は2.16になり、凝集沈澱処理の場合と同じく添加オーシスト数を増加しても除去率はほぼ同じになる結果が得られた。

砂濾過の実験において、試料全量を濾過している間、濾過水中の濁度の測定を行った。結果は図-3に示したもので、濾過水の濁度は0.2度以下であり、実際の濾過池に比べて濾過水濁度が実際池での目標値である0.1度より少し高く、得られるクリプトスポリジウムの除去能も、実際池での除去能に比べてわずかながら低い結果になると推定された。また、濾過開始直後に濁度がいったん増加した後、徐々に減少する傾向が認められるが、この現象は濾過開始直後の砂濾過層が成熟

表-6 砂汙過カラム実験におけるオーシスト除去率

測定No	添加 オーシスト個数	回収 オーシスト個数	回収率換算 オーシスト個数	添加 オーシスト個数	回収 オーシスト個数	回収率換算 オーシスト個数
1	1,130	1	1.5	10,100	71	108
2	960	5	7.6	12,100	62	95
3	950	5	7.6	13,200	52	79
4	930	1	1.5	11,400	41	63
5	1,040	3	4.6	11,100	35	53
平均	1,000	3.0	4.6	11,580	52.2	79.6
CV(%)	8.3		66.7	10.0		28.3
除去率(%)			99.5			99.3
除去率(log)			2.34			2.16

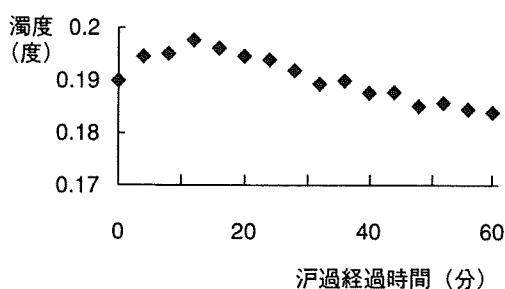


図-3 砂カラム汙過水の濁度の挙動

(Ripening, Maturation) するまでの間に認められる現象であることが知られている。この時点における汙過能は一般的に低くなること知られており、クリプトスポリジウムの除去率も0.4log~0.9log 低くなること報告³⁾ されている。また、Huckら⁶⁾ も凝集したクリプトスポリジウムを直接砂汙過する実験において、汙過層が成熟するまでの間に一部の結果の除去率が0.5log 低下したと報告している。これらのことをあわせて考えると、汙過能が適切に発現している実際池での除去率は、本実験で得られた除去率よりも高いことが考えられる。一方、汙過を長時間継続した場合に、粒子または濁度が漏出して来る時点でのクリプトスポリジウム除去能の変化については、適切な除去能が維持されていたとする報告³⁾ があるものの、前述の Huckら⁶⁾ の一部の実験では、除去能が大きく減少したことが報告されている。Huck らの実験では、粒子の漏出が発生し始める直前まで適切な除去率が維持されていたことから、実際の処理においては洗浄頻度を適切に設定して、急速砂

汙過池から粒子が漏出し始める前に汙過池を洗浄することにより、長時間の汙過継続によるクリプトスポリジウム除去能の低下を避けることができる。従って、急速砂汙過池において最もクリプトスポリジウム除去能が低い時期は、汙過開始直後の1~2時間であると考えられ、本実験はこのような汙過能が低下している条件下での除去結果と考えられる。

硫酸バンドを用いた凝集沈澱・急速砂汙過処理におけるクリプトスポリジウムの除去について、Statesら⁷⁾ は凝集が適切に行われている場合は5.7 log~6.6log 以上であったと報告しているのに対し、Huckら⁶⁾ の異なる2カ所での実験では、5.5log の除去率と3.0log の除去率であったことを報告している。Huck らの除去率が低い結果の実験は、除去率が高い場合の実験に比べ硫酸バンドの注入率が低く、また凝集 pH 値も8程度と高いものであった。本実験では、凝集沈澱-急速砂汙過処理全体の除去実験は、添加するクリプトスポリジウム数を極めて多い数に設定する必要があることから行っていない。しかしながら、個々の log 除去率を加算することで連続した処理の除去性を評価することができることから、本実験における凝集沈澱と砂汙過の結果をあわせて評価した場合、クリプトスポリジウムの除去率は99.99% になり、ほぼ4 log の除去が得られると考えられる結果になった。この除去率は States や Huck らの結果に比べて低いものの、凝集沈澱-急速砂汙過を適切に行うことで、米国においてクリプトスポリジウムの除去に必要な技術的処理能力とされ

る 2 log の除去⁹⁾ を十分に確保できることがわかった。

4. まとめ

- ①プロテインラベリング法によりクリプトスポリジウムオーシストを簡単に蛍光標識することができ、しかもその蛍光標識されたオーシストの蛍光強度は長期間安定していた。
- ②Alexa 594で赤色蛍光に標識したオーシストは、測定時に行う FITC 染色、DAPI 染色が行えた。この結果、予めクリプトスポリジウムオーシストに蛍光標識を行い、落射蛍光顕微鏡の G 励起フィルターによる蛍光観察を行うことで、測定用標本に陽性対照オーシストが混入しても容易に判別が行えるようになった。
- ③Alexa 488で緑色蛍光に標識したオーシストは浄水に添加しても蛍光が低下せず、免疫磁気ビーズによる回収が可能で蛍光抗体染色なしに観察が行えることから、オーシスト添加実験で使用する場合の精度の向上に寄与するものと考えられる。
- ④緑色蛍光オーシストを用いた添加回収実験では、直接蛍光抗体染色が不要であり非特異反応による誤差もなく、オーシストの計数のための検鏡は 5 分間程度の短時間で行うことができた。
- ⑤ジャーテスターを用いた凝集沈澱処理及びガラスカラムを用いた砂濾過処理におけるクリプトスポリジウムの除去率は、それぞれ 1.41 log \sim 1.50log と 2.16log \sim 2.34log であった。

参 考 文 献

- 1) 井関基弘：水系感染クリプトスポリジウム症の集団発生、日本水処理生物学会誌、Vol. 32, No. 2, pp. 67~78 (1997)
- 2) 厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課、水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針—水道水に関するクリプトスポリジウムオーシスト検出のための暫定的な試験方法—、pp. 61~72 (1996)
- 3) N. L. Patania, J. G. Jacangelo, L. Cummings, S. Wilczak, K. Riley, J. Oppenheimer, "Optimization of Filtration for Cyst Removal", AWWA Res. Fdn., Denver, (1995)
- 4) J. K. Edzwald, J. Tobiason, L. M. Parento, M. B. Kelley, G. S. Kaminski, H. J. Dunn, P. B. Galant, "Giardia and Cryptosporidium Removals by Clarification and Filtration under Challenge Conditions", JAWWA, Vol. 92, No. 12, pp. 70~84 (2000)
- 5) J. Swertfeger, D. H. Metz, J. DeMarco, A. Braghetta, J. G. Jacangelo, "Effect of Filter Media on Cyst and Oocyst Removal", JAWWA, Vol. 91, No. 9, pp. 90~100 (1999)
- 6) P. M. Huck, B. M. Coffey, M. B. Emelko, D. D. Maurizio, R. M. Slawson, W. B. Anderson, J. van den Oever, I. P. Douglas, C. R. O'melia, "Effects of Filter Operation on Cryptosporidium Removal", JAWWA, Vol. 94, No. 6, pp. 97~111 (2002)
- 7) S. States, R. Tomko, M. Scheuring, L. Casson, "Enhanced Coagulation and Removal of Cryptosporidium", JAWWA, Vol. 94, No. 11, pp. 67~77 (2002)
- 8) 井上 亘：ビニールフレームスライドによる *Cryptosporidium* オーシストの計数、日本水道協会—水道の原虫対策に関する研究—、平成12年度報告書 pp. 58~62 (2000)
- 9) F. W. Pontius, "Update on USEPA's Drinking Water Regulations", JAWWA, Vol. 95, No. 3, pp. 57~68 (2003)

(平成15年10月20日受付)

特集

子牛下痢症の予防
～蔓延するクリプトスポリジウム～

クリプトスポリジウム 公衆衛生の観点から

▼神奈川県衛生研究所 微生物部

黒木俊郎

概要

ヒトのクリプトスポリジウム症は、*Cryptosporidium parvum*のヒト型 (genotype I) と牛型 (genotype II) が主要な原因病原体である。ヒト型を*C. hominis*という別種とすることが提案されているが、ここでは従来どおり*C. parvum*とする。

*C. parvum*は1970年代中頃までは家畜に対する病原性が注目され、家畜の寄生原虫とされていた。ところが1976年に免疫機能が正常な女児と免疫不全の下痢患者から*C. parvum*がそれぞれ報告され^{1,2)}、ヒトに寄生して病原性を発揮することが初めて明らかになった。その後1980年頃までは主として免疫不全者の重篤な慢性下痢症の原因であるとされていたが、多くの症例が見出されるに至って、小児下痢症、渡航者下痢症、人獣共通感染症あるいは水系感染症の病原体として

重要視され、医学あるいは公衆衛生分野において最も関心の高い病原性原虫のひとつとなっている。

クリプトスポリジウム症は、感染症法の改定により2003年11月5日から5類感染症 (全数把握) に規定されており、医師が診断した場合には1週間以内に保健所を通じて都道府県知事などに届け出なければならない。1999年以降、毎年10例前後の散発例の患者発生が報告されているが、報告する自治体に偏りがみられることなどから、実態を反映しているとは考えられない。

ヒトにおける症状および治療

ヒトのクリプトスポリジウム症の潜伏期は4～7日程度で、主な症状は下痢 (主として水様性)、腹痛、39℃を越えない発熱、悪心、嘔吐、倦怠感などであり、下痢は軽度のものから1日に20回以上の激しいものまでみられる。症状は通

【表-1】 クリプトスポリジウム症の臨床的所見

	エイズ患者 n=67	その他の免疫不全者 n=17	健常者 n=35
症状			
下痢	63	16	31
腹痛	24	6	14
嘔吐（嘔気）	18	4	11
発熱	26	3	11
症状なし	4	1	4
症状（日）			
<3	0	0	5
4~10	2	1	13
11~20	0	1	9
21~30	1	0	4
>30	52	1	0
不明	12	3	4
転帰			
治癒	12	8	34
治癒不良	3	1	0
死亡	31	5	0
不明	21	3	1

3) を一部改変して引用

常は1～2週間程度で治まる。成人よりも小児の方が、また初感染の方が再感染よりも症状が重い。エイズ患者などの免疫不全者では慢性、消耗性の重篤な下痢を呈し、ときとして致死的となる。通常は小腸のみに感染するが、エイズ患者では呼吸器や胆道系での感染も報告されている。

公衆衛生上の重大な関心事のひとつは、エイズ患者をはじめとする免疫不全者におけるクリプトスポリジウム症の重篤な経過である。免疫不全者はハイリスクグループであり、健常人が感染しないタイプのクリプトスポリジウムにも感染する可能性がある。症状の種類には患者の免疫状態による大きな差はないが、症状の重篤度と持続する期間および転帰は異なる(表-1)³⁾。米国疾病予防センター(CDC)では、エイズ患者においてはCD4+細胞数が180～200を下回ると症状の長期化や重篤化が起きやすいとしている。

これまでにクリプトスポリジウム症の治療に関する多くの研究がなされてきたが、下痢症患者に投与して効果を示す薬剤が見出されていないため、治療は対症療法となる。免疫不全者に対する有効な治療法は免疫機能を回復することであり、エイズ患者ではCD4+細胞数の改善を目指した治療が最も効果があるとされている。

感染事例

クリプトスポリジウムの感染は、便とともに排出されたオーシストを経口的に摂取することによる。患者や患畜、保有者(動物)に直接接触したり、便に触ることにより起きる感染には、ヒトからヒトへの感染(家族内感染、託児所(day-care centers)での集団感染、病院内感染、広義の性感染症)が欧米で報告されており、また、ヒト以外の感染動物との接触(ペットや家畜など)もある。例えば、獣医学科の学生が感染した牛の世話をして感染した事例が、わが国の事例も含めて複数ある。胃カテーテルを用いてウサギにエイズ患者由来のオーシストを投与する実験において、ウサギが咳をして投与物が実験者の顔に飛び、これにより感染した事例も報告されている。

食品や水を介した感染には、オーシストに汚染された食物(野菜類、アップルサイダー、牛乳など)を摂取することによる感染や、水道水の汚染による集団発生、河川や湖、プールでの水泳などによる感染がある。

*C. parvum*の遺伝子型のひとつであるヒト型の宿主はヒトや霊長類などに限られており、ヒトからヒトに感染するという

【表-2】 クリプトスポリジウムの主な水系感染事例

発生年	発生国	地域	確定患者数	飲料水の状態など
'83年	イギリス	Surrey	16人	緩速濾過、塩素消毒
'84年	アメリカ	Texas	117人	濾過しない塩素消毒のみの水道水
			2,006人感染	1カ月前にウイルス性下痢症
'85年	イギリス	Surrey	50人	緩速濾過、塩素消毒
'86年	イギリス	Sheffield	104人	水源周辺の水が関与
'86年	アメリカ	New Mexico	78人	水泳、託児所も関与?
'87年	アメリカ	Georgia	58人	水道水(通常処理)の処理不十分
				推計13,000人が感染
'88年	イギリス	Ayrshire	27人	浄水場周辺で牛糞撒布
'89年	イギリス	Swinden, Oxfordshire	516人	水道水(通常処理)が関与
'90~'91年	イギリス	Thanet	47人	水道水(通常処理)の処理不十分
'91年	アメリカ	Pennsylvania	551人	塩素消毒のみの水道水
'91年	イギリス	South London	44人	水道水が関与
'92年	アメリカ	Oregon	43人	水道水(通常処理)の処理不十分
				推計15,000人が感染
'93年	アメリカ	Milwaukee	285人	水道水(通常処理)の処理不十分
				推計403,000人が感染
'93~'94年	アメリカ	Clark county Nevada	103人	水道水が関与
				エイズ患者の感染で発覚
'94年	日本	神奈川県平塚市	12人	ビルの簡易専用水道が関与
			461人発症	汚水が受水槽に混入
'96年	日本	埼玉県越生町	22人	町営水道(通常処理)が関与
				町民の約70%に症状

感染環がある。これに対して、牛型は人獣共通感染症の病原体であり、ヒトとその他の哺乳類を含めた感染環が形成されている。患者から検出されたオーシストの遺伝子型を解析することで、感染経路をある程度推測することも可能である。

1. 食品を介した感染

食品を介して感染する事例は、食品そのものが汚染される以外に、調理者がクリプトスポリジウムを保有していたために食品を汚染したり、オーシストに汚染された水を用いて食品や器具・器材を洗浄することにより発生する。

1996年にアメリカ・ニューヨーク州において、特定の製造所のアップルサイダー(りんごの実入りジュース)に関連したクリプトスポリジウム症の集団下痢症が発生した。製造所ではりんごや器材を井戸水で洗浄していたが、その製造所の向かいには酪農場があり、井戸水が汚染されていたことが疑われた。

1998年にはワシントンD.C.において、カフェテラスの感染従業者が準備した食品を摂食した人々の間に集団下痢症が発生した。その他の食品として、未殺菌乳の摂取によるクリプトスポリジウム症の発生が報告されている。野菜類や貝類からクリプトスポリジウムを検出したとする報告もあり、こう

した食品を非加熱で摂食することで感染する可能性がある。

2. 水系感染

クリプトスポリジウムについて公衆衛生上最も関心が高い問題は、水系感染による大規模な集団下痢症が発生することであり、他の原虫性感染症とは異なる大きな特徴を有している。水道水の微生物学的安全性は塩素消毒により確保されているが、クリプトスポリジウムのオーシストは塩素耐性を示し、通常の水道水の消毒に用いられている濃度ではまったく効果がない。

クリプトスポリジウムによる飲料水を介した水系感染は、欧米を中心にして世界中で1980年代前半から毎年のように発生したことが報告されている。主な事例を表-2に示した。1993年には、アメリカ・ミルウォーキーにおいて推定40万3,000人が感染・発症したとされる、史上最大の集団下痢症が起きている。わが国では、1994年に神奈川県平塚市の雑居ビルでの400人規模の集団発生と、1996年に埼玉県越生町の町営水道を介した推定9,000人弱の集団下痢症があった。

イギリスでは、毎年3,000~6,000例のクリプトスポリジウム症が報告されているが、水系感染による患者が多くを占めていることが推測されている。患者の発生は、春と晩夏から

秋にかけてのピークの二峰性を示す。春のピークは牛型が優勢だが、秋のピークではヒト型が優勢である。春のピークは、この時期に牛や羊が産出、多くの幼獣がクリプトスポリジウムに感染してオーシストを多数排出し、井戸や小規模水道が汚染されることが原因と推定されている。2001年に口蹄疫の大流行があり、約600万頭の牛が処分されたが、この年の春のピークは観察されず、患者に占める牛型の割合は減少した⁴⁾。ちなみに秋のピークが観察されるのは、夏休みに海外で感染し、帰国してからクリプトスポリジウム症の診断を受けるためとされている。

アメリカでもクリプトスポリジウム症発生の情報を収集しており、飲料水由来と親水施設 (recreational water) における集団感染は分けて集計されている。CDCの発行するMMWRに掲載された報告によれば、1991～1994年までの飲料水に関連した症例と親水施設関連の症例がともに8例であったが、1995年から飲料水に関連した事例は減少する傾向にある。しかし、親水施設関連の事例は逆に増えている。親水施設での感染は、プール、河川、湖沼などにおける水泳や、キャンプ場における河川水の飲水などが関連している。

わが国の河川などにおけるクリプトスポリジウムの汚染状況は、種々の調査により調べられているが、多くの河川や湖での汚染が明らかになっている。また、下水や畜産排水におけるクリプトスポリジウムオーシストの分布も調べられており、汚染源は下水や畜産排水が主体であるとされている。その他に野生動物が関わっていることも推測される。

免疫不全者における感染予防

クリプトスポリジウムはエイズ患者などの免疫不全者にとってときには致死性となる非常に危険な病原体のひとつであり、感染予防に特別な配慮をしなければならない。海外ではエイズ患者の多くがクリプトスポリジウムに感染しており、アメリカでは5～15%、イギリスでは21%とする報告もある。そのため、クリプトスポリジウムによる下痢が長く続く場合

にはHIV感染の可能性が高いとされ、エイズ発症の指標疾患のひとつとされている。わが国ではエイズ患者およびHIV感染者193例中2例 (1.0%) がクリプトスポリジウムに感染していた⁶⁾と報告されている。

CDCではHIV感染者/エイズ患者に対して、クリプトスポリジウム感染の予防方法として1. 手を洗う, 2. 便に接するような性行為は避ける, 3. 家畜に触れない, 4. ベットの便や容器などに触れない, 5. 食べ物を洗うか加熱調理する, 6. 水泳や入浴時に水を飲まないように注意する, 7. 安全な水を飲む, 8. 旅行中 (特に発展途上国) は特別の注意を払う, という項目を挙げている。ペット動物の扱いについて「ペットを飼ってはならない」あるいは「ペットに触れない」とせずに、「ペットの便や容器などに触れない」としているのは、ペットと過ごすという精神面の利点を重視しているからである。

エイズ患者やその他の免疫不全者は、*C. parvum*のヒト型と牛型以外の様々な動物に由来するクリプトスポリジウムに感染する可能性がある。ペットとして飼育される動物の種類は近年ではイヌやネコ、その他の哺乳類にとどまらず、数多くの爬虫類や魚類をも入手することが可能であり、こうした動物に寄生するクリプトスポリジウムも知られている。免疫機能が低下している場合には、幅広い種類の動物との接触や糞便の始末には十分な注意を払う必要がある。

参考文献

- 1) Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA, Yardley JH.: Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*. Apr;70 (4) : 592～598 (1976)
- 2) Meisel JL, Perera DR, Meligro C, Rubin CE.: Overwhelming watery diarrhea associated with a cryptosporidium in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*. un ; 70 (6) : 1156～1160 (1976)
- 3) Fayer, R. and Ungar L.P.: *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol.Rev.* 50 : 458～483 (1986)
- 4) Hunter P.R. et al.: Foot and mouth disease and cryptosporidiosis: possible interaction between two emerging infectious diseases. *Emerg Infect Dis*. 9. 109～112 (2003)
- 5) Smerdon W.J. et al.: Foot and mouth disease in livestock and reduced cryptosporidiosis in humans, England and Wales. *Emerg Infect Dis*. 1, 22～28 (2003)
- 6) HIV疫学研究班報告書: HIVの疫学と対策に関する研究 (1996)

Molecular Characterization of a Single *Cryptosporidium* Oocyst in Sewage by Semi-Nested PCR

A. Hashimoto*, H. Sugimoto**, S. Morita**, and T. Hirata**

*Department of Civil Engineering, Anan National College of Technology, 265 Aoki, Minobayashi-cho Anan, Tokushima 774-0017 Japan atsushi@anan-nct.ac.jp

**School of Environmental Health, Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Sagami-hara, Kanagawa 229-8501 Japan

Abstract

This study demonstrates microscopic molecular characterization of a single *Cryptosporidium* oocyst isolated from sewage. Using glass capillaries, we manipulated an IFA-stained single *Cryptosporidium* oocyst from purified sewage concentrate. Each singly isolated *Cryptosporidium* oocyst was analyzed by 18S rRNA gene based semi-nested PCR and direct sequence. A total of 56 singly isolate oocysts were characterized successfully as 51.8% (29 isolates) of *C. parvum* genotype 1, 17.9% (10 isolates) of *C. meleagridis*, 12.5% (7 isolates) of *C. parvum* genotype 2, 8.9% (5 isolates) of *C. parvum* isolated from pig, 7.1% (4 isolates) of *C. parvum* isolate VF383 and 1.6% (1 isolate) of *C. parvum* isolated from mouse. Results of this study demonstrate that 18S rRNA based semi-nested PCR and direct sequence method can be used to characterize a single *Cryptosporidium* oocyst from sewage with high sensitivity. Furthermore, this method revealed distribution of species and genotypes of *Cryptosporidium* in a water environment.

Introduction

The use of molecular characterization techniques such as PCR-RFLP and PCR-direct sequencing has been adopted in many studies for *Cryptosporidium* from water samples¹⁻⁴). Most of those studies used DNA extracts from water concentrates as PCR templates. Hence, genotyping results indicate the presence of the most dominant genotype. Distributions of respective genotypes or species remain unclear.

To provide the distribution of genotypes or species of *Cryptosporidium* in a water environment, we attempt to investigate molecular characterization of a single *Cryptosporidium* oocyst, isolated under a microscope, from sewage concentrate using 18S rRNA gene based semi-nested PCR and direct sequencing method.

Materials and Methods

Concentration of Sewage and Isolation of a Single *Cryptosporidium* Oocyst

Twice a month, we collected seven sewage samples of 4 L each from a sewage treatment plant located in Tokyo. Samples were centrifuged at 1,500 × g for 15 min. Sediments were meshed through 32 μm metal mesh. The concentrates were purified by sucrose flotation and washed with ethyl acetate. After purification, *Cryptosporidium* oocysts were separated by IMS procedure (Dynabead anti-Cryptosporidium beads; Dynal Biotech, Norway). An immunofluorescent antibody stain was applied to the separated samples using a *Cryptosporidium* antibody kit (Easy stain; BTF Pty. Ltd., Australia).

Stained samples were dropped on a plastic dish; then FITC stained and intact oocyst was manipulated, using a glass microcapillary under inverted epifluorescence microscopy. An

isolated single oocyst was dispensed into a 200 μ l PCR tube containing 20 μ l of lysis buffer (2.5 μ l of 10 \times PCR buffer and 17.5 μ l of milli-Q water).

PCR-Semi nested PCR procedure

PCR tubes containing a single *Cryptosporidium* oocyst were subjected to three freeze-thaw cycles and then incubated at 100°C for 15 min with 5 μ l of 10% TX-100 for DNA extraction. Initial PCR amplification was performed in 50 μ l containing 25 μ l of the DNA extract from a single oocyst, 2.5 μ l of 1 \times PCR buffer, 1 μ M concentrations of each primer set and 1 U of Taq polymerase (EX Taq HS; TaKaRa Bio Inc., Japan). We used 1 μ l of initial PCR product, purified by spin column, as a template for nested amplification. Initial and nested PCR used oligonucleotide primers that are complementary to 18S rRNA gene sequence of *Cryptosporidium* (CPDIAGF1/R for initial PCR, CPDIAGF1/R1 for nested PCR)⁵. Nested PCR products were sequenced on an auto sequencer. Sequence data were compared with GeneBank sequences using BLAST.

Results and discussion

PCR and nested PCR

Table 1 shows results of nested PCR and the sequence of a singly isolated oocyst from sewage. A total of 77 oocysts were isolated singly and subjected to semi-nested PCR and direct sequence. Semi-nested PCR detection rates were 84% (65 isolates positive) for a single *Cryptosporidium* oocyst from sewage. For the 73% (56 isolates) that were sequenced successfully, we compared sequences with the GeneBank database.

The results demonstrate that 18S rRNA based semi nested PCR and the direct sequencing method can be used to characterize a single *Cryptosporidium* oocyst from sewage with high sensitivity and can reveal distribution of species or genotypes of *Cryptosporidium* in a water environment.

18S rRNA gene sequence analysis

Nested PCR products were sequenced to confirm the identification of *Cryptosporidium*. Sequences of the most variable region of known *Cryptosporidium* spp. from GeneBank and isolates from the present study are shown in Fig. 1. Sequences of *Cryptosporidium* from sewage were able to differentiate five genotypes and one species. All sequences were matched GeneBank database as *C.parvum* genotype 1 (AY204235, etc.), *C.meleagridis* (AY166839, etc.), *C.parvum* genotype 2 (AF178700, etc.), *C.parvum* isolated from pig (AF115377, etc.), *C.parvum* isolate VF383 human type (AY030084.1) and *C.parvum* isolated from mouse (AF112571).

Distributions of these six genotypes/species are shown in Table 2. Among the 56 isolates, 51.8% (29 isolates) were *C.parvum* genotype 1 and 7.1% (4 isolates,) *C.parvum* VF383, which have been reported as a human type. Potentially zoonotic types were 17.9% (10 isolates) of *C. meleagridis* and 12.5% (7 isolates) of *C. parvum* genotype 2. Animal genotypes were, 8.9% (5 isolates, pig) and 1.8% (1 isolate mouse). An abattoir in the treatment district is presumed to be one of the contamination sources of animal type (and zoonotic type), possibly.

Conclusion

This study is summarized as follows:

- 1) The 18S rRNA based semi-nested PCR and direct sequence method was a useful tool for investigation of molecular characterization and distribution of *Cryptosporidium* genotype in a water environment.
- 2) Distribution of *Cryptosporidium* genotype in sewage was: 51.8% (29 isolates) of *C. parvum* genotype 1; 17.9% (10 isolates) of *C. meleagridis*; 12.5% (7 isolates) of *C. parvum* genotype 2; 8.9% (5 isolates) of *C. parvum* isolated from pig; 7.1% (4 isolates) of *C. parvum* isolate VF383 (human type); and 1.8% (1 isolate) of *C. parvum* isolated from mouse.

References

- 1) Ward, P.I., et al., (2002), *Parasitology*, 124, 359–368
- 2) Xiao, L. et al., (2000), *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5492–5498
- 3) Jellison, K.L., et al., (2002), *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 569–575
- 4) Sturbaum, G.D., et al., (2001), *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2625–2668
- 5) Johnson, D.W., (1995), *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3849–3855

Table 1 Number of samples PCR positive or sequenced successfully

Tested singly isolate oocysts	Nested PCR positive*	Sequenced successfully
77	65(84%)	56(73%)

*:Visually detected by etidium bromide and UV

Table 2 Distribution of isolated *Cryptosporidium* oocyst

	Number of isolates	%
<i>C.parvum</i> genotype 1	29	51.8
<i>C.mereaglidis</i>	10	17.9
<i>C.parvum</i> genotype 2	7	12.5
<i>C.parvum</i> isolated from pig	5	8.9
<i>C.parvum</i> isolate VF383	4	7.1
<i>C.parvum</i> isolated from mouse	1	1.8

<i>C. parvum</i> genotype 1 (AY204235, etc.)	AATTCATATTACTATTTTT-TTTTTTAGTATATGAAATTTACTTTGAGAAAA
Sewage type 1-1	AATTCATATTACTATTTTT-TTTTTTAGTATATGAAATTTACTTTGAGAAAA
<i>C. parvum</i> genotype 1 (AY204241, etc.)	AATTCATATTACTATTTTT-TTTTT-AGTATATGAAATTTACTTTGAGAAAA
Sewage type 1-2	AATTCATATTACTATTTTT-TTTTT-AGTATATGAAATTTACTTTGAGAAAA
<i>C. parvum</i> genotype 1 (AY204231.1, etc.)	AATTCATATTACTATTTTT-TTTTT-AGTATATGAAATTTACTTTGAGAAAA
Sewage type 1-3	AATTCATATTACTATTTTT-TTTTT-AGTATATGAAATTTACTTTGAGAAAA
<i>C. meleagridis</i> (AY166839, etc.)	AATTCATATTACTAAA----TTTATTAGTATAGGAAATTT-ACITTTGAGAAAA
Sewage type 2	AATTCATATTACTAAA----TTTATTAGTATAGGAAATTT-ACITTTGAGAAAA
<i>C. parvum</i> genotype 2 (AF178700, etc.)	AATTCATATTACTATAT-A--TT-TTAGTATATGAAATTTACTTTGAGAAAA
Sewage type 3	AATTCATATTACTATAT-A--TT-TTAGTATATGAAATTTACTTTGAGAAAA
<i>C. parvum</i> isolated from pig (AF115377, etc.)	AATTCATATTACTATAAT-TTTTATTAGTATATGAAATTTACTTTGAGAAAA
Sewage type 4	AATTCATATTACTATAAT-TTTTATTAGTATATGAAATTTACTTTGAGAAAA
<i>C. parvum</i> isolated VF383 (AY030084.1, etc.)	AATTCATATTACTATATTA--TTATTAGTATATGAAATTTACTTTGAGAAAA
Sewage type 5	AATTCATATTACTATATTA--TTATTAGTATATGAAATTTACTTTGAGAAAA
<i>C. parvum</i> isolated from mouse (AF112571)	AATTCATATTACTATAATTATTTTTTAGTATATGAAATTTACTTTGAGAAAA
Sewage type 6	AATTCATATTACTATAATTATTTTTTAGTATATGAAATTTACTTTGAGAAAA

Fig. 1 Sequences of the most variable regions of the 18S r RNA of *Cryptosporidium* from sewage and known *Cryptosporidium* spp.

***Cryptosporidium* monitoring system at a water treatment plant, based on waterborne risk assessment**

Y. Masago*, K. Oguma*, H. Katayama**, T. Hirata*** and S. Ohgaki*

* Dept of Urban Environmental Engineering, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

** Institute of Environmental Studies, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan (E-mail: masago@env.t.u-tokyo.ac.jp)

*** Water Environment Laboratory, Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Sagami-hara, Kanagawa 229-8501, Japan

Abstract The water volume required for daily monitoring of *Cryptosporidium* (which can statistically ensure an annual risk of infection below 10^{-4}), was assessed by evaluating the applicability of the Poisson lognormal (PLN) distribution in microbial risk assessment. PLN showed as good a fit to the observed data as to the negative binomial distribution. From the estimated PLN distributions for the source and finished water, the efficacy of the oocyst removal by the conventional water treatment process was estimated to follow log-normal distribution (median = $3.16 \log_{10}$, 95% CI = $4.27-2.05 \log_{10}$). The 365 consecutive negative results of daily monitoring for 180 L of finished water were found to be statistically equivalent to the annual risk of infection below 10^{-4} . This research also suggested the possibility of applying a qualitative detection method, such as CC-PCR, as a routine monitoring method for the quantitative risk management.

Keywords *Cryptosporidium*; monitoring system; Poisson log-normal distribution; risk assessment; treatment efficacy

Introduction

Since the 1990s, cryptosporidiosis has become a worldwide concern as an emerging infectious waterborne disease. In order to manage the risk due to drinking water and to assure its safety, it is necessary to analyse the risk of infection quantitatively. However, quantitative microbial risk assessment has several difficulties. For example, monitoring data for microbes may contain some (sometimes many) "undetected" results, due to very low concentrations of microbes in water. In this study, the monitoring data of *Cryptosporidium* observed at a water treatment plant in Japan were analysed to assess the risk of waterborne infection as well as to estimate the removal efficacy of the conventional water treatment. Poisson log-normal distribution (PLN) was adopted as one of the possible distributions of the counts in a water sample and its usefulness was evaluated from the viewpoint of waterborne risk assessment. Additionally, a volume of water sufficient for daily monitoring was also tested to investigate the possibility of ensuring that the annual risk remained at an acceptable level.

Materials and methods

Observed data for *Cryptosporidium* in surface and finished water

The monitoring data analysed in this study were obtained by Hashimoto *et al.* (2002). Water samples (81) were collected at a water treatment plant in Japan from 1998 to 2002; 27 were collected from the influent surface water and 54 from the finished water (after coagulation, flocculation, sedimentation and rapid sand filtration). The sample volume was <100 L for surface water and 500–4,275.6 L for finished water. Figure 1 shows the log-normal probability plot of the observed data. *Cryptosporidium* was detected from all surface water samples, and its geometric mean was 481 oocysts/1,000 L. However, half of the

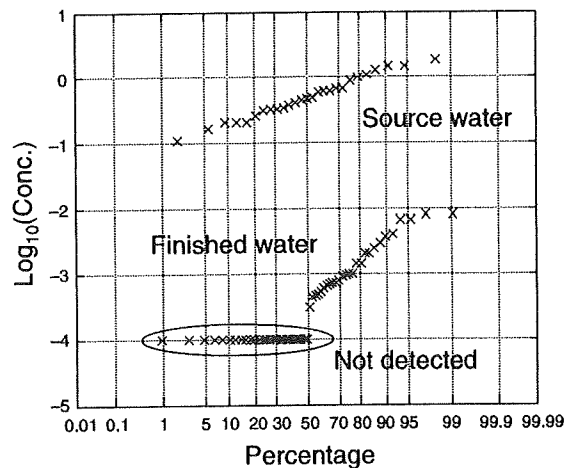


Figure 1 The observed data of *Cryptosporidium*

finished water samples (27/54) had no oocysts detected. The geometric mean of the detected samples was 1.39 oocysts/1,000 L.

Distribution of oocyst concentration in water

The best distribution to characterise the concentration of *Cryptosporidium* in water was selected from among the Poisson distribution, the Poisson log-normal distribution and the negative binomial distribution, using the counted data of the source and purified water. Assuming the oocyst concentration to be constant, and the variability in counts being simply due to the randomness in sampling, the probability that a sample of volume (VCL) contains X oocysts is given by the Poisson distribution. The negative binomial distribution (NB) has also been used to describe the count data of *Cryptosporidium* (Teunis et al., 1997). This distribution was derived as a γ mixture of Poisson distributions (Greenwood and Yule, 1920). The Poisson log-normal distribution (PLN) was selected when the concentration of oocysts was supposed to follow the log-normal distribution. The probability distribution function is:

$$PLN(n = X) = \int_0^{\infty} \frac{(mV)^x \exp(-mV)}{X!} \frac{1}{m\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{(\ln(m)-\mu)^2}{2\sigma^2}\right] dm \quad (1)$$

where μ and σ are the parameters for the log-normal distribution and $V(L)$ was the volume of the sample. Since this function has no analytical solution (Shaban, 1988), it was evaluated by numerical integration using Simpson's Rule. A computer-based program was developed to calculate this probability function. The accuracy of the program was confirmed by comparing the results with the table established by Brown and Holgate (1971). Best-fit parameters of each distribution were obtained by the most-likelihood method. Most likelihood estimates (MLEs) were obtained by minimising the following likelihood function.

$$LF(\theta) = -2 \sum \ln(P(x_i, V_i; \theta)) \quad (2)$$

where $P(x_i, V_i; \theta)$ is the probability function for the i th sample (x_i oocysts in V_i (L) of sample) with a parameter set θ .

Comparison between PLN and LN

The discreteness of count data caused problems in fitting the observed data accurately to continuous distributions such as log-normal distributions. For example, the concentration

of the sample was calculated by dividing the number of detected oocysts by the volume of sampled water. However, due to the spatial heterogeneity and the discreteness of the counted data, the “calculated” concentration was not always equal to the “real” concentration, especially when the concentration was very low and only a few oocysts were found in the samples. Additionally, the sample for which no oocysts were detected (so-called “not detected” or “ND”) cannot be directly applied to the log-normal distribution, because this distribution is only defined for positive values. Accordingly, such data should be substituted by some assumptions (Haas and Scheff, 1990). One possible assumption was to treat ND data as containing 0.5 oocysts in the tested volume. Another possibility was to use the cumulative probability up to the concentration of 1 oocyst/sample as a substitution. The effectiveness of these assumptions was evaluated by comparing the parameters with those derived from PLN. The MLEs were obtained in the same way as the discrete distributions, excluding the case where the “calculated” concentration was assumed to be the “real” concentration.

Annual risk of infection

The annual risk of infection caused by drinking the finished water was assessed using Monte Carlo simulation. The estimated distribution of *Cryptosporidium* concentration in the finished water was used to determine the quality of the drinking water. The amount of water consumed daily was assumed either to follow a log-normal distribution whose median value was 0.153 L/d/person ($\mu = -1.88$, $\sigma = 1.12$) according to Teunis *et al.* (1997) or to be constant at 1 L/d/person. The former was developed to assess the occurrence of infection. The latter was developed to assess the safety of the finished water. It was assumed that consuming 1 L of tap water, which is approximately the 95th percentile of the distribution for the daily consumption of tap water that has not been boiled or heated (Teunis *et al.*, 1997; Yano *et al.*, 2000), should be assured to be safe. All oocysts were assumed to be equally viable and infective to humans, regardless of their genotypes, because no information on the strain or the genotype was available by microscopic count. The effect of chlorination was neglected. The dose-response model was derived from Haas *et al.* (1996). The Monte Carlo simulation was conducted 10,000 times to achieve the distribution of the annual risk of infection.

Required water volume for daily monitoring

The maximum annual risk, assurable by daily monitoring of the finished water, was evaluated to develop the monitoring procedure to assure the safety of tap water. This assessment was based on the results of the risk assessment derived from the constant (1 L/d/person) water consumption model. The acceptable annual risk of infection was set as 10^{-4} . The monitoring was conducted on the finished water every day (365 times/year) to assess the water quality of the year. “All negative” (i.e. 365 consecutive negative results) was adopted as a water-quality criterion. For comparison, the same evaluation was carried out using the log-normal distribution to evaluate the possibility of the application of log-normal distribution instead of PLN. In this case, the cumulative probability <1 oocyst/sample was used as the probability of “no detection”.

Results and discussion

Distribution of the oocyst concentration in water

Table 1 shows the MLEs for each distribution, and Figure 2 compares the estimated distribution and the observed data of the source water. Comparing the LF among these three distributions, Poisson distribution showed the poorest fit when compared with the others. It, therefore, indicated that the oocyst concentration in water was not constant but variable.