مجلـــه علمـــی پـژوهشـی دانشگـاه علـــوم پزشکـی اردبیـــل

دوره هفتـم، شمـاره دوم، تابستان ۱۳۸۶، صفحـات ۱۷۷ تا ۱۸۳

شناسایی گونه های کریپتوسپوریدیوم در منابع آبی استان اردبیل به روش PCR- RFLP

بهنام محمدی قلعه بین[۱]، دکتر اسماعیل فلاح[۲]، دکتر محمد اصغرزاده [۳]، دکترعبدالحسن کاظمی[٤]

[۱] نویسنده مسئول: کارشناس ارشد انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

E-mail: b_mohammadighalehbin@yahoo.com

[۲] استادیار انگل شناسی [۳] استادیار فرآورده های بیولوژی [٤] استادیار قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

چکیده

زمینه و هدف: کریپتوسپوریدیوم یک انگل تک یاخته ای کوکسیدیایی است. این انگـل یکـی از عوامـل مهـم مولـد اسـهال شـدید، طولانی مدت و تهدید کننده زندگی در افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی و همچنین یکی از عوامل عمـده اسـهال کودکـان اسـت. همه گیری هایی که بوسیله کریپتوسپوریدیوم بروز می کند معمولاً از طریـق آب آشـامیدنی آلـوده بـه اووسیـست گونـه هـای مختلف کریپتوسپوریدیوم صورت می پذیرد و آلودگی منابع آبی می تواند از طریق مدفوع حیوانات اهلی و وحشی مختلـف کـه مخزن این انگل هستند (مخازن حیوانی)، و یا از طریق آلوده شدن با فاضلاب های انسانی (موارد انسانی) باشد.

روش کار: در این تحقیق از ۱۰ محل تعداد ۲۰۰ نمونه آبی تهیه شد. نمونه ها با استفاده از کاغذهای ۱/۲ میکرونی فیلتر شدند و سپس با روش PCR نمونه های مثبت از نظر کریپتوسپوریدیوم مشخص شدند و سرانجام نمونـه هـای مثبـت بـا روش RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) تعیین گونه شدند.

یافته ها: از هشت نمونه آب که جواب Nested – PCR آنها مثبت شده بود پنج نمونه مربوط به کریپتوسپوریدیوم اندرسونی و دو نمونه مربوط به کریپتوسپوریدیوم پاروم ژنوتیپ گاوی و همچنین یکی از نمونـه هـا بـا کریپتوسـپوریدیوم ژنوتیـپ خـوک (Cryptosproidium Pig genotype) همخوانی داشت.

بحث: با توجه به اینکه کریپتوسپوریدیوم آندرسـونی و کریپتوسـپوریدیوم پـاروم ژنوتیـپ گـاوی، از گونـه هـای شـایع در دام می باشند و کریپتوسپوریدیوم سوئیس در حیوانات وحشی (گراز و خوک) دیده می شود، می توان نتیجه گرفت مخـازن حیـوانی در آلودگی آبهای سطحی منطقه نقش عمده دارند.

واژه های کلیدی: کریپتوسپوریدیوم،RFLP،PCR، منابع آبی

دریافت: ۸۵/۳/۳۱ **پذیرش:** ۸۵/۸/۶

مقدمه

کریپتوســـپوریدیوم[۱] یـــک انگـــل تـــک یاختـــه ای کوکسیدیایی[۲] است (از شاخه اپـی کمپلکـسا[۳]) کـه در ۲۰ سال اخیر به عنوان یک پاتوژن مهم انسانی توجه زیـادی را به خود معطـوف کـرده اسـت [۲،۱]. در آغـاز دهـه ۱۹۸۰ و با کشف بیمـاری ایـدز ایـن تـک یاختـه اهمیـت بیشتری پیدا کرد زیرا مشخص شد که این انگـل یکـی از عوامل مهم مولد اسهال شدید، طولانی مـدت و تهدیـد کننده زندگی در این بیماران و همچنین یکـی از عوامـل عمده اسهال کودکـان اسـت [٤-۲]. همـه گیـری هـایی نظیر آنچه کـه در شـهر میلـواکی[٤] ایالـت ویسکانـسین[٥] آمریکا در ۱۹۹۳ رخ داد و ٤۰۰/۰۰۰ نفر بیمار شدند و

[1] Cryptosporidium
[2] Coccidia
[3] Apicomplexa
[4] Milwaukee
[5] Wisconsin

یا در سال ۱۹۸۷ در کارولتون[1] که ۱۳/۰۰۰ نفر بیمار شدند و موارد مشابه دیگر اهمیت این انگل را نشان می دهند [۷-۵]. همه گیری هایی که بوسیله کریپتوسپوریدیوم بروز می کند معمولاً از طریق آب آشامیدنی آلوده به اووسیست[2] گونه های مختلف کریپتوسپوریدیوم صورت می پذیرد و آلودگی منابع آبی می تواند از طریق مدفوع حیوانات اهلی و وحشی مختلف که مخزن این انگل هستند (مخازن حیوانی)، و یا از طریق آلوده شدن با فاضلاب های انسانی (موارد انسانی) باشد، بنابراین با توجه به راه های متعدد انتقال آلودگی که در بین آنها آب آشامیدنی راه اصلی در ایجاد همه گیری های کریپتوسپوریدیومی می باشد، نیاز برای یافتن گونه های مختلف کریپتوسپوریدیوم در منابع آبی (آبهای سطحی و آشامیدنی) بیشتر احساس می شود. و چون استان اردبیل با داشتن تعداد قابل توجهی مراکز دامداری و دامپروری می تواند یکی از کانون های بومی برای کریپتوسپوریدیوز باشد، در این مطالعه سعی گردید با بکار بردن روش مولکولی PCR به تشخیص قطعی کریپتوسپوریدیوم در نمونه های جمع آوری شده از منابع آبی نایل شد و با انجام RFLP گونه های شایع در منطقه را معرفی کرد.

روش کار

این مطالعه از نوع مطالعه بنیادی است. برای جمع آوری نمونه های آب ابتدا مکان های نمونه برداری مشخص شد که عبارت بودند از رودخانه بالخلو که از وسط شهر اردبیل عبور می کند. از سه نقطه این رودخانه یعنی قبل از ورود به شهر، بعد از ورود به شهر تقریباً در قسمت میانی مسیر رودخانه در داخل شهر و بعد از خروج از شهر نمونه برداری شد.

چهارمین مکان سطح دریاچه شورابیل بود آب این دریاچه از رودخانه تامین می شود. پنجمین مکان رودخانه سامیان در حدود هشت کیلومتری جاده اردبیل به مشکین شهر بود که محلی از رودخانه قبل از رسیدن به روستای سامیان نمونه برداری شد. ششمین محل باز از رودخانه سامیان بعد از عبور از کنار روستا بود. تعداد زیادی دامداری در اطراف روستای سامیان وجود دارد و اهالی روستا نیز در محوطه خانه هایشان به شکل بومی دامداری می کنند.

همچنین چهار منطقه مختلف شهر جهت نمونه برداری از آب لوله کشی انتخاب شد. لازم به توضیح می باشد که آب لوله کشی شهر اردبیل تا زمان آزمایش از منابع آبی زیر زمینی تامین می شد. از ۱۰ محل ذکر شده دربالا به فاصله زمانی هر چهار یا پنج روز یک بار نمونه برداری شد. در کل ۲۰۰ نمونه آب تهیه شدو نمونه های آب مستقیماً فیلتر شدند. برای فیلتر کردن آب از فیلترهای ۱/۲ میکرونی (pall) و دستگاه پمپ خلاءِ استفاده شد [۹،۸]. برای نمونه های هر محل سه فیلتر استفاده شد و جمعاً ۳۰ فیلتر آماده آزمایش شد. رسوب فیلترها بوسیله اسکالپل تراش داده شد و در داخل میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری به همراه دی کرومات پتاسیم ۲/۵ ٪ (۱۰) در چهار درجه سانتی گراد نگهداری شد. این مرحله طی چهار ماه از اردیبهشت ۸٤ تا پایان مرداد ۸٤ انجام گرفت. قبل از انتقال نمونه ها جهت freeze – thaw و انجام PCR، نمونه ها بوسیله PBS برای ۵-۷ بار با دورg ۱۲۰۰۰ شستشو داده شدند تا رنگ دی کرومات پتاسیم از بین برود.

بدلیل عدم دسترسی ، از روش های دیگر تغلیظ اووسیست در نمونه های آبی مانند Immunomnetic separation (IMSag) استفاده نشد [۱۱،۱۰،۸]. کلیه نمونه ها برای ۸ بار با استفاده از دمای ۹۰ درجه و ۲٤- درجه سانتی گراد freeze and thaw شدند، زمان فریز در ۲٤ – درجه سانتی گراد در هر نوبت دو ساعت در نظر گرفته شد. استخراج DNA از نمونه ها با روش پروتئیناز K، SDS و CTAB صورت گرفت.

دو پرایمر مورد استفاده در PCR اول دارای توالی زیر بودند[۱۱،۸]:

Forward primer1: 5- TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG

Reverse primer1: 5- CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA

[1] Carrollton
[2] Oocyst

در طیPCR اول قطعه ای به اندازه bp ۳۲۵ از ژن SSU rRNA تکثیر می یابد.

دو پرایمر مورد استفاده در PCR دوم (Secondary PCR) دارای توالی زیر بودند [۸،۱۱]:

Forward Primer2:5'- GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG
Reverse Primer2: 5'- AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A

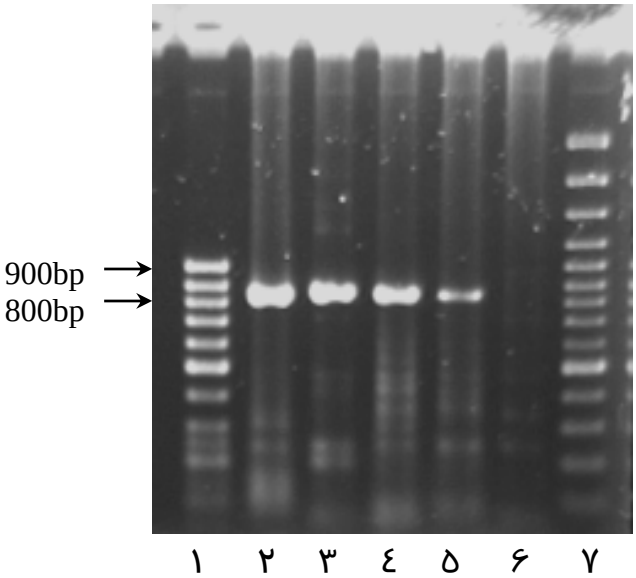
در طی Secondary PCR قطعه ای به اندازه bp ۸۶۴-۸۲۶ از ژن SSU rRNA تکثیر می یابد که با الکتروفورز در آگارز ۱٪ قابل مشاهده است.

محصول PCR اول و دوم در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند. برای تمام نمونه هایی که محصول PCR دوم آنها قطعه مورد نظر را به صورت یک باند در محل مورد نظر در الکتروفورز نشان دادند،RFLP[1] با دو آنزیم SspI و VspI انجام گرفت و محصولات آنها در ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شدند. چون گونه های کریپتوسپوریدیوم آندرسونی و کریپتوسپوریدیوم موریس بعد از RFLP بوسیه آنزیم های Ssp I و Vsp I، قطعات و در نتیجه باندهای مشابهی را ایجاد می کنند و پس از الکتروفورز و مشاهده باندهای مربوطه قابل تشخیص از همدیگر نیستند، نمونه هایی که باندهای مربوط به دو گونه فوق الذکر را نشان دادند تحت تاثیر آنزیم Dde I، قرار گرفتند تا دقیقاً تعیین گونه شوند. نمونه هایی که تحت تاثیر آنزیم Dde I قرار گرفتند، همانند محصولات RFLP با آنزیم های Ssp I و Vsp I، در ژل ۲٪ الکتروفورز شدند.

آنزیم SspI جهت تعیین گونه ها و VspI جهت تعیین ژنوتیپ های گاوی و انسانی کریپتوسپوریدیوم پاروووم مورد استفاده قرار می گیرند. محصولات RFLP پس از الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها

از ۳۰ نمونه حاصل از فیلتره آب، پس از انجام Nested-PCR و الکتروفورز، هشت نمونه باندهای مربوط به کریپتوسپوریدیوم را نشان دادند و سه نمونه دیگر باندهای مضاعف نشان دادند که از مطالعه کنار گذاشته شدند (شکل ۱).



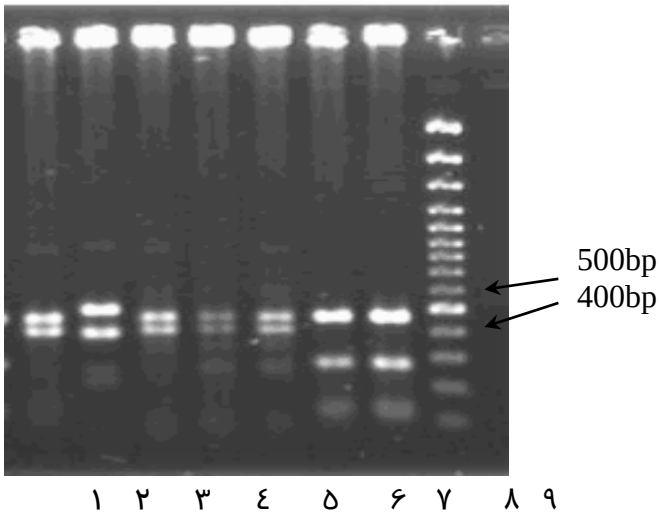
شکل۱: الکتروفورز محصول PCR دوم مربوط به چند نمونه آبی : ردیف ۱ سایز مارکر 50bp ردیفهای ۲ و ۳ و ٤ و ۵ باندهای حدود 826-864bp مربوط به کریپتوسپوریدیوم در چند نمونه آبی، ردیف ۶ نمونه منفی جهت کنترل و ردیف ۷ سایز مارکر 100bp plus

از هشت نمونه آب که جواب Nested – PCR آنها مثبت شده بود، پس از انجام RFLP با آنزیمهای SspI و VspI، مشخص شد پنج نمونه مربوط به کریپتوسپوریدیوم اندرسونی / موریس و دو نمونه مربوط به کریپتوسپوریدیوم پاروووم ژنوتیپ گاوی بودند و همچنین یکی از نمونه های مربوط به آب ، در مجاورت آنزیم SspI ، باندهایی در محل حدود ۳۶۵bp و ٤۵۳bp نشان دادو در مجاورت آنزیم VspI باندهایی در محل حدود ۱۰٤bp و ۶۳۲bp نشان داد که با کریپتوسپوریدیوم ژنوتیپ خوک (Cryptosproidium Pig genotype) همخوانی دارد (شکل۲). این گونه در نمونه مربوط به رودخانه بالخلو دیده شده است و کلیه نمونه های مثبت آبی مربوط به رودخانه های بالخلو و سامیان بودند.

جهت تعیین دقیق نوع گونه پنج نمونه مربوط به کریپتوسپوریدیوم اندرسونی / موریس تحت تاثیر آنزیم Dde I قرار گرفتند و مشخص شد تمامی

[1] Restriction Fragment Length Polymorphism

نمونه های مشکوک به کریپتوسپوریدیوم آندرسونی / موریس، در واقع کریپتوسپوریدیوم آندرسونی هستند و در هیچ یک از نمونه های آبی کریپتوسپوریدیوم موریس تشخیص داده نشد.



شکل۲: باندهای مربوط به محصول RFLP با آنزیم *Ssp1*. شماره ۱،۳،٤،٥ مربوط باندهای مربوط به کریپتوسپوریدیوم اندرسونی / موریس در حدود bp ٤٤٨وbp ۳۸٥ و شماره۶و۷ مربوط به گونه کریپتوسپوریدیوم پاروم که باندهایی در حدود ٤٤٩و٢٥٤ و bp ۱۱۰ را نشان می دهد و شماره ۲ مربوط به کریپتوسپوریدیوم ژنوتیپ خوکی که باندهایی در حدود bp ۳٦٥ و bp٤٥۳ را نشان می دهد .شماره ۸ سایز مارکر bp ۱۰۰ وشماره ۹ کنترل منفی را نشان می دهد.

کریپتوسپوریدیوم آندرسونی تحت تاثیر آنزیم Dde I، باندهایی در محل ۱۵۶،۱۸۶،۲۰ و bp ٤٧٠ ایجاد می کند، که فقط سه باند از آنها قابل مشاهده است.در حالی که کریپتوسپوریدیوم موریس تحت تاثیر آنزیم Dde I، باندهایی در محل ۲۰،۱۵۶،۱۸۶، ۲۲٤ و bp ۲٤٧ ایجاد می کند که چهار باند آن قابل مشاهده است [۹].

بحث

اخیراً برای مشخص کردن اووسیست های کریپتوسپوریدیوم در داخل نمونه های آبی، از روش های مختلفی استفاده شده است. بطور مثال از روش های ایمنوفلورسانس (IFA) در موارد متعددی برای شناسائی اُاُسیست های کریپتوسپوریدیوم استفاده شده است ولی این روش وقت گیر و با هزینه بالا می باشد و در ضمن امکان واکنش های ناخواسته آنتی بادی ها با گونه های مختلف کریپتوسپوریدیوم وجود دارد بنابراین فاقد ویژگی لازم جهت شناسایی گونه های مختلف کریپتوسپوریدیوم می باشد. بنابراین تلاش های فراوانی جهت استفاده از تست های مولکولی برای افزایش حساسیت و ویژگی شناسایی کریپتوسپوریدیوم انجام گرفته است [۱۶-۱۲]. روش های مولکولی بدلیل اینکه علاوه بر تشخیص کریپتوسپوریدیوم، قادر به شناسایی گونه ها و ژنوتیپ ها نیز می باشند دارای ارزش بالایی هستند.

در روش های مولکولی از تکثیر قطعات مربوط به TRAP-C_1,HSP70,SSUrRNA و COWP و محل اکتین استفاده می شود [۱۷] که در این راستا از روش های مختلف PCR مانند IC-PCR, Nested–PCR, Real–Time PCR و غیره استفاده می شود.

در مطالعه ای که توسط جی مک للچلین[1] و همکاران [۱۸] با عنوان تعیین ژنتیکی گونه های کریپتوسپوریدیوم جدا شده از ۲۱۸ بیمار مبتلا به اسهال انجام شده، تکثیر قطعات مربوط به COWP ، SSUrRNA,TRAP-C_1 به روش PCR انجام گرفته و مشخص شده است که حساسیت روش PCR برای SSUrRNA و COWP و TRAP-C_1 به ترتیب ۹۷، ۹۱، ۶۶ ٪ به دست آمده است از طرف دیگر، بیشتر مطالعاتی که اخیراً انجام گرفته است، روی قطعه SSUrRNA بوده است [۱۱] لذا در این مطالعه نیز قطعه فوق جهت تکثیر انتخاب شد.

در این مطالعه از مجموع هشت نمونه مثبت آبی، پنج نمونه دارای گونه آندرسونی (۶۲/۵٪)، دو نمونه دارای گونه پاروم ژنوتیپ گاوی (۲۵٪) و یک نمونه دارای ژنوتیپ خوک (۱۲/۵٪) بودند. لازم به توضیح می باشد که خوک وحشی

[1] J.Mclauchlin

یا گراز از حیوانات بومی منطقه مورد مطالعه می باشد و از طرفی هنوز مطالعات کافی برای مشخص کردن میزبان های مختلف کریپتوسپوریدیوم ژنوتیپ خوکی در سطح جهان صورت نگرفته است و ممکن است در آینده این ژنوتیپ در حیوانات دیگر به غیر از خوک نیز گزارش شود. همه موارد مثبت مربوط به آب های سطحی (رودخانه بالخلو و رودخانه سامیان) بودند. به احتمال قوی زیر زمینی بودن منابع آب آشامیدنی شهر اردبیل دلیل منفی شدن نمونه های مذکور باشد.

در مطالعات مختلف نمونه های موجود در آب دارای تنوع بسیار زیادی بوده است. بطور مثال در بررسی که توسط جیانگ جیانلین[1] و همکاران برروی نمونه های آبی در نیویورک در سال ۲۰۰۵ انجام گرفته است،در کل ۱۲۱ نمونه مورد آزمایش قرار گرفته که ۱۰۷ مورد آن مثبت شده است. همچنین در این مطالعه ۲۲ گونه شناسایی شد که بیشترآنها قبلاً در انسان و حیوانات اهلی مشاهده نشده بودند و تعدادی از آنها هم فقط در حیوانات وحشی به عنوان پاتوژن شناسایی شده بودند [۱۹].

در مطالعه دیگری که توسط ژیاو[2] و همکاران در سال ۲۰۰۰ روی ۲۹ نمونه از آب های جاری در نیویورک صورت گرفته، ۲۷ نمونه در آزمایش PCR مثبت شدند که در توالی محصولات PCR، ۱۲ ژنوتیپ مختلف به دست آمد که چهار گونه آن قبلا شناسایی شده بودند ولی بقیه ژنوتیپ ها مربوط به حیوانات وحشی بودند که قبلا شناسایی نشده بودند [۸].

در مطالعه دیگری که توسط ژیاو و همکاران در سال ۲۰۰۱ روی ۵۵ نمونه از آب های سطحی مربوط به مناطق مختلف ایالات متحده و ٤۹ نمونه تهیه شده از فاضلاب شهر میلواکی ویسکانسین انجام گرفته، کریپتوسپوریدیوم از ۲۵ نمونه از آب های سطحی و ۱۲ نمونه از نمونه های فاضلاب جدا شده است. در این مطالعه کریپتوسپوریدیوم پاروم انسانی وگاوی ژنوتیپ های غالب در نمونه های مربوط به آب های سطحی بودند، در حالی که کریپتوسپوریدیوم اندرسونی گونه غالب در نمونه های مربوط به فاضلاب بودند[۹].

مطالعات فوق اهمیت آلودگی آب های سطحی از طریق گونه های دامی و گونه های مربوط به حیات وحش را به وضوح نشان می دهند.

در این مطالعه غالب بودن گونه های دامی یعنی کریپتوسپوریدیوم آندرسونی و کریپتوسپوریدیوم پاروم ژنوتیپ گاوی، اهمیت چرخه زئونوتیک را در منطقه نشان می دهد. همچنین وجود کریپتوسپوریدیوم ژنوتیپ خوکی نقش حیوانات وحشی را در آلوده کردن آب های سطحی منطقه آشکار می کند. در این مطالعه سه گونه متفاوت کریپتوسپوریدیوم از منابع آبی گزارش شد در حالی که در مطالعات دیگر تنوع گونه های شناسایی شده بیشتر است که امید است با مطالعات وسیع تر گونه های بیشتری شناسایی و معرفی گردند.

لازم به ذکر است که معرفی گونه های کریپتوسپوریدیوم از آب برای اولین بار در ایران صورت می گیرد، همچنین کریپتوسپوریدیوم سوئیس تاکنون در ایران گزارش نشده است.

نتیجه گیری

با توجه به اینکه کریپتوسپوریدیوم آندرسونی و کریپتوسپوریدیوم پاروم ژنوتیپ گاوی، از گونه های شایع در دام می باشند و کریپتوسپوریدیوم سوئیس در حیوانات وحشی (گراز و خوک) دیده می شود، می توان

[1] Jianlin Jiang
[2] Xiao

نتیجه گرفت مخازن حیوانی در آلودگی آب های سطحی منطقه نقش عمده دارند.

علت عدم وجود گونه های انسانی در نمونه های آب لوله کشی می تواند به دلیل زیر زمینی بودن منابع آب آشامیدنی شهر اردبیل در زمان انجام تحقیق باشد، همچنین عدم وجود گونه های انسانی در نمونه های مربوط به آب های سطحی می تواند به دلیل نبود سیستم فاضلاب شهری در زمان تحقیق در این شهر باشد.

References

1- Keuseh G T, Hamer D, Joe A, Kelley M, Griffiths J, Ward H. Cryptosporidia – who is at risk?. Schweiz Med Wochenschr. 1995; 125 (18): 899-908.

2- O'Donoghue P J. Cryptosporidium and Cryptosporidiosis in man and animal. Inter J for parasitol.1995; 25 (2): 139-195.

۳- فلاح محمد. کریپتوسپوریدیوم و اسهال کودکان، مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی۱۳۷۱ ، سال شانزدهم، شماره ۲و۱، ص۱۲۶-۵ .

4- Alonso S M. Intestinal parasite in the person population in the Madrid Area .Inferm Infect Microbiol clin.1995; 13 (2): 295-281.

5-Fayer R, Morgan U, and Upton S J .Epidemiology of cryptosporidium : transmission, detection and indentrification. Int J parasital.2000.30: 1305-1322.

6- Mackenzie W R, Ford T E. A massive out break in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply . N ENG J Med . 1994; 331: 161-167.

7- Juranek D D. Cryptosporidiosis: Sources of infection and guindelines for prevention. Clin Infect Dis.1995; 21 Supp L1: S 57-61.

8- Xiao L, Alderisio K, Limor j, Royer M , Lal A A. Identification of species and sources of cryptosporidium Oocysts in storm waters with a small – subunit rRNA – Based Diagnostic and Genotyping Tool. Appl . Environ. Microbiol.2000; 66: 5492-5498.

9- Xiao L, Singh A, Limor j, Graczyk T K, Gradus S, Lal A. Molecular characterization of cryptosporidium Oocysts in samples of Raw surface water and waster Water. Appl. Environ Microbiol. 2001;67: 1097-1101.

10- Coupe S, Sarfati C C, Hamane S, Derouin F. Detection of cryptosporidium and Identification to the species level by Nested PCR and Restriction Fragment Length poly morphism. J clin Microbiol. 2005; 43(3): 1017-1023.

11- Xiao L, Lal A A, Jiang j. Detection and Differentiation of Cryptosporidium Oocysts in Water by PCR-RFLP.In: John F T , Ragout A L : Public Health Microbiology : Methods and protocols, Vol. 268, Human press Inc., Totowa, NJ:163-176.

12- LeChevallier M W, Di Giovanni G D, Clancy J L, Bukhari S, Rosen J S, et al. Comparison of Method 1623 and Cell Culture-PCR for Detection of Cryptosporidium spp. in Source Waters. Appl Envir Microbiol .2003; 69: 971-9.

13- Rochelle PA, Ferguson DM, Handojo TJ, De Leon R, Stewart M H. An assay combining cell culturewith reverse transcriptase PCR to detect and determine the infectivity of waterborne Cryptosporidium parvum. ApplEnviron Microbiol. 1997; 63 (5): 2029-37.

14- Mayer C L, Palmer C J. Evaluation of PCR, nested PCR, and fluorescent antibodies for detection of Giardia and Cryptosporidium species in wastewater. Appl Environ Microbiol.1996; 62(6): 2081-85.

15- Stinear T, Matusan A, Hines K, Sandery M. Detection of a single viable Cryptosporidium parvum oocyst in environmental water concentrates by reverse transcription-PCR. Appl Environ Microbiol.1996; 62(9): 3385-90.

16- Di Giovanni G D, Hashemi F H, Shaw N J, Abrams F A, LeChevallier M W, et al. Detection of infectious Cryptosporidium parvum oocysts in surface and filter backwash water samples by

immunomagnetic separation and integrated cell culture-PCR. Appl Environ Microbiol. 1999; 65: 3427-3432.
17- McLaunchlin J, Amar C, Pedraza- Diaz S, Nichols G l. Molecular epidemiological analysis of Cryptosporidium spp.in the United Kingdom: results of genotyping Cryptosporidium spp.in 1,705 fecal smples from humans and 105 fecal sampies from livestock animals. Jclly Microbiol. 2000; 38: 3984-3990.
18- McLauchlin J, Pedraza-Diaz S, Amar-Hoetzeneder C, and Nichols G L. Genetic characterization of Cryptosporidium strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. J Clin Microbiol. 1999; 37: 3153-3158.
19- Jiang J, Xiao L, Alderisio A A. Distribution of cryptosporidium Genotypes in storme Event water Samples from three watersheds in New York .Appl Environ Microbiol. 2005; 71(8): 4446-4454.